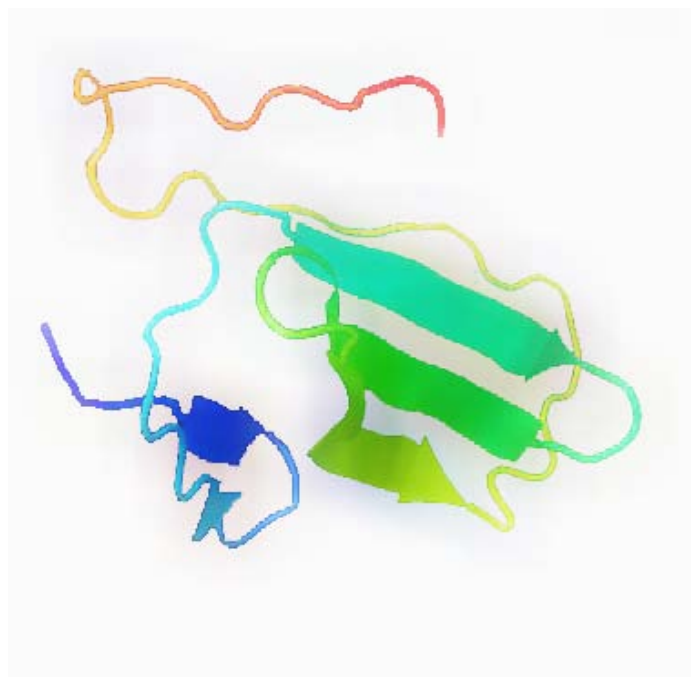




Caracterización de las Proteínas de la Membrana del Glóbulo Graso de Vaca y Oveja y de sus Hidrolizados

Fco Javier Fraguas Lasheras

Trabajo Fin de Máster



Tutora: Lourdes Sánchez Paniagua.

Máster Universitario en Iniciación a la Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.
Curso 2012/2013.

AGRADECIMIENTOS

En este trabajo han contribuido más personas de las que figuran en la portada, que, aún sin ser autores su participación ha sido determinante. En primer lugar a mis jefas Lourdes y Dolores, por acogerme en su grupo, enseñarme y darme el apoyo que he necesitado todo este tiempo (la palabra “jefas” está puesta como halago). Quiero agradecer a Miguel que siempre ha estado, está y estará en su despacho para cualquier duda que pueda tener el día de mañana. Mandar un muchas gracias a Saidu, Dani R., Mercedes, José Antonio y a los exiliados Dani V. y Cristina, me han echado una mano decolorando innumerables geles, y han contribuido, con los demás becarios del Área y mis amigos de mis pueblos, a hacerme trabajar de buen humor.

En último lugar, sin más ni menos importancia que a los demás, mostraré mi agradecimiento a mis padres; por enseñarme que el trabajo es la única forma de hacer las cosas, a mi hermana y también a Amaia porque siempre han confiado en mí.

Quiero compartir con todos ellos los éxitos que deriven de este trabajo.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2010-20835 Estudio de las proteínas con actividad defensiva presentes en el lactosuero y en la membrana del glóbulo graso de la leche de vaca y oveja para su utilización en alimentos funcionales

