



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo de Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Aislamiento y caracterización de glicomacropéptido
de lactosuero procedente de una quesería industrial

*Isolation and characterisation of whey
glycomacropéptide from an industrial cheese factory*

Autor/es

Eduardo Manuel Conejero Olalla

Directoras

M^a Lourdes Sánchez Paniagua. Área de Tecnología de Alimentos

Sheila Murillo Latasa. Técnico de Producción. Villacorona S.A.

Facultad de Veterinaria, 2019

Índice

1. Resumen/Summary	1
2. Introducción	2
2.1 Composición de la leche	2
2.2 Las proteínas de la leche bovina	3
2.2.1 Caseínas	3
2.2.2 Proteínas séricas y de la membrana del glóbulo graso	4
2.3 El lactosuero como subproducto	5
2.4 Péptidos bioactivos de la leche	6
2.4.1 Tipos de péptidos bioactivos	8
2.4.2 El glicomacropéptido (GMP)	10
2.4.2.1 Bioactividad del glicomacropéptido	11
2.5 <i>Cronobacter sakazakii</i>	13
3. Justificación y objetivos	14
4. Material y métodos	14
4.1. Origen de los subproductos lácteos	14
4.2. Procedimientos para la obtención del glicomacropéptido (GMP)	16
4.3 Determinación de proteína por BCA	18
4.4 Análisis de las fracciones de GMP por electroforesis en SDS (SDS-PAGE)	19
4.5 Tinción PAS (Periodic Acid-Schiff)	20
4.6 Tinción con Azul de Coomassie	20
4.7 Concentración de las soluciones de GMP por liofilización	21
4.8 Detección del GMP por inmunocromatografía	21
4.9 Ensayo de actividad antimicrobiana del GMP frente a <i>Cronobacter sakazakii</i>	22
5. Resultados y discusión	23
5.1 Aislamiento y caracterización del GMP	23
5.2 Electroforesis con SDS	24
5.3 Detección de GMP mediante kit inmunocromatográfico	28
5.4 Cuantificación de proteína en los aislados de GMP por BCA	29
5.5 Ensayo de actividad antimicrobiana frente a <i>C. sakazakii</i>	31
6. Conclusiones	33
7. Valoración Personal	33
8. Bibliografía	34

1. Resumen/Summary

La leche es un alimento muy rico nutricionalmente, en la que además podemos encontrar una serie de compuestos con actividad funcional. Entre ellos, cabe destacar el glicomacropéptido (GMP), un fragmento liberado de la kappa-caseína por acción de la quimosina, al cual se le atribuye actividad antitrombótica y actividad antibacteriana, entre otras. Dicho péptido se encuentra en el lactosuero de quesería, el cual es un subproducto que se produce en grandes cantidades, por lo que es de gran interés estudiar los posibles usos a los que puede destinarse, que impliquen un aprovechamiento y revalorización del mismo. El objetivo de este trabajo de fin de grado ha sido el aislamiento del GMP mediante un tratamiento térmico y precipitación con ácido tricloroacético (TCA) a partir de diferentes lactosueros industriales. Para evaluar la eficacia del aislamiento se ha llevado a cabo una caracterización del GMP mediante electroforesis con SDS e inmunocromatografía. Se ha comprobado la presencia de GMP en las fracciones aisladas de los diferentes métodos y lactosueros. Una vez obtenidos los aislados de GMP, se han realizado unos experimentos preliminares para evaluar su actividad antimicrobiana frente a *Cronobacter sakazakii*, aunque no se han obtenido resultados concluyentes.

Milk is a nutritionally rich food, in which we can also find a series of compounds with functional activity. Among them, it is worth mentioning the glycomacropéptide (GMP), a fragment released from kappa-casein by the action of chymosin, to which antithrombotic activity and antibacterial activity, among others, have been attributed. This peptide is found in cheese whey, which is a by-product produced in large quantities, so it is of great interest to study the possible uses to which it can be applied, which involve the use and revaluation of it. The aim of this end-of-grade work has been to isolate GMP by means of thermal treatment and precipitation with trichloroacetic acid (TCA) from different industrial lactosera. In order to evaluate the effectiveness of the isolation, the GMP characterization has been carried out by means of electrophoresis with SDS and immunochromatography. The presence of GMP has been verified in the isolated fractions of the different methods and lactosera. Once the GMP isolates were obtained, preliminary experiments were carried out to evaluate their antimicrobial activity against *Cronobacter sakazakii*, although no conclusive results were obtained.

2. Introducción

2.1 Composición de la leche

Según el Codex Alimentarius (1999), la leche se define como la secreción de líquido de las glándulas mamarias de hembras de abasto, obtenida mediante uno o más ordeños, sin ningún tipo de adición o extracción y destinada al consumo humano.

Su objetivo natural es satisfacer las necesidades nutricionales y fisiológicas de los recién nacidos de las especies de mamíferos, garantizando así su crecimiento y desarrollo.

La leche es un alimento líquido (87% de agua), contiene un promedio de 13% de sólidos totales de los cuales alrededor de un 9% son sólidos no grasos.

La composición de la leche es similar en todos los mamíferos en lo que se refiere a los principales componentes: proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas y minerales (Claeys *et al.*, 2014). Sin embargo, estos componentes se encuentran en una proporción variable dependiendo de la especie y la raza, la época del año, la etapa de lactancia y el estado de salud del animal (Guerra, 2014) (Tabla 1).

Tabla1: *Composición general de la leche de varias especies* (Gantner, 2015).

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

* MST: *Materia seca total*

La lactosa es el componente principal de la leche bovina con un valor en torno a 4,9%, se trata de un disacárido formado por la unión de una glucosa y una galactosa. Además de lactosa, la leche contiene trazas de otros azúcares, incluyendo glucosa, fructosa, glucosaminas, y oligosacáridos, entre otros. Los oligosacáridos están divididos en dos tipos, ácidos y neutros y en el calostro bovino se encuentran en una proporción de aproximadamente 0,7 a 1,2 g/mL (McGrath *et al.*, 2016).

Los lípidos en la leche se encuentran principalmente en forma coloidal como glóbulos grasos (0,1-20 μm) y rodeados por la membrana del glóbulo graso, como estabilizante de esta estructura.

La leche bovina contiene alrededor de 3,5 a 5% de lípidos totales, siendo en su mayoría triglicéridos (TG), con pequeñas cantidades de diglicéridos (DG), monoglicéridos (MG), fosfolípidos (PL), ácidos grasos libres (FFA), colesterol y ésteres de colesterol (Tabla 2). Además, en cantidades muy pequeñas encontramos vitaminas liposolubles y β -carotenos (Guerra, 2014).

Tabla 2: *Composición lipídica de la leche bovina* (Calvo *et al.*, 2014).

	% mínimo	% máximo
Triglicéridos	97,0	98,0
Diglicéridos	0,3	0,6
Monoglicéridos	0,2	0,4
Ácidos grasos libres	0,1	0,4
Fosfolípidos	0,2	1,0
Colesterol	0,3	0,4

Las proteínas de la leche se clasifican en tres tipos: caseínas, las cuales son insolubles; proteínas séricas, que son solubles y proteínas de la membrana del glóbulo graso.

2.2 Las proteínas de la leche bovina

2.2.1 Caseínas

Las caseínas son proteínas específicas de la leche, representando en torno al 75-80% de las proteínas totales. Se agrupan entre sí formando micelas de caseína mediante enlaces hidrofóbicos y puentes electrostáticos gracias al fósforo y el calcio. Las micelas de caseína no solo contienen las subunidades de caseína, sino que también contienen calcio, fósforo y otros iones como magnesio y citrato en forma insoluble, que se unen al fosfato cálcico coloidal de la leche. Además, las micelas también contienen asociadas otras proteínas como la fracción proteosa-peptona y ciertas enzimas. Estas agregaciones son las que le dan el color blanco a la leche y hacen que tenga una carga neta negativa y de esta manera se mantengan estables en suspensión en la leche (Jensen *et al.*, 1995).

Aunque no se sabe exactamente la forma en la que se organizan las caseínas y dan lugar a las micelas de caseínas, el modelo más aceptado se fundamenta en la llamada

hipótesis submicelar, que se basa en que las micelas están formadas a su vez por submicelas de caseína (Walstra, 1999).

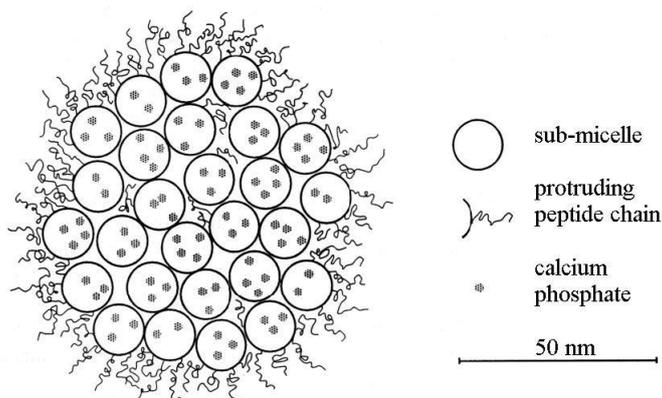


Figura 1. Modelo esquemático de una sección transversal a través de una micela de caseína. Los círculos son las submicelas de caseína, los puntos grises el fosfato cálcico coloidal y las proteínas que conectan las submicelas con el exterior son las κ -caseínas. (Walstra, 1999).

Aunque existen otros modelos alternativos como el modelo de *nanoclusters*, ambos métodos coinciden en el papel integrador del fosfato cálcico coloidal y en la localización de las terminaciones de κ -caseína en el exterior de las micelas de caseína, las cuales dan estabilidad a la micela en la leche (Phadungath, 2005).

Dentro de las caseínas hay varios tipos de caseína, principalmente: α -caseína (α_1 y α_2), β -caseína y κ -caseína, y en conjunto, representan aproximadamente el 78% de las proteínas de la leche bovina (Heck *et al.*, 2009).

2.2.2 Proteínas séricas y de la membrana del glóbulo graso

El lactosuero es definido como la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso (Foegeding y Luck, 2002).

Las proteínas séricas representan el 18% de las proteínas de la leche bovina (McGregor y Poppitt, 2013). Dentro de las proteínas del lactosuero destacan la β -lactoglobulina, la α -lactalbúmina, la lactoferrina, las inmunoglobulinas, la albúmina sérica y el glicomacropéptido, así como diversos enzimas y factores de crecimiento.

La **β -lactoglobulina** es la proteína más prevalente en el lactosuero bovino. Representa el 10% de la proteína total de leche y aproximadamente el 58% de las proteínas séricas totales. La principal función de esta proteína es el transporte de moléculas hidrofóbicas, como los ácidos grasos, el retinol, la vitamina D o el colesterol (Madureira *et al.*, 2007).

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

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

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

Las **proteínas de la membrana del glóbulo graso** representan menos del 4% del total de proteínas de la leche (Murgiano *et al.*, 2009) Existen alrededor de 40 proteínas diferentes, con pesos moleculares de entre 15.000 y 240.000 Da. Entre las proteínas más abundantes, seis de ellas son glicoproteínas e incluyen la mucina-1 (MUC1), la xantín oxidasa (XO), la mucina-15 (MUC15 o PAS III), la CD36 (PAS IV), la butirofilina (BTN) y la lactadherina (PAS VI/VII). La relación de estas proteínas con la membrana del glóbulo graso es diferente, pueden ser integrales, periféricas o bien establecer una interacción débil con la membrana, lo que condiciona la forma de obtenerlas. Siendo las más importantes la butirofilina y las mucinas (Mather, 2000).