ÍNDICE

I.	Resumen	6
	1. Resumen	6
	2. Summary	6
II.	Introducción	7
	1. Interés del estudio	7
	2. Composición y biosíntesis de la leche	8
	3. La fracción grasa de la leche	9
	a. Membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM)	9
	b. Proteínas de la MFGM	10
	1. La butirofilina	10
	2. Otras proteínas de la MFGM	11
	c. Métodos de aislamiento de las proteínas de la MFGM	13
	4. Producción y aprovechamiento del buttermilk	15
III.	Objetivos del estudio	15
IV.	Materiales y Métodos	16
	1. Obtención de las proteínas de la MFGM	17
	a. Preparación de las muestras	17
	b. Fase de lavado	18
	c. Fase de extracción	18
	d. Fase de optimización	19
	2. Caracterización de las proteínas de la MFGM por electroforesis	20
	a. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	
	1. SDS-PAGE en Phast System	20
	2. SDS-PAGE en Miniprotean Biorad	20
	b. Electroforesis en dos dimensiones (2D)	21
	1. Primera dimensión: Isoelectroenfoque	21
	2. Segunda dimensión: SDS-PAGE	22
	3. Obtención de anticuerpos frente a butirofilina y evaluación de estos	
	a. Inmunización	23
	b. Obtención de los antiseros	23
	c. Titulación de los antiseros: ELISA no competitivo indirecto	
	d. Determinación de la concentración de butirofilina por ELISA competitivo	24
	e. Western-blotting	25
	4. Digestión gástrica <i>in vitro</i>	26
	a. Hidrólisis con pepsina	26
	b. Determinación de proteína por BCA	28
	c. Determinación del grado de hidrólisis (DH) mediante TNBS	
	5. Ensayo de actividad antimicrobiana	29
V.	Resultados y Discusión	29
	1. Caracterización de las proteínas de la MFGM	32
	2. Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales frente a la butirofilina	37
	a. Determinación de la concentración de butirofilina bovina mediante ELISA competitivo	39
	3. Digestión gástrica y caracterización cualitativa y cuantitativa de los hidrolizados de <i>buttermilk</i> (BM) y <i>butterserum</i> (BS)	40

a.	Digestión gástrica de los <i>buttermilk</i> obtenidos a partir de nata cruda de vaca y oveja	40
b.	Digestión de los <i>buttermilk</i> comerciales	42
1.	Digestión de α -BM	43
2.	Digestión de β -BM	44
3.	Digestión de W-BM	45
4.	Digestión de M-BM	47
c.	Análisis por Western-blotting de los hidrolizados de BM de vaca	
4.	Ensayo antibacteriano de un hidrolizado de BM de vaca	49
VI.	Conclusiones	52
VII.	Bibliográficas	53

I. RESUMEN Y SUMMARY

I.1. Resumen

La leche contiene componentes bioactivos, entre ellos diversas proteínas, para los que se han identificado varias actividades de interés para la salud humana. En este trabajo se ha abordado el estudio de las proteínas de la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM), a las que se atribuyen propiedades tecnológicas y biológicas. Debido a su baja concentración y a su localización, estas proteínas son difíciles de aislar, por ello, en este Trabajo Fin de Máster, se han estudiado varias estrategias de extracción para diferentes muestras lácteas, como nata de oveja y de vaca, y sueros de mantequilla de vaca (*buttermilk*) comerciales en polvo. Además, se han analizado los extractos obtenidos por SDS-PAGE tanto para caracterizarlos, como para aislar alguna de las proteínas mayoritarias, en concreto la butirofilina, y producir anticuerpos policlonales frente a ella. Utilizando estos anticuerpos se ha puesto a punto un ELISA competitivo y se ha estimado el contenido de butirofilina en *buttermilk* obtenido de nata cruda de vaca y en los *buttermilk* comerciales. Con el fin de completar el estudio de caracterización, los extractos enriquecidos en proteínas de la MFGM se han sometido a electroforesis en dos dimensiones, habiéndose identificado algunos *spots* por técnicas proteómicas. Asimismo, los *buttermilk* se han sometido a un proceso de digestión gástrica *in vitro* y se han caracterizado los hidrolizados por electroforesis y se ha determinado el grado de hidrólisis por un método colorimétrico. Por último, se han realizado unos experimentos preliminares para evaluar la actividad antibacteriana de los hidrolizados frente a *Cronobacter sakazakii*, con resultados muy prometedores, ya que se ha observado inhibición del crecimiento.

I.2. Summary

Milk contains many bioactive components, among them several proteins, having been identified many beneficial activities for them. In this work, proteins of the milk fat globule membrane (MFGM) have been studied due to the interest of their technological and biological properties. The proteins of the MFGM are present in very low concentration, and some are integrated in the membrane; both conditions make their extraction very difficult. Therefore, in this Final Master's Project different strategies of extraction have been assayed for several samples, such as sheep's and cow's cream, and commercial cow's buttermilks. The extracts obtained enriched in MFGM proteins were

analyzed by SDS-PAGE, in order to characterize them and also to isolate the butyrophilin, one of the major proteins, and produce polyclonal antibodies against it. Those antibodies have been used to develop a competitive ELISA to estimate the butyrophilin content in buttermilk obtained from raw cow's and sheep's cream and in commercial buttermilks. Milk samples enriched in MFGM proteins were studied in two-dimensional electrophoresis in order to complete their characterization, some spots being identified by proteomic techniques. The buttermilks were subjected to *in vitro* gastric digestion with pepsin, and the hydrolysates were characterized by electrophoresis and their hydrolysis degree was estimated by a colorimetric method. Finally, some preliminary experiments have been carried out in order to evaluate the antibacterial activity of the hydrolysates from buttermilk against *Cronobacter sakazakii*, those experiments giving promising results as growth inhibition was observed.

II. INTRODUCCIÓN

II.1 Interés del estudio

En las últimas décadas se ha generado un gran interés por conocer con mayor profundidad los componentes bioactivos de la leche con el fin de poder utilizarlos eventualmente como ingredientes de alimentos que posean no sólo un valor nutritivo, sino también un valor funcional. Entre estos componentes bioactivos existe un grupo de factores protectores frente a agentes causantes de infecciones. De hecho, los recién nacidos alimentados con lactancia natural tienen, en general, menor incidencia de procesos gastrointestinales que los alimentados con leches de fórmula, debido posiblemente a la acción de los oligosacáridos y las glicoproteínas de la leche materna (1). Aunque se han estudiado extensamente algunas de las proteínas solubles del lactosuero con actividad antibacteriana, como la lactoferrina, todavía quedan muchos aspectos por conocer acerca de algunas proteínas minoritarias, como las proteínas de la membrana del glóbulo graso (MFGM, del inglés *milk fat globule membrane*) para algunas de las cuales también se ha propuesto una actividad frente a agentes patógenos. Por ello, en este Trabajo Fin de Master (TFM) nos planteamos la puesta a punto de herramientas para el estudio de estas proteínas, pues debido a su actividad biológica podrían aportar un valor añadido a ciertos productos.

La MFGM es una fuente importante de proteínas bioactivas. Está organizada en tres capas y es una compleja mezcla de proteínas, lípidos neutros y lípidos polares, como los fosfolípidos y los glicoesfingolípidos (2). Además de participar en la estructura y la protección de la grasa del glóbulo, algunos estudios han propuesto para dichas proteínas una actividad antitumoral en líneas celulares establecidas, así como una actividad antibacteriana y antiviral (3, 4).

II.2 Composición y biosíntesis de la leche

La leche es un líquido secretado por la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos tras el nacimiento de sus crías, destinada a la alimentación de éstas en su primera etapa de la vida. Este líquido consiste en una emulsión formada por glóbulos grasos en una solución de sales minerales, azúcares, proteínas del lactosuero, en la que se encuentran las caseínas en una suspensión coloidal.

La leche es un fluido complejo cuya composición y propiedades físicas varían de una especie a otra, incluso dentro de una especie las diferentes razas tienen distinta composición de la leche y ésta también varía a lo largo del periodo de lactación, en función de las necesidades de las crías. El constituyente mayoritario de la leche es el agua y contiene cantidades variables de lípidos, proteínas y carbohidratos, que se sintetizan en la glándula mamaria en mayor o menor grado según las especies. También se encuentran en la leche pequeñas cantidades de minerales, vitaminas y otros componentes lipo e hidrosolubles que proceden directamente del plasma sanguíneo, proteínas sanguíneas e intermediarios de la síntesis mamaria (5).