2.3 El lactosuero como subproducto

El lactosuero contiene principalmente lactosa, proteínas con un importante valor nutritivo, minerales, vitaminas y grasa. Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de cómo se realice la eliminación de la caseína. La denominada coagulación dulce o enzimática está basada en la coagulación de la caseína por acción de enzimas. Estos enzimas pueden proceder del sistema digestivo de animales (pepsina o cuajo), de microorganismos o de origen recombinante. El segundo tipo de coagulación llamado coagulación ácida, resulta del proceso de fermentación por bacterias lácticas, o bien mediante la adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales como en la elaboración de algunos quesos frescos (Jelen, 2003). En cualquiera de los dos tipos de lactosuero, se

estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90% del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes (Liu *et al.*, 2005). Entre los más abundantes de estos nutrientes están la lactosa (4,5-5%, p/v), proteínas solubles (0,6-0,8%, p/v), lípidos (0,4-0,5%, p/v) y sales minerales (8-10% de extracto seco) (Londoño, 2006).

Para la industria alimentaria, el lactosuero constituye una fuente económica de proteínas que posee múltiples propiedades que pueden ser utilizadas en una amplia gama de alimentos. La industria láctea es uno de los sectores más importantes de la economía de los países industrializados y en desarrollo. Aunque existen diferentes posibilidades para la utilización de este subproducto, las estadísticas indican que una parte importante es descartada como efluente, lo que crea un serio problema medioambiental (Aider *et al.*, 2009). Por una parte, afecta física y químicamente a la estructura del suelo, resultando en una disminución del rendimiento de los cultivos agrícolas y cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto (Aider *et al.*, 2009).

Según Almécija (2007) la **distribución de la producción de lactosuero** en el mundo en el año 2005 fue la siguiente: Europa 53%, América del Norte y central 28%, Asia 6%, África 5%, Oceanía 4% y América del Sur 4%. Estos porcentajes representan anualmente 110-115 millones de toneladas de lactosuero a nivel mundial derivados de la elaboración de queso (Londoño, 2006). De este volumen de lactosuero, el 45% se desecha en ríos, lagos y estaciones de aguas residuales, o en el suelo, lo que representa una pérdida significativa de nutrientes ocasionando serios problemas de contaminación (Londoño, 2006). El porcentaje restante es tratado y transformado en varios productos alimentarios, de los cuales cerca del 45% es usado directamente en forma líquida, 30% en polvo, 15% como lactosa y subproductos, y el resto como concentrados de proteínas de lactosuero (Panesar *et al.*, 2007). Otra posible uso del lactosuero es la obtención de péptidos bioactivos, procedentes de las proteínas del mismo.

2.4 Péptidos bioactivos de la leche

Las proteínas de la leche y sus fracciones son las principales fuentes de péptidos bioactivos, los cuales son ingredientes potenciales para alimentos funcionales que pueden ejercer alguna función para promover la salud (Giacometti y Buretić-Tomljanović, 2017).

Los péptidos bioactivos pueden tener un papel beneficioso en la salud humana con diversas actividades como la hipocolesterolemica, antioxidante, antitrombótica, antimicrobiana, inmunomoduladora, antihipertensiva, antagonista y opioide (Mohanty *et al.*, 2016).

La actividad bioactiva del péptido viene dada por los aminoácidos que contiene y por las secuencia de los mismos.

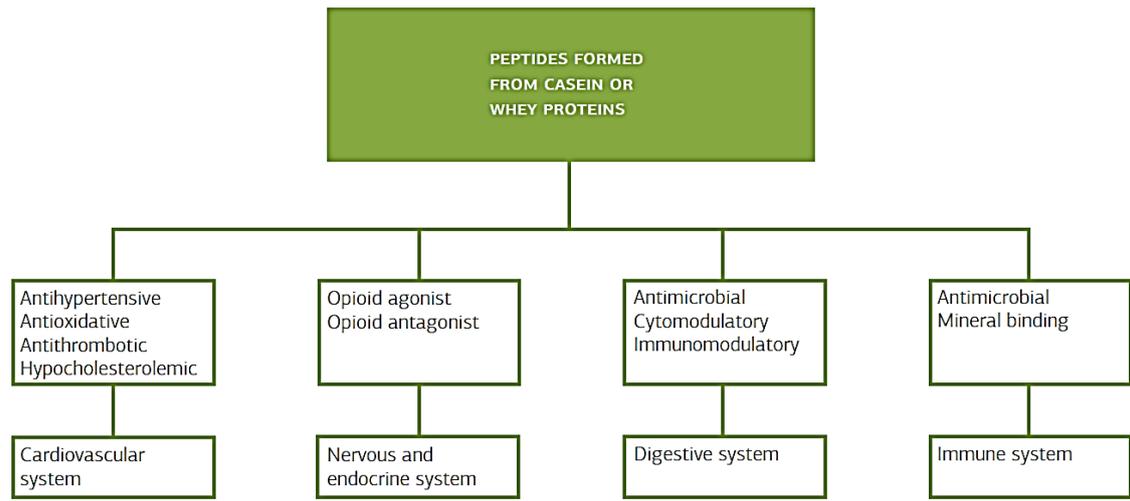


Figura 2. Efecto fisiológico de los péptidos bioactivos formados a partir de proteínas de la leche en las funciones humanas (Mohanty *et al.*, 2016).

En la leche, los péptidos bioactivos están inactivos dentro de la proteína nativa y son activados por proteasas presentes en la leche, enzimas digestivas y enzimas producidas por la microbiota intestinal y/o enzimas secretadas por microorganismos (Espejo-Carpio *et al.*, 2018). Las propiedades antimicrobianas de algunos de estos péptidos proporcionan una barrera química contra el crecimiento bacteriano, desempeñando un papel importante en la calidad e inocuidad de los alimentos y aumentando su vida útil (Espejo-Carpio *et al.*, 2018).

Principalmente estos péptidos bioactivos se pueden obtener por tres maneras: mediante hidrólisis enzimática llevada a cabo por enzimas digestivas; mediante fermentación de la leche por cultivos iniciadores; mediante proteólisis por acción de enzimas de microorganismos o de plantas. Algunos estudios sugieren la combinación de estos tres, como método más efectivo para generar péptidos bioactivos (Egger y Ménard., 2017).

La actividad bioactiva del péptido viene dada por los aminoácidos que contiene y por las secuencia de los mismos

Tabla 3. Principales secuencias de péptidos bioactivos, provenientes de caseínas y proteínas del lactosuero y con sus efectos correspondientes (Egger y Ménard., 2017).

Nombre	Fragmento	Efecto
Lactotripeptidos	β - y κ -caseína	ACE inhibidor
α_{s1} -Casokinina-5	α_{s1} caseína f(23-27)	Antihipertensivo ACE inhibidor
β -Casokinina-7	β -caseína f(177-183)	ACE inhibidor
Lactokinina	α -lactalbumina f(104-108)	ACE inhibidor
Lactokinina	β -lactoglobulina f(78-80)	ACE inhibidor
α_{s1} -Immunocasokinina	α_{s1} -caseína f(194-199)	Immunomodulator Antihipertensivo
β -Casomorphin-7	β -caseína f(60-66)	Opioide Immunomodulator
Lactostatina	β -lactoglobulina f(71-75)	hipocolesterolemia
Lactoferricina	Lactoferina f(17-41)	Antimicrobiano Immunomodulator

Los péptidos bioactivos de la leche pueden derivar tanto de las caseínas como de las proteínas del lactosuero.

2.4.1 Tipos de péptidos bioactivos

Péptidos opioides

Los péptidos opioides derivados de las proteínas de la leche son exógenos; pudiendo presentar actividad agonista o antagonista. Con actividad agonista tenemos las casomorfina, derivadas de las caseínas, siendo las más importantes las β -casomorfina. También hay derivados de las proteínas séricas, en las que destacan las lactorfina. Mientras que con actividad antagonista destacan las casoxina (Torres-Llanez *et al.*, 2005).

Péptidos con acción antihipertensiva

Los péptidos antihipertensivos inhiben la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (peptidildipeptido hidrolasa). ECA es una enzima multifuncional que está localizada en diferentes tejidos (plasma, pulmón, riñón, corazón, músculo esquelético, páncreas, cerebro). Esta enzima puede incrementar la presión sanguínea al convertir angiotensina I (decapéptido) en un potente vasoconstrictor, angiotensina II (octapéptido). Los péptidos de la leche que presentan esta acción son la α_{s1} -caseína y la β -caseína. Siendo

esta última la proteína de la leche con mayor número de fragmentos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (iECA) (Torres-Llenez *et al.*, 2005). Esta actividad se ve incrementada tras un proceso de proteólisis, tal y como ocurre en la fermentación de la leche (Domínguez Gonzalez *et al.*, 2014).

Péptidos inmunomoduladores

Los péptidos inmunomoduladores presentes en la leche afectan al sistema inmune y a la respuesta de proliferación de las células. Los péptidos inmunoregulatorios obtenidos de la β -caseína y la α_{s1} -caseína, aumentan la fagocitosis y modulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos. La lactoferrina intacta o su péptido N-terminal también modulan la blastogénesis o diferenciación de linfocitos. Las hormonas, factores de crecimiento y citocinas encontrados en la leche, también son importantes en la inmunorregulación y desarrollo del sistema inmune (Schanbacher *et al.*, 1998).

Péptidos antitrombóticos

Los péptidos antitrombóticos, las casoplatelinas, son derivadas de la parte C-terminal, el caseinglicomacropéptido (CMP) de la κ -caseína, inhibiendo la agregación de las plaquetas. Esto es debido a la similitud en la estructura y funcionalidad con el dodecapéptido presente en el fibrinógeno humano y el undecapéptido de la κ -caseína bovina (Clare y Swaisgood, 2000).

Péptidos transportadores de calcio

La caseína contiene fosfato que está unido covalentemente vía uniones monoéster a los residuos de serina, el grado de fosforilación depende de la caseína. Estos caseinofosfopéptidos (CPPs) son liberados por proteólisis, la presencia de múltiples residuos de fosfatos los convierten en buenos agentes quelantes de calcio. Los CPPs juegan un papel preponderante en la absorción de calcio en el intestino delgado y su presencia en la cavidad oral promueve la remineralización del esmalte de los dientes (FitzGerald, 1998).

Péptidos con actividad antimicrobiana

Como un complemento al sistema de defensa frente a enfermedades e infecciones bacterianas y virales, se encuentran en la leche y en las secreciones mamarias un grupo de proteínas y péptidos con esta actividad. Este grupo incluye la lactoperoxidasa, la lisozima, la lactoferrina y la lactoferricina. Su acción antimicrobiana puede ser ejercida

tanto en la glándula mamaria como en el tracto gastrointestinal de los lactantes (Sánchez *et al.*, 1992).

Dentro de los péptidos bioactivos del lactosuero hay que destacar el caseinmacropéptido (CMP) que se describe a continuación.

2.4.2 El glicomacropéptido (GMP)

El caseinmacropéptido (CMP) es el fragmento C-terminal liberado por la acción proteolítica de la quimosina sobre la κ -caseína durante la fabricación del queso o por la acción de la pepsina durante el proceso de digestión gástrica. La κ -caseína se hidroliza por el enlace Phe105-Met106, formándose dos polipéptidos muy diferentes: la para-caseína (que comprende los residuos 1-105), ligeramente catiónica a pH 6-7, hidrofóbica y poco soluble, y el CMP (residuos 106-169), fuertemente polar por lo que difunde hacia la fase acuosa, eliminándose durante el desuerado con el suero de quesería (Delfour *et al.*, 1965).

El CMP se halla en concentraciones relativamente elevadas (1,2-1,5 g/L) en los sueros de quesería, lo que supone aproximadamente el 15-20% (p/p) del contenido total de proteínas del lactosuero de vaca (Saito *et al.*, 1991). El CMP es un péptido cuyo punto isoeléctrico se encuentra en torno a 4-5, por lo que se podría decir que tiene un carácter ácido, además de una elevada termoestabilidad y solubilidad. Puede presentar múltiples isoformas ya que puede poseer un gran número de modificaciones post-traduccionales (fosforilación y glicosilación), además de diferentes variantes genéticas, al igual que ocurre con la κ -caseína.

La Ser-149 de la κ -caseína siempre está fosforilada, por lo que todas las moléculas de CMP bovino contienen, al menos, un grupo de fósforo (Rasmussen *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha encontrado CMP-bovino difosforilado en la Ser-127 y trifosforilado, aunque no se ha descrito dónde se produce esta tercera fosforilación (Mollé y Leónil (1995). Las formas mono-, di- y tri-fosforiladas fueron cuantificadas y supusieron un 78%, 20% y 2%, respectivamente.

Por otro lado, las formas glicosiladas representan alrededor del 50% del CMP bovino, y son conocidas bajo el nombre genérico de **glicomacropéptido** (Vreeman *et al.*, 1986). En la κ -caseína bovina se han caracterizado 5 estructuras glicosídicas de tipo-mucina formadas por residuos de ácido siálico, concretamente N-acetil neuramínico (NeuAc),

galactosa (Gal) y N-acetil galactosamina (GalNAc) (Saito y Itoh, 1992), las cuales son descritas a continuación: a) monosacárido GalNAc-O-R, b) disacárido Gal1-3GalNAc-O-R, c) trisacárido NeuAc-2-3 Gal1 3GalNAc-O-R, d) trisacárido Gal1-3(NeuAc-2-6)GalNAc-O-R, e) tetrasacárido NeuAc-2 3Gal1-3(NeuAc-2-6)GalNAc-O-R.

Estos carbohidratos se unen a la cadena peptídica a través de enlaces O-glicosídicos entre la GalNAc y los residuos de Ser o Thr. Los residuos Thr131, Thr133, Thr136 y Thr142 parecen ser los lugares de glicosilación más importantes, aunque también han sido propuestos como lugares potenciales de glicosilación los residuos Thr165, Thr135 y Ser141 (Ribadeau-Dumas y Zevaco, 1984). Más recientemente, se ha procedido a la identificación de los lugares de glicosilación por técnicas proteómicas lo que ha permitido revelar que los principales residuos glicosilados son Thr131, Thr142 y Thr133 (Holland *et al.*, 2004). La microheterogeneidad del CMP a nivel glicosídico depende del número y localización de los glicanos a lo largo de la cadena polipeptídica, según Mollé y Léonil (1995) hay hasta 14 formas glicosiladas diferentes de CMP bovino.

Tal y como han demostrado diferentes estudios de las últimas décadas (Abd El-Salam *et al.*, 1996; Thomä-Worringer *et al.*, 2006), el CMP es un péptido multifuncional con un gran número de posibles funciones biológicas.

2.4.2.1 Bioactividad del glicomacropéptido

Diversos estudios que han abordado la relación estructura-actividad del GMP han determinado la importancia de ciertos aspectos estructurales sobre la función biológica desempeñada. En particular, las bioactividades basadas en las interacciones con componentes celulares están estrechamente relacionadas con el contenido y estructura de los oligosacáridos, mientras que otras actividades que pueden ser ejercidas por pequeños péptidos contenidos en la cadena aminoacídica dependen exclusivamente de la estructura primaria.

El contenido en ácido siálico del GMP es muy determinante en cuanto al tipo de actividad biológica que pueda desarrollar. Hay experimentos *in vivo* realizados en lechones que mostraron que la administración exógena de ácido siálico produjo un aumento en la producción de gangliósidos con ácido siálico en el cerebro, mejorando la capacidad de aprendizaje (Wang *et al.*, 2004). De hecho, este efecto pudo ser también observado tras la inclusión de GMP en la dieta de los animales como fuente de ácido

siálico, y se relacionó con una mayor concentración de sialoglicoproteínas presentes en la corteza cerebral frontal y con unos niveles mayores de RNA mensajero de dos genes implicados en la capacidad de aprendizaje (Wang *et al.*, 2007).

Por otro lado, el GMP también interacciona con toxinas, virus y bacterias, ejerciendo una serie de actividades beneficiosas para la salud mediadas fundamentalmente por la fracción glicosídica. Esto es debido a que un gran número de agentes patógenos y enterotoxinas pueden adherirse a ciertas células tras ser reconocidos por receptores compuestos por oligosacáridos (Dziuba y Minkiewicz, 1996). De este modo, el CMP tiene capacidad para prevenir los desórdenes gastrointestinales causados por patógenos tales como el *Vibrio cholerae*, ya que interacciona con la toxina del cólera, inhibiendo la unión de ésta a los gangliósidos. Esta actividad desapareció cuando fue eliminado el ácido siálico del CMP (Oh *et al.*, 2000). La presencia de ácidos siálicos sobre la superficie de las células diana es necesaria para que se produzca la infección del virus influenza. Sin embargo, la actividad anti-adherente del CMP muestra una fuerte dependencia con el tipo de cepa del patógeno, lo que indica que los resultados obtenidos en este tipo de ensayos pueden estar condicionados por múltiples factores entre los que se incluyen el grado de glicosilación del CMP empleado en los experimentos, así como el uso de diferentes metodologías de ensayo y/o líneas celulares (Rhoades *et al.*, 2005).

Por último, varios estudios *in vivo* han demostrado que el GMP es capaz de mitigar diarreas provocadas por *Escherichia coli* en monos Rhesus, a la vez que facilita un aumento en la absorción de zinc (Brück *et al.*, 2003). Por otra parte, el GMP humano y bovino puede fomentar el crecimiento de bacterias del género *Bifidobacterium*, tales como *B. breve*, *B. bifidum* y *B. infantis* (Metwally *et al.*, 2001). La administración de leche con un 2% de GMP produjo un aumento de *B. lactis in vitro* en comparación con leches no enriquecidas en GMP (Janer *et al.*, 2004). La capacidad del GMP de promover una microbiota intestinal saludable señala su potencial como ingrediente prebiótico en alimentos funcionales, o como suplemento en fórmulas infantiles para simular los efectos bacteriológicos beneficiosos de la leche materna; efectos que pueden ser potenciados dada su capacidad anti-adherente frente a ciertos patógenos descrita anteriormente (Brück *et al.*, 2006).

La potencial utilidad del GMP como un compuesto bioactivo multifuncional está avalada por diversos estudios que han detectado la presencia de los CMPs bovino y humano en concentraciones fisiológicamente activas en el plasma sanguíneo de recién

nacidos y adultos (Chabance *et al.*, 1995). En este sentido, varios estudios *in vivo* han mostrado que el CMP es liberado intacto en el estómago y sólo sufre hidrólisis parciales tras la acción de las enzimas pancreáticas, aunque el nivel de proteólisis puede variar en función del grado de glicosilación (Boutrou *et al.*, 2008)

2.5 *Cronobacter sakazakii*

Las especies de *Cronobacter* son bacterias Gram-negativas, móviles, anaeróbicas facultativas, oxidasa-negativas, catalasa-positivas y en forma de bastón que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (Strydom *et al.*, 2012). No pueden causar enfermedades infecciosas cuando son ingeridas por adultos sanos, pero representan un riesgo muy alto para los recién nacidos y los individuos inmunodeprimidos (Healy *et al.*, 2010). Estos organismos pueden afectar el sistema nervioso central humano, y los supervivientes a menudo sufren de deficiencias neurológicas severas después de la infección, incluyendo hidrocefalia, tetraplejia y retrasos en el desarrollo (Strydom *et al.*, 2012).

El mecanismo de infección de *Cronobacter sakazakii*, se basa en un daño tisular del epitelio para atravesar la barrera intestinal y llegar así al sistema circulatorio. No obstante, es una bacteria que necesita de un cuerpo celular para llevar a cabo su multiplicación (Kim *et al.*, 2010). Se relaciona con infecciones potencialmente mortales como meningitis, enterocolitis y septicemia en neonatos y lactantes (Iversen *et al.*, 2008). Las especies de *Cronobacter* se han aislado no solo de alimentos y productos vegetales como cereales, frutas y verduras, legumbres, hierbas y especias, sino también de alimentos de origen animal como leche, carne, pescado y productos elaborados a partir de estos alimentos (Lee *et al.*, 2012). Las fórmulas en polvo para lactantes (PIF, del nombre en inglés, powder infant formula) son la única fuente alimentaria que se ha relacionado epidemiológicamente con brotes de las especies de *Cronobacter* (FAO, 2004). Varios estudios han relacionado la rehidratación de los preparados en polvo para lactantes y su preparación en el hospital con la transmisión de la infección por *Cronobacter* (Acker *et al.*, 2001).

Cronobacter sakazakii es capaz de resistir durante años en alimentos deshidratados, como es el caso de las PIF. Por ello, el Reglamento (CE) N° 2073/2005 establece la ausencia en 10 g de *Enterobacter sakazakii* en preparados deshidratados para lactantes y en alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes de menos de 6 meses.

3. Justificación y objetivos

El presente estudio se ha planteado con el objetivo de darle un uso diferente al lactosuero, un subproducto que se produce en grandes cantidades y además es un problema por su gran capacidad contaminante.

El principal objetivo de este trabajo ha sido evaluar la obtención del glicomacropéptido (GMP) a partir de diferentes lactosueros, procedentes de dos tipos de coagulación enzimática: con cuajo natural y con cuajo microbiano. Además, también se ha evaluado la obtención de GMP a partir del suero resultante de la elaboración de requesón.

El segundo objetivo del trabajo ha sido evaluar la posible actividad antimicrobiana de los diferentes tipos de glicomacropéptido obtenidos frente al patógeno emergente *Cronobacter sakazakii*.

4. Material y métodos

4.1. Origen de los subproductos lácteos

Para llevar a cabo el aislamiento de GMP, se partió de cinco subproductos lácteos diferentes. Tres de ellos fueron de origen industrial suministrados por la empresa aragonesa Villacorona S.A.-Quesos “el burgo” (Burgo de Ebro, Zaragoza): lactosuero procedente de la elaboración de queso fresco burguitos, lactosuero industrial de la elaboración de queso fresco “el burgo” y suero resultante de la elaboración de requesón. Los otros dos subproductos fueron obtenidos en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza ubicada en la Facultad de Veterinaria, mediante coagulación enzimática con cuajo natural, siguiendo las mismas condiciones que en la elaboración de queso fresco “el burgo” y utilizando leche de vaca pasteurizada suministrada por la misma empresa Villacorona y lactosuero ovino obtenido de la coagulación enzimática de leche de oveja.



Figura 3. Imagen de los distintos lactosueros utilizados en este estudio.

El lactosuero que llamaremos burguitos es el suero resultante de la elaboración de queso fresco tradicional, denominado burguitos por la empresa de 125 g. Este queso se elabora a partir de leche pasteurizada ($88^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$), a la que se añaden 570 mL de cloruro cálcico, 470 g de sorbato potásico, 870 g de cloruro sódico y 240 mL de cuajo microbiano por cada 1000 L de leche. Se lleva a cabo el cuajado de la leche durante 20 minutos a 29°C y se procede con el corte hasta dejar el grano en el tamaño de un grano de maíz. Una vez realizado el corte, se procede a la agitación durante 10-15 min y a un incremento de la temperatura de 2°C , es decir, se aumenta a 31°C .

El lactosuero que llamaremos “el burgo” es el suero resultante de la elaboración del queso fresco con sal de 2 Kg denominado “el burgo” por la empresa. La elaboración del mismo, se hace a partir de leche pasteurizada ($88^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$), a la que se añaden 570 mL de cloruro cálcico, 470 g de sorbato potásico, 6 Kg de cloruro sódico y 240 mL de cuajo microbiano por cada 1000 L de leche. Se lleva a cabo el cuajado de la leche durante 25 minutos a 32°C y se procede con el corte hasta dejar el grano en el tamaño de un grano de maíz. Una vez realizado el corte, se procede a la agitación durante 10-15 min, incrementando la temperatura en 2°C , pasando de 32°C a 34°C .

El suero de requesón es el resultante de la elaboración de dicho producto, que se elabora a partir de una mezcla de un 90% de lactosuero burguitos y un 10% de leche pasteurizada ($88^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$). Una vez mezclados ambos, la temperatura se eleva a 98°C y se añade cloruro cálcico para favorecer la desnaturalización y floculación de las proteínas hacia la superficie. Estas se van recogiendo con un recipiente llamado requesonera y el líquido resultante se recoge y se considera como suero de requesón.