Composition	Sheep	Cow
Fat (%)	7.9	3.6
Solids-not-fat (%)	12.0	9.0
Lactose (%)	4.9	4.7
Protein (%)	6.2	3.2
Casein (%)	4.2	2.6
Albumin, globulin (%)	1.0	0.6
Non-protein N (%)	0.8	0.2
Ash (%)	0.9	0.7

Tabla 1: Composición de la leche de vaca y oveja según Park et al. (34)

La leche es sintetizada en la glándula mamaria, y más concretamente en los alveolos mamarios. Por la sangre circulan los metabolitos que van a constituir las biomoléculas de la leche, que son absorbidos por las células basales, las cuales separan el lumen de los conductos sanguíneos y linfáticos. Tras la absorción de los metabolitos se producen los componentes de la leche en el retículo endoplasmático. Por último el

aparato de Golgi se encarga del transporte desde la fase acuosa de la célula al lumen, la liberación de la biomolécula se produce por fusión del aparato de Golgi con la membrana plasmática apical, tras lo cual se vierten los componentes de la fase acuosa al lumen.

La fase lipídica también se sintetiza en el retículo endoplasmático y se agrupa en el citoplasma en forma de gotitas. Las gotitas se mueven hacia la membrana plasmática apical y pasan al lumen por pinocitosis. En este proceso las gotitas adquieren una capa de membrana plasmática que las recubre, que constituye la MFGM.

En el lumen alveolar se completa la síntesis de lactosa y la glicosilación y fosforilación de las proteínas (5).

II.3 La fracción grasa de la leche

La leche de la mayoría de los mamíferos contiene entre un 3 y un 7% de grasa, la cual está distribuida en forma de diminutos glóbulos de grasa que forman una emulsión. Los glóbulos grasos de la leche consisten básicamente en un núcleo de triglicéridos, rodeado de la MFGM.

II.3.a Membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM)

La MFGM se compone de proteínas, fosfolípidos, lípidos neutros, enzimas y otros componentes minoritarios, siendo una importante fuente de proteínas bioactivas. Dicha membrana, que procede del proceso de pinocitosis como se ha explicado anteriormente, actúa como un agente emulsificante natural, previniendo la coalescencia de los glóbulos grasos y protegiendo a la grasa de la degradación enzimática. La MFGM se ve muy afectada por los tratamientos tecnológicos de la leche, tales como el tratamiento con calor, el frío, la homogeneización, la evaporación o la liofilización (6).

Se ha demostrado que algunas proteínas y lípidos de la MFGM poseen propiedades funcionales y beneficiosas para la salud (7). Además, en este TFM también se han analizado los productos de hidrólisis de estas proteínas, puesto que hay estudios previos en los que se ha demostrado que ciertas actividades biológicas de las proteínas lácteas, como la antibacteriana, antivírica o antitumoral, se incrementan en los péptidos derivados de ellas respecto a las proteínas íntegras, como para la lactoferrina (8).

La MFGM está formada por tres capas diferentes; desde el núcleo del glóbulo graso hacia el exterior se encuentra, una primera monocapa lipídica originaria del

retículo endoplasmático y otros compartimentos intracelulares. En esta monocapa las colas hidrofóbicas de los lípidos polares están en contacto con los triglicéridos del núcleo. Seguida a esta primera capa se encuentra una capa proteica electrodensa y por último, una bicapa lipídica, que incluye fosfolípidos, esfingolípidos, y parte de algunas de las proteínas (Figura 1).

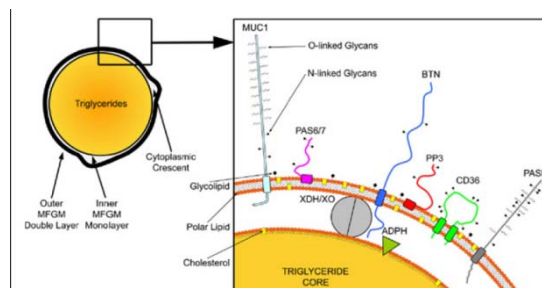


Fig. 1: Estructura de la MFGM y disposición de las principales proteínas que contiene según Dewettinck et al. (7)

II.3.b Proteínas de la MFGM

Las proteínas de la MFGM representan del 25 al 70% del total de sus componentes, constituyendo del 1-3% del total de las proteínas de la leche. Se han descrito en la MFGM alrededor de 40 proteínas diferentes, con pesos moleculares de entre 15.000 y 240.000. 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 lactaderina (PAS V/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 (4).