El lactosuero “el burgo” es el suero resultante de la elaboración de queso fresco burgo en la citada planta piloto con cuajo natural, a partir de leche pasteurizada ($88^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$). Dicha elaboración se llevó a cabo siguiendo los parámetros y condiciones de

elaboración del queso fresco “el burgo”, salvo la sustitución del cuajo microbiano por cuajo natural.

El lactosuero ovino es el suero resultante de la elaboración de queso fresco de oveja en la planta piloto. Dicha elaboración se llevó a cabo por coagulación con cuajo natural y a una temperatura de 34°C, subiendo la temperatura a 38°C y agitando durante unos minutos tras el corte de la cuajada.

Todos estos lactosueros se almacenaron durante la duración del estudio o bien en refrigeración, añadiendo azida sódica, para evitar una multiplicación de los microorganismos presentes, o bien en congelación a -20°C.

4.2. Procedimientos para la obtención del glicomacropéptido (GMP)

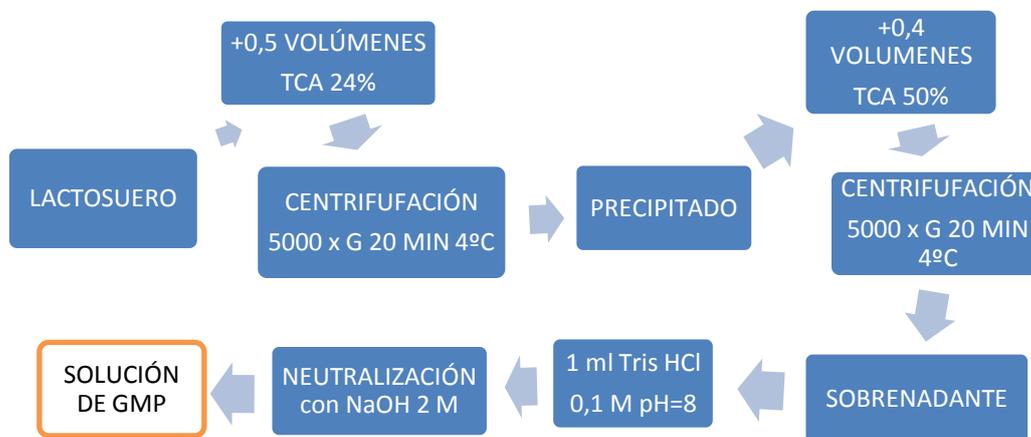
Los procedimientos que se han utilizado en este trabajo para la obtención de GMP han sido fundamentalmente dos.

El primer método se fundamenta en la precipitación de las proteínas mediante acidificación y tratamiento térmico y está basado en los trabajos de Martín-Diana *et al.* (2001) y Abd El-Salam *et al.* (2006). Para ello, se tomó un volumen de 500 mL de cada uno de los lactosueros indicados anteriormente y se acidificó añadiendo lentamente y con agitación una solución de HCL 0,1 N hasta un pH de 3,5. A continuación, se aplicó un tratamiento térmico de 90°C durante 1 h en baño termostático, con el objetivo de desnaturalizar las proteínas presentes, dado que el GMP no se ve afectado debido a su elevada termorresistencia. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, se dejó atemperar durante unos minutos al baño con agua fría, y se repartió en tubos de centrífuga de 50 mL que se centrifugaron a 5000 x g durante 15 min a 4°C. Posteriormente, se separó con mucho cuidado el precipitado de las proteínas formado, del sobrenadante que contiene el GMP. A continuación, se concentró el sobrenadante por ultrafiltración con una célula de ultrafiltración con una membrana de 3,5 KDa en un equipo de ultrafiltración marca (Amicon, Beverly, EE.UU.) hasta tener una concentración 10 veces superior a la inicial. En algunos casos, el sobrenadante se sometió a liofilización, para tener el GMP en sólido.

El segundo método utilizado para el aislamiento de GMP se fundamenta en la precipitación de proteínas mediante ácido tricloroacético (TCA). Para este procedimiento existen dos opciones diferentes para llevarlo a cabo.

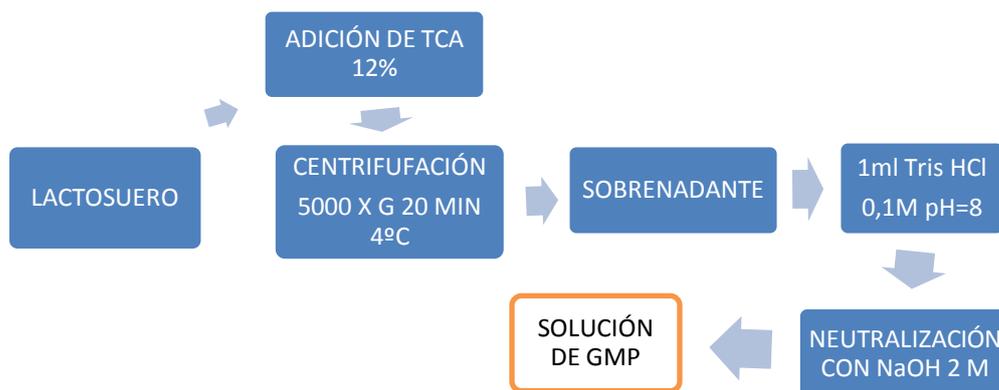
Opción 1: está basada en el estudio de (Chavez-Vela *et al.*, 2012) y consistió en la precipitación de las proteínas del lactosuero con 0,5 volúmenes de TCA al 24%, tras la cual se hizo una centrifugación a 5000 x g durante 20 min a 4°C y se separó con cuidado el sobrenadante del precipitado. El sobrenadante obtenido se volvió a precipitar con TCA, esta vez con 0,4 volúmenes de TCA al 50% para conseguir así la precipitación del GMP. Posteriormente, se centrifugó de nuevo con las mismas condiciones anteriormente mencionadas y se separó con cuidado el precipitado del sobrenadante. El precipitado se resuspendió con 1 mL de Tris-HCl 75 mM, pH 8 y se neutralizó con NaOH 2 M.

Esquema del aislamiento de GMP mediante precipitación con TCA según la opción 1:



OPCION 2: está basada en el estudio de (Li y Mine, 2004) y consistió en la precipitación de las muestras de lactosuero con TCA al 12% con el objetivo de desnaturalizar las proteínas. Seguidamente, se centrifugó a 5000 x g durante 10 min y se separó el sobrenadante del precipitado; obteniendo así una fracción enriquecida en GMP. Esta última fracción se neutralizó con NaOH 2 M para obtener una solución con pH neutro.

Esquema de obtención de GMP mediante la opción 2 basada en la precipitación con TCA:



4.3 Determinación de proteína por BCA

Este procedimiento se lleva a cabo utilizando un kit diseñado para la cuantificación de proteínas totales. Se basa en el uso del ácido bicinónico (BCA), el cual genera una reacción colorimétrica cuantificable a 562 nm. El kit está formado por dos reactivos, el reactivo A (carbonato y bicarbonato de sodio, tartrato de sodio y ácido bicinoninico) y el reactivo B (4% de sulfato cúprico) los cuales se mezclan en una proporción 50:1 para formar el reactivo WR (*working reagent*). Además, se preparan unos estándares de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones de 5-250 $\mu\text{g/mL}$. Con los estándares de BSA se realiza una curva patrón a partir de la cual sacaremos las concentraciones de proteína de las muestras problema.

Se utiliza una placa de microensayo de 96 pocillos en la que se introducen los 20 μl de los estándares y de las muestras (por duplicado) y 200 μl del reactivo WR en cada pocillo. Después se lleva a incubar durante 30 minutos a una temperatura de 37°C, tiempo tras el cual, se lee la absorbancia de la placa a una longitud de onda de 562 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia). La absorbancia se relaciona con los valores de concentración correspondientes a los estándares, representando así la curva patrón y pudiendo calcular mediante la ecuación de la recta la cantidad de proteína que tenemos en la muestra.

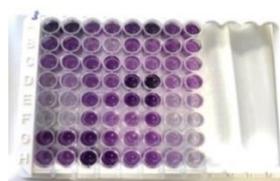


Figura 4. Ejemplo de un ensayo de cuantificación proteica por el método del BCA

4.4 Análisis de las fracciones de GMP por electroforesis en SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis es una técnica utilizada principalmente para separar ADN, ARN, o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica. Para ello, se utiliza una corriente eléctrica que mueve las moléculas y las separa a través de un gel. Los poros del gel actúan como un tamiz, permitiendo que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las grandes. En este caso, la electroforesis por SDS consiste en la separación de las proteínas en un campo eléctrico, el cual va a provocar la movilidad de la proteína en base a su tamaño, puesto que el SDS les confiere a todas las proteínas la misma densidad de carga. De esta manera, se consigue que el movimiento de la proteína en el soporte sólido (gel) por acción del campo eléctrico sea exclusivamente proporcional a su peso molecular.

El procedimiento que se aplica se fundamenta en el protocolo descrito por Laemmli (1970) y se realiza en geles Mini-Protean 4-20% con 15 pocillos de la marca BIO-RAD Laboratories (Hercules, EE.UU.).

Se comenzó preparando todas las muestras que se desean analizar en el gel de la electroforesis, para lo cual se diluyen las muestras con agua miliQ a la concentración de GMP deseada. Seguidamente, se preparó el tampón mezclando el tampón compuesto por Tris-HCl 126 mM, pH 6,8, con 4% de SDS, 0,02% de azul de bromofenol, 20% de glicerol y 10% de 2-mercaptoetanol.

Después, se mezclaron las muestras a analizar con dicho tampón en una proporción 1:1, añadiendo 20 μ L de cada uno a viales eppendorfs de 0,5 ml. Estos viales se llevaron a baño maría a 100°C durante 5 min. A continuación, las muestras (en un volumen de 15 μ l) y el patrón de pesos moleculares (5 μ l) (magic marker marca GE Healthcare Buckinghamshire, Reino Unido) se cargaron en los pocillos del gel con puntas de pipeta de lengua de gato y se aplicó un voltaje de 180 V utilizando un equipo Mini Protein Tetra Cell (BIO-RAD) y una fuente de electroforesis.

La electroforesis concluye cuando las muestras han recorrido todo el gel, que se visualiza con el frente marcado con el azul de bromofenol que contiene el tampón.

Tras la electroforesis, se llevó a cabo la tinción del gel con dos métodos diferentes: tinción PAS y tinción con Azul de Comassie R.

4.5 Tinción PAS (Periodic Acid-Schiff)

Consiste en oxidar las bandas de proteína mediante el ácido peryódico para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas) presentes en ellos. Posteriormente, se trata la muestra con el reactivo de Schiff (PanReac, Barcelona, España) que reacciona con dos grupos aldehídicos contiguos dando lugar a una coloración rojo-púrpura característica. De esta manera nos permite identificar las glicoproteínas en la muestra.

En primer lugar, el gel se sumerge en un tampón de fijación compuesto por ácido acético, metanol y agua destilada en una proporción 10:35:55 (v:v:v) respectivamente, y se incuba a temperatura ambiente sin agitación toda una noche.

Al día siguiente, se preparan las siguientes soluciones: 200 mL de ácido acético al 5% y a partir de esta se prepara una solución de ácido periódico disolviendo 0,35 g en 50 mL de ácido acético al 5% y otra de meta-bisulfito sódico disolviendo 0,2 g en 100 mL de ácido acético al 5%. Seguidamente, se sustituyó la solución de fijación por la solución de ácido periódico y se incubó 1 h con agitación a temperatura ambiente; Después, se lavó el gel con agua miliQ y se añadieron 50 ml de la solución de meta-bisulfito sódico hasta que cambió de color, al amarillo, se retiró dicha solución y se volvieron a añadir otros 50 mL de la misma solución manteniendo la agitación durante 10 min. A continuación, se le añadió el reactivo de Schiff y se dejó en incubación y agitación a temperatura ambiente durante 2 h. El reactivo de Schiff está compuesto por 4 g de pararosalina, 800 mL de agua miliQ, 80 mL de HCl 0,1 M, 6,8 g disulfito sódico y 10 g de carbón activo.