II.3.b.1 La butirofilina

La butirofilina es la proteína más abundante de la membrana del glóbulo graso bovino, y en ella se han centrado algunos objetivos de este TFM. Tiene un peso molecular alrededor de 66.000 y según la raza representa del 20 al 40% del total de proteínas de la membrana del glóbulo graso. La mayor parte de la butirofilina asociada con los glóbulos grasos se recupera en el precipitado cuando se centrifuga el suero de mantequilla o mazada (en inglés *buttermilk*), pues está unida fuertemente a las membranas por puentes disulfuro (9) resistiendo a la extracción con detergentes y agentes caotrópicos. La butirofilina pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas,

que incluye moléculas de adhesión, receptores y moléculas del sistema inmune (10). La conformación de la butirofilina le confiere la propiedad de interaccionar con otras proteínas. En particular, se ha visto que la butirofilina se une a la xantín-oxidasa y forma con otras proteínas de la parte citoplasmática del glóbulo graso un complejo, que posiblemente participa en la formación de la membrana del glóbulo graso y en la expulsión de éste de la célula mamaria (9).

II.3.b.2 Otras proteínas de la MFGM

Las proteínas más importantes de la MFGM después de la butirofilina son las siguientes:

La mucina, pertenece a una familia de proteínas fuertemente glicosiladas. Se han identificado en la leche de diversas especies tres tipos de mucinas: la MUC1, la MUCX y la MUC15, todas ellas proceden de la membrana apical de las células mamarias y son componentes integrales de la MFGM. La estructura de la proteína MUC1 o mucina-1 se caracteriza por tener una secuencia repetida en tándem, por lo que muestra polimorfismo cuando se analiza por electroforesis. La mucina-1 contiene alrededor del 50% de su peso de glicanos, entre ellos N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, galactosa, manosa, ácido siálico y fucosa (11). Las mucinas son capaces de prevenir la colonización de ciertos epitelios por microorganismos patógenos como *Escherichia coli* o *Helicobacter pylori* (12, 13).

La lactaderina, es una glicoproteína ampliamente distribuida, de unos 50.000 de peso molecular, que se caracterizó precisamente debido a su presencia en la membrana del glóbulo graso. Contiene un porcentaje de glicanos del 6 al 13%, según las variantes. Recibe los nombres de PAS-6 y PAS-7 que son variantes de glicosilación de la proteína con 52.000 y 47.000 de peso molecular, respectivamente (14). La lactaderina de la leche humana presenta una elevada actividad inhibidora de los rotavirus, uniéndose a ellos y bloqueando su capacidad infectiva. Esta actividad anti-rotavirus de la lactaderina parece estar ligada a su contenido en glicanos (15, 16).

La xantín-oxidasa, representa alrededor del 20% del total de proteínas de la MFGM. Se trata de una compleja enzima redox que contiene molibdeno, cuya función consiste en transformar la xantina en ácido úrico (9). La xantín-oxidasa bovina es una proteína dímera con dos subunidades idénticas de alrededor de 150.000. Aproximadamente el 60% de la xantín-oxidasa asociada con la MFGM puede ser

extraída de la membrana por lavado con soluciones que contengan altas concentraciones de sal o detergentes no iónicos (6). Por otra parte, el H_2O_2 que produce la xantín-oxidasa podría contribuir de forma indirecta a potenciar la acción bacteriostática de la lactoperoxidasa, aunque es una función que no se ha confirmado en estudios posteriores al trabajo en el que se propuso inicialmente esta actividad (17).