Finalmente, se eliminó la solución de Schiff y se añadieron 50 mL de tampón de fijación durante 7 min, se eliminaron y se añadieron otros 50 mL durante otros 7 min; la misma operación pero con solución de decoloración (ácido acético y agua).

En este punto se llevó a escanear el gel y se continuó con la tinción Coomassie.

4.6 Tinción con Azul de Coomassie

Una vez escaneado el gel con los resultados del PAS, se tiñó con una solución azul de Coomassie R formada por 300 mL de metanol, 80 mL de ácido acético, 20 mL de glicerina y 650 mL de agua destilada durante 1 h en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente, tras eliminar el colorante el gel se sumergió en una solución de decolorante compuesta por 250 mL de metanol, 80 mL de ácido acético, 20 mL de glicerina y 650

mL de agua destilada, hasta que desapareció el azul del gel y solo quedaron teñidas las bandas de péptidos y proteínas.

Al igual que en la tinción PAS, en este momento se llevó el gel al escáner y se registraron los datos de la electroforesis.

4.7 Concentración de las soluciones de GMP por liofilización

La liofilización se basa en sublimar el hielo de un producto congelado. El agua del producto pasa, por tanto, directamente de estado sólido a vapor sin pasar por el estado líquido, para lo cual se debe trabajar por debajo del punto triple del agua, 0,01°C y 4,5 mmHg.

Por ello, se colocaron las soluciones de GMP aislado de los diferentes lactosueros en recipientes de 100 mL, los cuales poseían una serie de agujeros en la tapa que permitían que se realizara correctamente la sublimación.

Se llevó a cabo en un liofilizador modelo DW8 marca Heto Holten (Dinamarca)

4.8 Detección del GMP por inmunocromatografía

Se utilizó este ensayo para determinar si hay presencia de GMP en la muestra mediante el kit comercial STICK cGMP cedido amablemente por la empresa de biotecnología OPERON (Cuarte de Huerva, Zaragoza). El test de cGMP es un test rápido inmunocromatográfico para la detección cualitativa de GMP en leche. Este test es muy sensible, capaz de detectar hasta una concentración de 1% de GMP. Está compuesto por una solución tampón en la que se diluye la muestra y por unas tiras de reacción cromatográficas (stick cGMP).

Este test se basa en que el cGMP que pudiera estar presente en la muestra reacciona con las partículas coloidales coloreadas que están recubiertas de anticuerpos monoclonales específicos frente al GMP. Este complejo migra por un proceso cromatográfico por la zona de reacción. En esta zona hay otros anticuerpos anti-GMP inmovilizados que reaccionan con el complejo dando lugar a la formación de una raya roja, la cual indica que la muestra es positiva en GMP. Además, hay también unos anti-anticuerpos monoclonales que sirven de control para asegurar que el test ha funcionado correctamente dando lugar a una segunda banda por encima de la anterior.

Para la preparación de las muestras de los aislados de GMP, estos se diluyeron con el tampón del kit hasta una dilución 1/4000.

4.9 Ensayo de actividad antimicrobiana del GMP frente a *Cronobacter sakazakii*

Para este ensayo se siguieron una serie de pasos que se detallan a continuación:

- 1- Aislamiento de *Cronobacter sakazakii*: se parte de una cepa comercial la CECT 853, de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). La cepa se encuentra en unos crioviales almacenados a -70°C . Para proceder al aislamiento se cogió una bolita con el asa de siembra y se inoculó en un tubo con 10 mL de PBS (previamente esterilizado y atemperado), que se llevó a incubación a 37°C durante 24 h. Al día siguiente, una vez comprobada turbidez en el medio líquido debido al crecimiento de la bacteria, se realizó una siembra por agotamiento (con un asa de siembra), con el objetivo de obtener colonias aisladas de *Cronobacter sakazakii*.
- 2- Se cogió una de las colonias aisladas de *Cronobacter sakazakii* con un asa de siembra, se inoculó en 10 mL del medio líquido TSB (caldo de soja y triptona). y se llevó a incubar a 37°C durante 18-20 h. En ese tiempo, se consiguió tener una suspensión bacteriana de una concentración de 10^8 ufc/mL.
- 3- Una vez pasado el tiempo de incubación, el tubo con la suspensión bacteriana se agitó en un vórtex y se llevó a centrifugar a $5000 \times g$ durante 10 min. Una vez finalizada la centrifugación se eliminó el líquido sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 10 ml de agua de peptona tamponada. A partir de esta suspensión se hicieron dos diluciones seriadas 1/100 añadiendo 100 μl de la suspensión bacteriana en 10 ml de agua de peptona. Se obtuvo así, una suspensión con una concentración final de 10^4 ufc/mL, que se utilizó en el ensayo antibacteriano que se describe a continuación.
- 4- Para la evaluación de la actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii*, se prepararon las muestras de GMP. Para ello se disolvieron 40 mg de GMP liofilizado, procedente de los distintos lactosueros y procedimientos de aislamiento, en 2 ml de PBS, se homogenizaron bien y se pasaron por un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ para eliminar la carga microbiana en un ambiente de esterilidad en campana de flujo laminar modelo PV-30/70 marca Telstar (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) y con material estéril. Seguidamente, se realizaron las diluciones de la solución ajustando la concentración de GMP determinada por el método del BCA, a las concentraciones seleccionadas para evaluar su actividad antibacteriana.

- 5- Finalmente, se sembraron en una placa de micro ensayo de 96 pocillos, 100 μ l de la suspensión bacteriana y 100 μ l de las distintas muestras con GMP, por pocillo, además de dos controles. En uno de los controles se añadió lactoferrina comercial de Tatura Nutritionals (Nueva Zelanda), ya que se ha comprobado previamente en el grupo de investigación su acción antibacteriana frente a este microorganismo, y otro control en el que se añadieron 100 μ l de agua de peptona y 100 μ l de la suspensión bacteriana. En la placa se sembraron las filas alternas, dejando así una fila sin sembrar entre cada muestra. Se sembraron dos series de muestras para poder hacer posteriormente una siembra en placa, a las 4 h y a las 24 h de incubación 37°C (en ambos casos se realizó la siembra por duplicado).
- 6- Tras la incubación de las muestras en la placa de microensayo, se procedió a realizar una siembra en superficie en agar TCA (agar soja triptona). Se realizó por duplicado y a distintas diluciones (10^{-3} y 10^{-4}), para asegurar un posterior recuento de manera correcta pasadas las 4 h. Las muestras incubadas durante 24 h se sembraron a las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} para poder realizar el recuento correctamente. La placa se dividió por la mitad y se añadieron 50 μ l de cada dilución que se extendieron con el asa de Digralsky. A las 24 h de incubación a 37°C se realizó el recuento de las colonias.



Figura 5. Colonias de *Cronobacter sakazakii* en Agar Triptona Soja.

5. Resultados y discusión

5.1 Aislamiento y caracterización del GMP

El aislamiento de GMP se llevó a cabo mediante dos técnicas como se ha descrito en la sección anterior, mediante un tratamiento térmico y mediante adición de TCA, partiendo de cinco lactosueros diferentes: lactosuero burguitos, lactosuero “el burgo”, lactosuero requesón, lactosuero cuajo natural y lactosuero ovino. Para evaluar la efectividad en el aislamiento por ambas técnicas se realizaron una serie de pruebas

cuantitativas y cualitativas. En primer lugar, se realizaron electroforesis con SDS de todas las muestras, tanto de las muestras aisladas mediante TCA como por tratamiento térmico.

5.2 Electroforesis con SDS

Se llevaron a cabo electroforesis de los aislados, para comprobar la presencia de GMP. Según Mollé y Leonil, (2005) los monómeros que conforman el GMP, pueden tener distinto peso molecular, entre 6500 Da cuando no está nada glicosilado y 9500 Da cuando está altamente glicosilado. Y estos monómeros pueden agruparse dando lugar a polímeros superiores como dímeros, trímeros, etc., lo cual depende en gran medida del pH.

Se realizó una tinción con azul de Coomasie en la que tratamos de identificar las bandas correspondientes a los pesos moleculares anteriores y una tinción PAS con el objetivo de ver si las fracciones aisladas del GMP estaban glicosiladas.

En la primera electroforesis, se realizó una tinción con azul de Coomasie con el objetivo de observar si había diferencias entre las muestras aisladas con los dos métodos de precipitación con TCA.

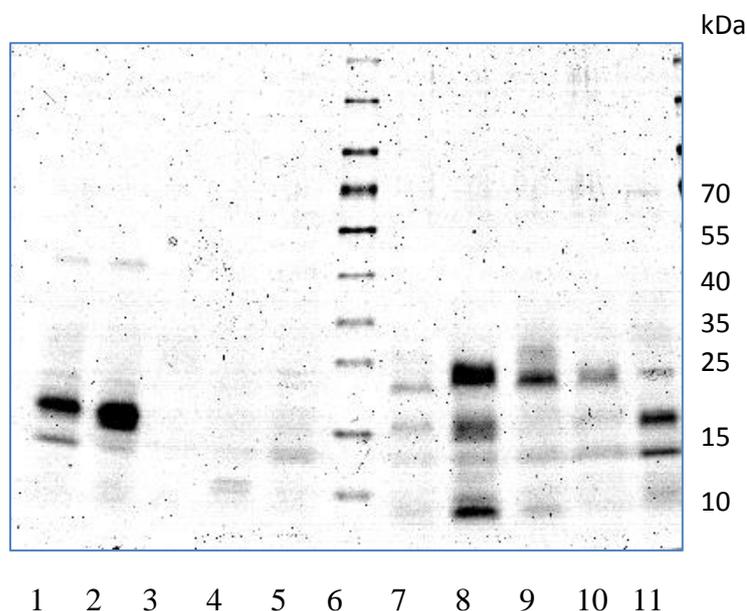


Figura 6. *Electroforesis con SDS en gel de 4-20% de poliacrilamida. Las muestras ordenadas de izquierda a derecha son las siguientes: 1. Burguitos TCA 12%; 2. “el burgo” TCA 12%; 3. Requesón TCA 12%; 4. Cuajo natural TCA 12%; 5. Ovino TCA 12%; 6. Patrón de pesos moleculares; 7. Burguitos TCA 50%; 8. “el burgo” TCA 50%; 9. Requesón TCA 50%; 10. Cuajo natural TCA 50%; 11. Ovino TCA 50%. Tinción con azul de Coomasie.*

En las muestras de aislados por precipitación con TCA al 50%, en la carrera 8 principalmente, se pueden observar los tres polímeros del GMP. En primer lugar podemos observar un monómero en torno a los 8 kDa, en segundo lugar podemos ver el dímero en torno a 16 kDa y finalmente el trímero de 24 kDa. También se encuentra en algunos casos una línea por debajo de 15 kDa que podría corresponderse a un dímero formado por dos monómeros de 7 kDa, ya que no siempre todos los monómeros tienen el mismo peso molecular, aunque normalmente oscila entre los 6-8 kDa. En las muestras obtenidas por precipitación con TCA al 12% también se puede observar en la primera y segunda carrera dímeros de GMP.

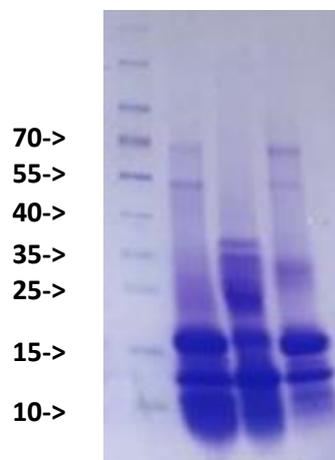


Figura 7. Electroforesis con SDS en gel de 4-20% de poliacrilamida. Las muestras ordenadas de izquierda a derecha son las siguientes 1. Patrón de pesos moleculares; 2. Liofilizado Burguitos TT; 3. Liofilizado “el burgo” TT; 4. liofilizado requesón TT. Tinción con azul de Coomasie.

En las tres muestras podemos observar dos bandas de mayor concentración en 12-13 kDa y en 18-19 kDa. Estos podrían corresponderse con dímeros y trímeros del GMP. Formados por monómeros de 6-7 kDa.