No obstante, como se ha indicado anteriormente, se han descrito más de 40 proteínas en la MFGM. En la tabla que se incluye a continuación se muestran, además de las previamente citadas, otras proteínas de la MFGM con algunas de sus características, tales como el peso molecular (M) el punto isoeléctrico (IEP) y ciertas funciones biológicas atribuidas a ellas en diferentes estudios.

Component	Abbreviation	M (kDa)	IEP	Function	Health aspects	References
Fatty acid binding protein	FABP	13	5-5.5	Transport of fatty acids Regulation of lipid metabolism Increase of lipid droplets in cytoplasm	Cell growth inhibitor Anticancer factor (FABP as selenium carrier) Similar to P2 myelin protein involved in EAN	Spitsberg et al. (1995), Peterson et al. (1998), Kromminga et al. (1990), Bansal and Medina (1993), Whanger (2004), Spitsberg and Gorewit (2002), Riccio (2004)
Butyrophilin	BTN	66-67	5.32	MFG secretion Belongs to Ig	Suppression of MS Induces or modulates EAE Influences pathogenesis of autistic behavior	Mana et al. (2004), Guggenmos et al. (2004), Johns and Bernard (1999), Steffert, Brehm et al. (2000), Steffert, Schubert et al. (2000) Vojdani et al. (2002)
Xanthine oxidase	XDH/XO	146 (300)	7.8	Structural, lipid secretion Role in purine metabolism	Bactericidal agent Redox reaction/ anti-inflammatory	Martin et al. (2004), Hancock et al. (2002) Spitsberg (2005), Fong et al. (2007)
Mucin 1	MUC1	160-200	<4.5	Protection from physical damage Protection from invasive pathogens	Protective effect against rotavirus infection	Kvistgaard et al. (2004)
Breast cancer type 1 susceptibility protein	BRCA1			Cancer suppressor	Inhibition of breast cancer	Spitsberg and Gorewit (1997, 1998)
Breast cancer type 2 susceptibility protein	BRCA2			Cancer suppressor Direct regulator of cytokinesis	Inhibition of breast cancer	Vissak et al. (2002) Daniels et al. (2004)
Lactadherin	PAS VI/VII	47	6-6.6	Member of cadherins Ca-dependent adhesive properties Phospholipid binding	Protection from viral infections in the gut Role in epithelialization, cell polarization, cell movement and rearrangement, neurite outgrowth Synaptic activity in the central nervous system	Kvistgaard et al. (2004) Riccio (2004)
Protease peptone 3	PP3	18-30/14	6.3	Membrane associated Expressed in lactating mammary gland		Fong et al. (2007)
Adipophilin	ADPH	52	7.5-7.8	Uptake and transport of FA/ TAG		Riccio (2004)
Periodic acid Schiff III	PAS III	95-100	<4.5	Marker of the secretory and ductal epithelium		Riccio (2004)
Cluster of differentiation	CD36	76-78	<7	Macrophages marker Phagocytosis by neutrophils		Riccio (2004)

Other components
 β -glucuronidase
inhibitor
Helicobacter
pylori inhibitor
Phosphoproteins

Inhibition of colon
cancer Ito et al. (1993)
Prevention of
gastric diseases Wang et al. (2001)
Organic Spitsberg and Gorewit (1997)

Tabla 2: Proteínas de la MFGM según Dewettinck et al. (7)

II.3.c Métodos de aislamiento de las proteínas de la MFGM

Las proteínas de la MFGM presentan cierta dificultad en su aislamiento, debido a su relación con la membrana. Existen diferentes métodos para aislar esta membrana, algunos de ellos se representan en el esquema que se incluye a continuación (Figura 2).