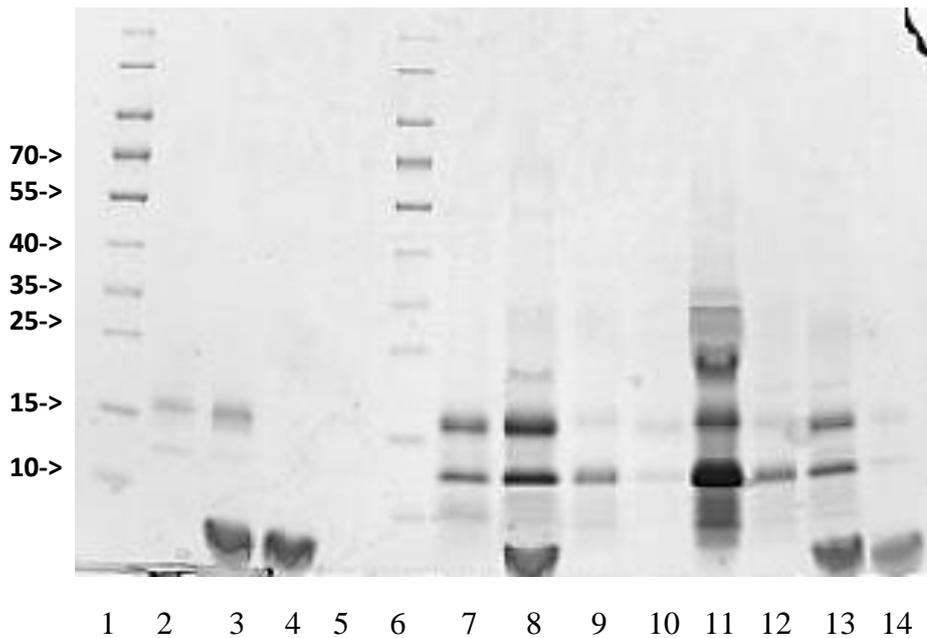


Figura 8: *Electroforesis con SDS en gel de 4-20% de poliacrilamida. Las muestras ordenadas de izquierda a derecha son las siguientes: 1. Patrón de pesos moleculares; 2. Burguitos TCA; 3. “el burgo” TCA; 4. Requesón TCA; 5. Cuajo Natural TCA; 6. Patrón de pesos moleculares; 7. Burguitos TT; 8. “el burgo” TT; 9. Requesón TT; 10. Cuajo Natural TT; 11. Requeson TT filtrado; 12. Requesón TT filtrado; 13. Cuajo Natural TT filtrado; 14. Cuajo natural TT filtrado. Tinción con azul de Coomasie.*

En esta electroforesis se comparan los aislados de GMP por precipitación con TCA al 12% y con tratamiento térmico. En las cuatro muestras correspondientes a los aislados con precipitación con TCA al 12% solo podemos ver bandas en las dos primeras muestras. Las cuales se encuentra una banda visible en torno a 16 kDa que podría ser un dímero de GMP. También se puede visualizar una banda más fina de 13 kDa que podría ser un dímero más pequeño de GMP.

En las columnas que van de la 7 a la 10 ambas incluidas, correspondientes con las muestras aisladas mediante tratamiento térmico, podemos observar dos bandas donde la concentración es claramente mayor. Estas bandas se encuentran al igual que en el caso anterior en torno a 16 kDa y 13 kDa pudiendo ser ambas bandas dos dímeros de diferente peso molecular del GMP. Además de estas dos bandas, en la columna 8 podemos ver lo una banda en 23-24 kDa que podría ser un trímero de GMP.

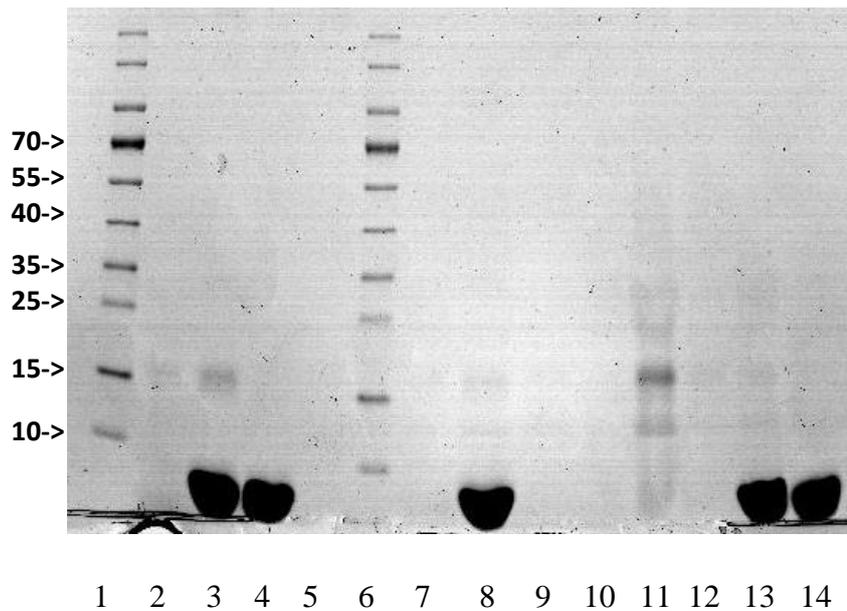


Figura 9: *Electroforesis con SDS en gel de 4-20% de poliacrilamida. Las muestras ordenadas de izquierda a derecha son las siguientes: 1. Patrón de pesos moleculares; 2. Burguitos TCA; 3. “el burgo” TCA; 4. Requesón TCA; 5. Cuajo Natural TCA; 6. Patrón de pesos moleculares; 7. Burguitos TT; 8. “el burgo” TT; 9. Requesón TT; 10. Cuajo Natural TT; 11. Requesón TT filtrado; 12. Requesón TT filtrado (1/10); 13. Cuajo Natural TT filtrado; 14. Cuajo natural TT filtrado (1/10). Tinción PAS.*

En la electroforesis de la Figura 9, se puede observar perfectamente los glicanos del GMP en los aislados obtenidos por precipitación con TCA al 12% provenientes de lactosuero “el burgo” y lactosuero requesón (carreras 2 y 3). En segundo lugar, se pueden observar teñidos los glicanos en el aislado por tratamiento térmico proveniente de lactosuero “el burgo” (carrera 8). Y finalmente se pueden observar teñidos los glicanos en los aislados por tratamiento térmico provenientes de lactosuero de cuajo natural previamente filtrado por un filtro de 0,22 μm (carreras 13 y 14).

Además se pueden observar en el burguitos TCA (carrera 2), “el burgo” TCA (carrera 3) y requesón TT filtrado (carrera 11) unas bandas mucho más finas en torno a 15-16 kDa que podrían corresponder con dímeros glicosilados. En este último habría también un dímero de menor tamaño glicosilado que correspondería con la banda entre 10-15 kDa.

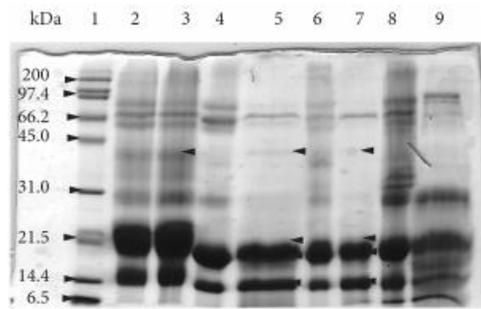


Figure 1. SDS-PAGE of sweet, commercial and acid whey and their supernatants obtained by heating at 90 °C. In pockets can be observed 1: BIORAD Wide range standard; 2: Commercial whey (10 µg); 3: Commercial whey supernatant (10 µg); 4: Sweet whey (10 µg); 5: Sweet whey supernatant (10 µg) 6: Concentrated sweet whey; 7: Concentrated sweet whey supernatant (10 µg); 8: Acid whey (10 µg); 9: Acid whey supernatant (10 µg).

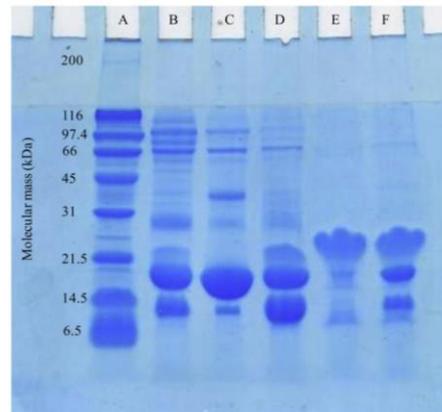


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of: A) Molecular mass protein standards, B) whey protein isolate (WPI; Arla Foods Ingredients), C) β-Ig (Davisco Foods International), D) α-La (Arla Foods Ingredients), E) A CMP and F) B CMP.

Figura 10 y 11. La imagen de la izquierda (Figura 10) corresponde con un estudio de (Rojas et al., 2013) y la imagen de la derecha (Figura 11) corresponde con un estudio de (Farias et al., 2010).

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, como se muestran en las Figuras 10 y 11, podemos ver como en la Figura 10, el GMP se encuentra en forma de dímero en torno a 15-16 kDa, en forma de trímero en torno a 21-22 kDa y en forma de pentámero de 40 kDa (en menor concentración). Y en la figura 11, en las columnas E y F referentes a CMP, podemos observar una banda en torno a 14-15 kDa, que vendría a ser el dímero y otra en torno a 20-21 kDa, que se correspondería con el trímero. Estos resultados son bastante similares a los resultados obtenidos en el análisis por electroforesis de las fracciones aisladas en nuestro estudio, con la diferencia de que los monómeros que conforman su polímero de GMP tienen un peso molecular superior al nuestro.

5.3 Detección de GMP mediante kit inmunocromatográfico

En segundo lugar, se hizo un análisis inmunocromatográfico, mediante el kit comercial STICK cGMP, para determinar la presencia de GMP en los aislados y de esta manera asegurarnos de que el aislamiento se estaba produciendo correctamente. Se aplicó el kit en los aislados de GMP de todos los tipos de lactosuero y también sobre el sobrenadante de dichos aislados, para comprobar si se estaba perdiendo GMP.

Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 4. Resultados del test inmunocromatográfico en cada uno de los aislados tanto por tratamiento térmico como por precipitación con TCA.

	Aislado TCA	Aislado TT	Sobrenadante TCA	Sobrenadante TT
Burguitos	+	+		
“el burgo”	+	+	+	+
Requesón	+	+		
Cuajo Natural	+	+		
Ovino	-	-	-	-

En vista de los resultados podemos concluir que el aislamiento de GMP de los diferentes lactosueros se efectuó correctamente. Aunque puede ser que se perdiera una pequeña parte de GMP en el proceso, dado que algunos sobrenadantes dieron un resultado positivo.

Por otro lado, se puede concluir que el kit no sirve cuando se trata de lactosuero ovino, ya que no es capaz de detectar GMP ni en el aislado ni el sobrenadante del mismo, probablemente a que no hay reacción cruzada entre los anticuerpos frente a GMP bovino y el GMP ovino.

5.4 Cuantificación de proteína en los aislados de GMP por BCA

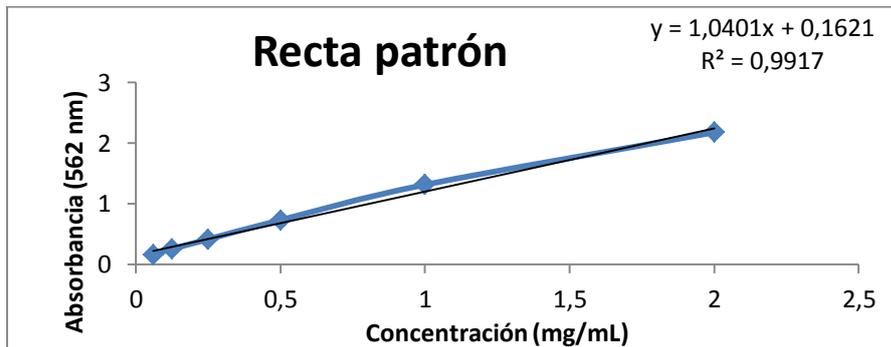
Para conocer la cantidad de GMP que se estaba aislando con cada procedimiento se utilizó la prueba del BCA.

Se realizó este análisis con los dos tipos de aislados, tanto los obtenidos por precipitación con TCA, como los obtenidos por tratamiento térmico procedentes de todos los tipos de lactosuero (salvo lactosuero “el burgo” y ovino). Con el objetivo de determinar de forma cuantitativa la cantidad de proteína en los distintos aislados, y de esta manera poder probar posteriormente la capacidad antimicrobiana del GMP a diferentes concentraciones.

A través de las concentraciones de los estándares de albúmina y su absorbancia, sacamos una recta patrón en la que interpolamos las absorbancias de las muestras de aislado de GMP para conocer así su concentración proteica.

CONCENTRACIÓN (mg/mL)	ABS 1	ABS 2	MEDIA
2	2,125	2,103	2,114
1	1,191	1,254	1,223
0,5	0,668	0,683	0,676
0,25	0,393	0,396	0,395
0,125	0,228	0,238	0,233
0,06	0,150	0,149	0,150

A partir de los datos anteriores, obtenemos la recta patrón, donde interpolamos y obtenemos de forma cuantitativa la cantidad de proteína de las muestras.



Interpolando las distintas absorbancias de las muestras de aislado de GMP obtenemos los siguientes resultados de concentración proteica:

Tabla 5. *Concentración proteica según tipo de aislamiento y lactosuero de procedencia. Todas las muestras proceden de las fracciones de GMP liofilizadas, resuspendidas en agua destilada en una concentración de 1 mg/mL.*

MUESTRA DE AISLADO DE GMP	CONCENTRACIÓN (mg/mL)
BURQUITOS TT FILTRADO	5,45
BURQUITOS TCA FILTRADO	0,16
REQUESÓN TT	6,54
REQUESÓN TT FILTRADO	7,45
REQUESÓN TCA FILTRADO	0,67
CUAJO NATURAL TT	1,25
CUAJO NATURAL TT FILTRADO	1,08
CUAJO NATURAL TCA FILTRADO	0,7

En base a estos resultados podemos observar dos cuestiones, por un lado los liofilizados de aislados de GMP por tratamiento térmico, tienen una mayor concentración de proteínas.

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

El ensayo de actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii* se realizó con aislados de GMP de los distintos tipos de lactosueros de partida (salvo lactosuero “el burgo” y ovino). Se incluyeron en los ensayos tanto los aislados por precipitación con 12% de TCA y posterior liofilización, como los aislados por tratamiento térmico y posterior liofilización. Posteriormente, mediante una siembra en superficie a partir de las suspensiones bacterianas incubadas 4 y 24 h con las muestras de GMP, se evaluó si la adición de GMP había influido en el crecimiento de *Cronobacter sakazakii*, en comparación con el control.

En la mayoría de ensayos no se pudo hacer un recuento a las 24 h debido a que el número de colonias de *C. sakazakii* era tan elevado en la placa que imposibilitaba el recuento.

Tabla 6. *Tabla combinada de los resultados de los ensayos antibacterianos frente a C. sakazakii. En ellas se puede ver el efecto que tiene la adición de distintas concentraciones de GMP sobre C. sakazakii (u.f.c/ ml). Se incluyó un control negativo solo con la bacteria. Además, se incluyó como control positivo de actividad antibacteriana lactoferrina bovina (LF), en una concentración de 10 mg/ml.*

BURQUITOS TT 4 H		BURQUITOS TCA 4 H		BURQUITOS TT 4 H	
Control	5,29E+07	Control	2,95E+07	Control	7,30E+06
0,7	1,07E+08	0,006	2,60E+07	0,06	1,05E+07
1,35	1,04E+08	0,0125	4,57E+07	0,125	1,27E+07
2,7	1,33E+08	0,025	6,34E+07		
LF	0	0,05	8,80E+06		
		LF	0		

REQUESÓN TCA 4 H		CUAJO NATURAL TCA 4 H		CUAJO NATURAL TT 4 H	
Control	2,30E+06	Control	6,73E+06	Control	1,07E+07
0,075	3,92E+06	0,06	7,69E+06	0,06	1,51E+07
0,152	7,62E+06	0,125	6,81E+06	0,125	2,56E+07
0,35	4,48E+06	0,25	7,93E+06	0,25	2,27E+07

CUAJO NATURAL TT 24 H		REQUESON TT 4 H		REQUESON TT 24 H	
Control	3,28E+07	Control	4,75E+06	Control	3,66E+07
0,06	7,60E+07	0,06	8,38E+06	0,06	3,75E+07
0,125	7,51E+07	0,125	3,33E+06	0,125	6,54E+07
0,25	5,24E+07	0,25	9,22E+06	0,25	6,00E+07

En los resultados de las tablas anteriores no se observa ningún efecto antimicrobiano, que reduzca la multiplicación de *C. sakazakii* en comparación con el control. Más bien parece, en algunos casos, que podría haber favorecido el crecimiento bacteriano. Hay estudios que indican que puede favorecer el crecimiento de microorganismos del género *Bifidobacterium*, por lo que podría ocurrir algo parecido con *C. sakazakii* (Metwally *et al.*, 2001).

A excepción del ensayo antibacteriano en el que se utilizó el aislado de GMP a partir del lactosuero burguitos precipitado con TCA. En este ensayo se puede observar una pequeña disminución del crecimiento de *C. sakazakii* cuando se adiciona una concentración de 0,006 mg/mL y una disminución mayor cuando se aplica una concentración de 0,05 mg/mL (Figura 12).

Estos experimentos son obviamente preliminares y haría falta evaluar algunos aspectos que pueden condicionar la actividad antibacteriana, como la presencia de glicanos y la polimerización del GMP. Son varios los autores como Salam *et al.* (2006), Moreno y Lopez-Fandiño. (2009) que creen que la estructura del GMP está relacionada con su actividad funcional, especialmente en lo que respecta al grado de glicosilación del mismo y el tipo de oligosacáridos que lo componen.

Además otros estudios como el de Sun Yun *et al.* (2014) muestran como concentraciones por debajo de 0,5 mg/ml de GMP, tienen mayor actividad antibacteriana que cuando la concentración de GMP es mayor de 1 mg/ml.

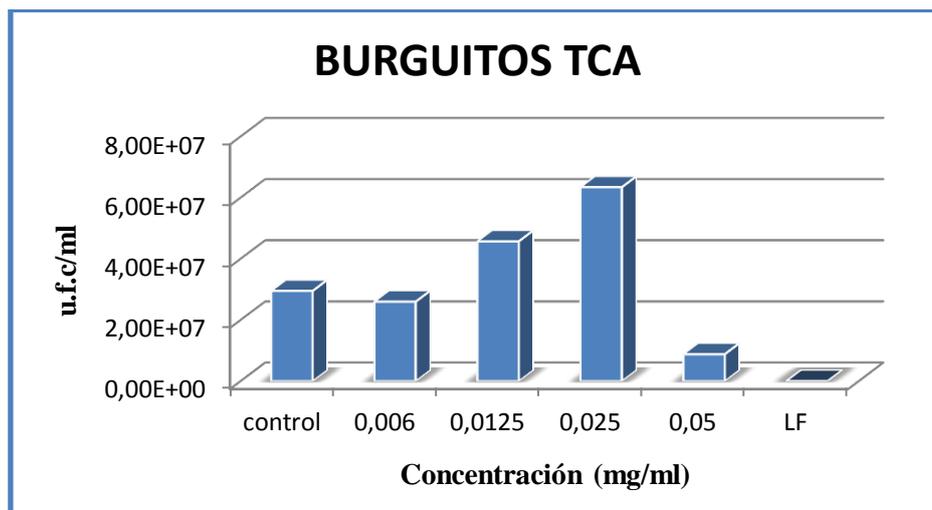


Figura 12. Gráfica que relaciona el crecimiento de *C. sakazakii* según la concentración de aislado por 12% TCA de GMP procedente de lactosuero burguitos.

6. Conclusiones

1. Es posible obtener glicomacropéptido (GMP) de diferentes lactosueros de origen industrial mediante precipitación térmica y precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Ambas técnicas han demostrado ser válidas para obtener GMP, tal y como se ha demostrado en los análisis por electroforesis y test inmunocromatográfico.
2. No se detectan grandes diferencias entre ambos métodos de aislamiento, sin embargo se podría decir que es más rápido y más sencillo el procedimiento de obtención por tratamiento térmico que el de precipitación con TCA. Además la concentración proteica de la fracción de GMP aislada por tratamiento térmico es mayor que la obtenida por TCA.
3. La electroforesis y el test inmunocromatográfico han resultado ser dos métodos eficaces y complementarios para realizar el seguimiento del aislamiento de GMP. Además, la tinción por PAS de los geles de electroforesis aporta una valiosa información sobre la glicosilación del GMP aislado.
4. No se ha podido demostrar la actividad antibacteriana de los diferentes GMPs aislados frente a *C. sakazakii*, aunque sí que a una concentración muy baja de una de las fracciones de GMP precipitada con TCA se obtuvo una reducción en la multiplicación de *C. sakazakii*. Por lo que se necesitarían más ensayos antibacterianos con concentraciones más bajas para determinar si hay algún tipo de acción antibacteriana del GMP sobre *C. sakazakii* o sobre otros microorganismos, y si esta actividad puede estar condicionada por la polimerización y glicosilación del GMP.

7. Valoración Personal

En el presente proyecto he aprendido de manera intensiva acerca de la leche y sus derivados, especialmente de los muchos componentes de gran interés que forman parte de ella más allá de su gran valor nutricional.

Además he podido poner en práctica muchos de los conocimientos aprendidos a lo largo de la carrera. Desde el uso de equipos relacionados con análisis químico de alimentos como la electroforesis o tests inmunocromatográficos hasta la puesta en práctica de los conocimientos sobre microbiología al tener que hacer ensayos antibacterianos.

Me parece importante destacar también el cambio de visión sobre la investigación que he experimentado a lo largo del estudio. Ya que no siempre las primeras hipótesis son correctas, lo que se quiere buscar sale a la primera, pero para mí esa es una de las partes interesantes de la investigación.

Por último y no menos importante me ha enseñado lo importante que es trabajar en equipo y que haya un buen ambiente de trabajo.

8. Bibliografía

Abd El-Salam, M. H. (2006). Separation of Casein Glycomacropeptide from Whey: Methods of Potential Industrial Application2. *International Journal of Dairy Science*, 1 pp. 93-99.

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

Aider, M., Halleux, D., Melnikova, I. (2009). Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(3), pp. 334.

Almécija, M.C. (2007). *Obtención de la lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero*. Tesis de Doctorado en Tecnología y Calidad de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad de Granada, España.

Boutrou, R., Jardin, J., Blais, A., Tomé, D., Léonil, J. (2008). Glycosylations of -casein-derived caseinomacropeptide reduce its accessibility to endo- but not exointestinal brush border membrane peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 8166–8173.

Brown, J.R. (1977). Albumin: Structure, Function and Uses Serum Albumin: Amino Acid Sequence Supported (in Part) by NIH Grant HD 02899. Pergamon Press Inc. DOI: 10.1016 / B978-0-08-019603-9.50009-0.

Brück, W. M., Kelleher, S. L., Gibson, G. R., Graverholt, G., Lönnerdal, B. (2006a). The effects of alfa-lactalbumin and glycomacropeptide on the association of Caco-2 cells by enteropathogenic Escherichia coli, Salmonella typhimurium and Shigella flexneri. *FEMS Microbiology Letters*, 259(1), pp. 158-162.

Brück, W. M., Kelleher, S. L., Gibson, G. R., Nielsen, K. E., Chatterton, D. E. W., Lönnerdal, B. (2003b). rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and -lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic Escherichia coli. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 37, pp. 273-280.

Calvo, M.V., Castro-Gómez, M.P., García-Serrano, A., Rodríguez-Alcalá, L. M., Juárez Iglesias, M., Fontecha, J. (2014). Grasa láctea: una fuente natural de compuestos Bioactivos. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 21(3), pp. 57-63.

- Chabance, B., Jollès, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., Fiat, A.- M. (1995). Characterization of an antithrombotic peptide from k-casein in newborn plasma after milk ingestion. *The British Journal of Nutrition*, 73, pp. 583-590.
- Chávez Vela, N. A., Salinas Miralles, E., Rincón J, J., Bon Rosas, F., Pérez Tellez, D. M. (2012). Reactivity of polyclonal antibodies toward glycomacropeptide of bovine cheese whey in front of the glycomacropeptide of cheese whey from sheep. *Investigación y Ciencia*, 54, pp. 12-16.
- Chen, Q., Zhu, Y., Quin., Zhao, L. (2018). Cronobacter spp., foodborne pathogens threatening neonates and infants. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 5, pp. 330-339.
- Claeys, W., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L. (2014). Consumption of Raw or Heated Milk from Different Species: An Evaluation of the Nutritional and Potential Health Benefits. *Food Control*, 42, pp. 188–201.
- Clare, D., Swaisgood, H. (2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, pp. 1187-1195.
- Delfour, A., Jolles, J., Alais, C., Jolles, P. (1965). Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionin residue and of the N-terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 19 (4), pp. 452-455.
- Domíngue, Gonzalez K., Cruz Guerrero A., Gonzalez Márquez H., Gomez Ruiz L., Garcia-Garibay M., Rodriguez Serrano G. (2014). El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(1), pp. 8-65.
- Dziuba, J., Minkiewicz, P. (1996). Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein. *International Dairy Journal*, 6, pp. 1017-1044.
- Egger, L., Ménard, O. (2017). Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion. *Current Opinion in Food Science*, 14, pp. 116-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.03.003>
- Espejo-Carpio, F., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., and Guadix, E. (2018). Artificial neuronal networks (ANN) to model the hydrolysis of goat milk protein by subtilisin and trypsin. *Journal of Dairy Research*, 85, pp. 339–346.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2004). *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Microbiological Risk Assessment Series No. 6., Switzerland.
- Farías, M. E., Martínez, M. J., Pilosof A. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, pp. 79–88.
- FitzGerald, R. (1998). Potential uses of caseinophosphopeptides. *International Dairy Journal*, 8, pp. 451-457.
- Foegeding, E., Luck, P. (2002). Whey protein products. pp. 1957-1960. En: Caballero, B., L. Trugo, P. Finglas (eds.). *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition*. Academic Press, New York, EE.UU.

- Gantner, V. (2015). The Overall and Fat Composition of Milk of Various Species. *Mljekarstvo*, 65 (4), pp. 223–231. DOI: 10.15567.
- Giacometti, J., Buretić-Tomljanović, A. (2017). Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. *Food Chemistry*, 230, pp. 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.016>
- Guerra, E. (2014). *Milk and dairy products: evaluation of bioactive components by analytical techniques*. Doctorado de investigación en ciencias y tecnologías agrícolas, medio ambiente y alimentos. Universidad de Bologna.
- Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., Callanan, J. J., Fanning, S. (2010). *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(4), pp. 339-350. doi: 10.1089 / fpd.2009.0379.
- Heck, J.M. , Schennink, A., Valenberg, H., Bovenhuis, H., Visker, M., Arendonk, J., Hooijdonk, A. (2009). Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 92(3), pp. 1192-1202.
- Holland, J. W., Deeth, H., Alewood, P. F. (2004). Proteomic analysis of casein microheterogeneity. *Proteomics*, 4, pp. 743-752.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., and Joosten, H. (2007b). Identification of ‘*Cronobacter*’ spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Journal Clin Microbiology*, 45, pp. 3814–3816.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell B., Tall, B, Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R, Joosten, H. (2007). *Cronobacter* gen. nov. Un nuevo género para acomodar los biogrupos de *Enterobacter sakazakii* , y la propuesta del gen *Cronobacter sakazakii* . nov. *peine*. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov. , *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, y de tres subespecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., y *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lactaridi* subsp. nov. *BMC Evolutionary Biology* Doi: 10.1186/1471-2148-7-64
- Janer, C., Peláez, C., Requena, T. (2004). Caseinomacropéptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food Chemistry*, 86(2), pp. 263- 267.
- Jelen, P. (2003). Whey processing. Utilization and Products. pp. 2739-2745. En: H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox (eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, London, UK.
- Jensen, R.G., Blanc, B. and Patton, S. (1995). The structure of milk. B. Particulate constituents in human and bovine milks. *Handbook of Milk Composition*. Academic Press. San Diego, California.
- Kim, K., Kim, K.-P. Choi, J., Lim, J.-A., Lee, J., Hwang, S., Ryu, S. (2010). Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (15), pp. 5188-5198. DOI: 10.1128 / AEM.02498-09
- Lee YD, Park JH, Chang H. (2012). Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Control*, 24, pp. 225–230.

- Li E., Mine, Y. (2004). Comparison of Chromatographic Profile of Glycomacropptide from Cheese Whey Isolated Using Different *Methods American Dairy Science Association*, 87, pp. 174–177
- Liu, C., Erickson, A. K., Henning, D. R. (2005). Distribution and carbohydrate structures of high molecular weight glycoproteins, MUC1 y MUCX, in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 88, pp. 4288-4294.
- Liu, X., K. Chung, S. Yang and A. Yousef. (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Journal Process Biochemistry*, 40, pp. 13-24.
- Londoño, M. (2006). Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. Perspectivas en nutrición humana. *Revista Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia*, 16, pp. 11-20.
- Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, pp. 1197-1211.
- Marcone. S, Belton O and Fitzgerald D. (2017). Milk derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology* 83, pp. 152–162.
- Martín-Diana, Fraga, M. J., Fontecha, J. (2001). Isolation and characterization of caseinmacropptide from bovine, ovine, and caprine cheese whey. *European Food Research and Technology*, 214(4) pp. 282-286
- Mather, I. (2000). A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *Journal Dairy Science*, 83, pp. 203–247.
- McGrath, B.A., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Kelly, A.L. (2016). Composition and Properties of Bovine Colostrum: A Review. *Dairy Science and Technology*, 96 (2), pp. 133–158.
- McGregor, R. A., Poppitt, S. D. (2013). Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutrition and Metabolism*, 10 (1), pp. 46. doi:10.1186/1743-7075-10-46
- Metwally, M. M., El-Shibiny, S., Dieb, S. M. E., El-Etriby, H. M. M., Assem, F. A. (2001). Large scale preparation and growth promoting effects on Bifidobacterium of glycomacropptide from sweet whey. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 29, pp. 29-36.
- Mohanty, D.P., Mohapatra, S., Misra, S., Sahu, P.S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, pp. 577-583. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.005>
- Mollé D., Leonil, J. (2005). Quantitative determination of bovine κ -casein macropptide in dairy products by Liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). *International Dairy Journal*, 15(5) pp. 419-428. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.08.013.

- Mollé, D., Léonil, J. (1995). Heterogeneity of the bovine k-casein caseinomacropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 708, pp. 223-230.
- Moreno, F. J., López-Fandiño, R. (2009). Estructura y funcionalidad del glicomacropéptido bovino. pp. 223-249. J. Fontecha, I. Recio y A.M.R. Pilosof (eds.). En: *Funcionalidad de Componentes Lácteos*, CSIC, Madrid, España.
- Murgiano, L., Timperio, A. M., Zolla L., Bongiorno S. (2009). Comparison of Milk Fat Globule Membrane (MFGM) Proteins of Chianina and Holstein Cattle Breed Milk Samples Through Proteomics Methods. *Nutrients*, 1(2) pp. 302-15.
- Muro Urista, C., Álvarez Fernández, R., Riera Rodríguez, F., Arana Cuenca, A., & Téllez Jurado, A. (2011). Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17(4), pp. 293-317. doi:10.1177/1082013211398801.
- Oh, S., Worobo, R. W., Kim, B., Rheem, S., Kim, S. (2000). Detection of cholera toxinbinding activity of k-casein macropeptide and optimization of its production by the response surface methodology. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(3), pp. 516-522.
- Organización mundial de la salud. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. (1999). Leche y productos lácteos. *Codex Alimentarius*. Segunda edición. Roma.
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105, pp. 1-14.
- Permyakov, E.A., Berliner, L.J. (2000). α -lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*, 473(3), pp. 269-274. doi:10.1016/S0014-5793(00)01546-5.
- Phadungath, C. (2005) Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 27(1), pp. 201-212.
- Rasmussen, L. K., Sorensen, E. S., Petersen, T. E., Nielsen, N. C., Thomsen, J. K. (1997). Characterization of phosphate sites in native ovine, caprine, and bovine casein micelles and their caseinomacropeptides: a solid state phosphorus-31 nuclear magnetic resonance and sequence and mass spectrometric study. *Journal of Dairy Science*, 80, pp. 607-614.
- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 22 de diciembre de 2005).
- Rhoades, J. R., Gibson, G. R., Formentin, K., Beer, M., Greenberg, N., Rastall, R. A. (2005). Caseinglycomacropeptide inhibits adhesion of pathogenic *Escherichia coli* strains to human cells in culture. *Journal of Dairy Science*, 88, pp. 3455-3459.
- Saito, T., Itoh, T. (1992). Variations and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine -casein. *Journal of Dairy Science*, 75, pp. 1768-1774.
- Saito, T., Yamaji, A., Itoh, T. (1991). A new isolation method for caseinoglycomacropeptide from sweet cheese whey. *Journal of Dairy Science*, 74, pp. 2831-2837.

- Sánchez, L., Peiró, J. M., Castillo, H., Pérez, M. D., Ena, J. M., Calvo, M. (1992). Kinetic Parameters for Denaturation of Bovine Milk Lactoferrin. *Journal of Food Science*, 57(4), pp. 873–879. doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb14313.
- Schanbacher FL, Talhouk RS, Murray FA, Gherman LI, Willett LB. (1998) Milk borne bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 8 pp. 393-403
- Strydom A, Cawthorn DM, Cameron M, Witthuhn RC. (2018) Species of *Cronobacter*, a review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *Korean Journal for food science of animal resources*, 38 (2), pp.376-390. doi: 10.5851/Fkosfa.2018.38.2.376
- Sun, Yun H., Kim, Y., Park, M., Kim, S., Oh, S. (2014). Inhibitory effects of the κ -casein macropeptide isolated from milk protein on the biofilm formation and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78 (3), pp. 490–498 doi: <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2014.885829>
- Thomä-Worringer, C., Sørensen, J., López-Fandiño, R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 16, pp. 1324-1333.
- Torres-Llanez MJ, Vallejo-Córdoba B, González-Córdova AF. (2005) Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Alan*, 55 (2).
- Van Acker J, De Smet F, Muyldermans G, Bougateg A, Naessens A, Lauwers S. (2002). Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, pp. 293–297. doi: 10.1128/JCM.39.1.293-297.2001.
- Vreeman, H. J., Visser, S., Slangen, C. J., Van Riel, J. A. M. (1986). Characterization of bovine alfa-casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography. *Biochemical Journal*, 240, pp. 87-97.
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist?. *International Dairy Journal*. 9(3-6), pp. 189-192.
- Wang, B., Staples, A., Sun, Y., Karim, M., Brand-Miller, J. (2004). Effect of dietary sialic acid supplementation on saliva content in piglets. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13, pp. 75.
- Wang, B., Yu, B., Karim, M., Hu, H. H., Sun, Y., McGreevy, P., Petocz, P., Held, S., Brand-Miller, J. (2007). Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, pp. 561-569.
- Whitney, R. (1977). Milk proteins. *Food Colloids*, pp. 66–151. (Ed. Graham, HD). AVI Publishing Company, Westport, EEUU.
- Zevaco, C., Ribadeau-Dumas, B. (1984). A study on the carbohydrate binding sites of bovine κ -casein using high performance liquid chromatography. *Milchwissenschaft*, 39, pp. 206-210.