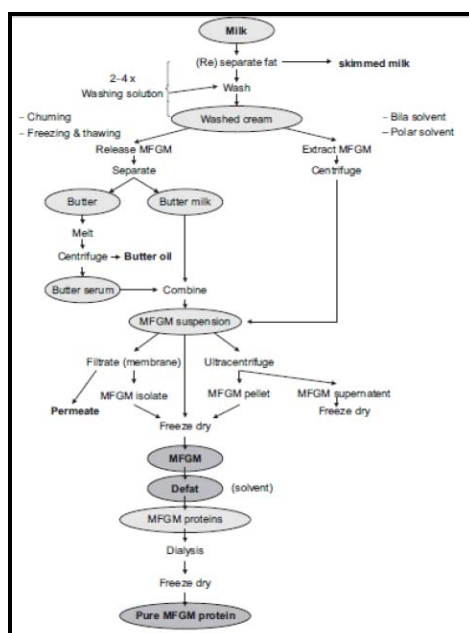


Fig. 2: Esquema de los diferentes métodos de aislamiento de las proteínas de la MFGM según Dewettinck et al. (7)

En todos los métodos, primero se separa la grasa de la leche por centrifugación y se lava dos o más veces con 3 a 15 volúmenes de agua destilada, en soluciones salinas con sacarosa, en diversos tampones o en una solución similar al ultrafiltrado de leche (*simulated milk ultrafiltrate*, SMUF) (18). En algunos casos, se añaden detergentes o agentes disociantes para facilitar el lavado. Después de los lavados, la MFGM es liberada a la fase acuosa mediante agitación a baja temperatura, aplicando ciclos de congelación-descongelación o directamente mediante el empleo de detergentes no iónicos, sales biliares o solventes polares. Los diferentes procesos de extracción resultan en diferencias en cuanto al rendimiento y la composición del extracto (7).

En el proceso de extracción de la MFGM por agitación, al batir la grasa se introduce aire. Los glóbulos grasos se disponen alrededor de las burbujas de aire y se aproximan entre sí, llegando a romper su propia estructura, formándose pequeños

grumos de grasa y saliendo parte de la grasa líquida del glóbulo al exterior (19). Finalmente, se produce una inversión de fases y se libera una fase acuosa denominada suero de mantequilla, mazada o en inglés *buttermilk* (BM), que contiene fragmentos de la membrana del glóbulo, proteínas, lactosa y minerales (20). Este proceso es similar al que se utiliza en la elaboración de la mantequilla.

II.4 Producción y aprovechamiento del *buttermilk*

A nivel mundial se produjeron del orden de $9,6 \times 10^6$ toneladas de mantequilla en el año 2008, $12,3 \times 10^6$ en 2012 y $16,75 \times 10^6$ hasta junio de 2013 (<http://www.dairyco.org.uk>). El *buttermilk* es un subproducto que se genera en la producción de mantequilla, y que debido a su baja estabilidad frente a la oxidación se suele emplear para alimentación animal (29). No obstante, en la actualidad se ha generado un creciente interés en la utilización del *buttermilk*, habiéndose desarrollado numerosas aplicaciones para el *buttermilk* en polvo en productos de panadería, mezclas secas, y algunos productos lácteos, como el queso y yogures (30). El *buttermilk* tiene un elevado potencial funcional, particularmente debido a sus componentes hidrosolubles, que incluyen lípidos polares y fragmentos de la MFGM (31). El *buttermilk*, con su rica composición puede constituir una fuente de ingredientes funcionales, como emulsificantes, estabilizantes y promotores de la salud en productos alimentarios (20). Es importante caracterizar el BM, tanto de vaca como de oveja, y los BM comerciales obtenidos, si se pretende plantear una estrategia de fraccionamiento para la obtención de sus componentes bioactivos.

III. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Este Trabajo Fin de Master (TFM) se centra en tres objetivos generales, el primero es obtener un buen método de extracción de las proteínas de la MFGM, el segundo objetivo es, utilizando el método de extracción desarrollado, obtener anticuerpos específicos frente a la butirofilina y con ellos poner a punto una técnica ELISA y el tercero, someter a las proteínas de la MFGM a una digestión gástrica *in vitro*. Cada objetivo general conlleva varios objetivos específicos, que son los siguientes en este TFM:

1. Seleccionar el mejor método de extracción de las proteínas de la MFGM.

2. Caracterizar los métodos de extracción por SDS-PAGE y las muestras por 2D-SDS-PAGE e identificar las proteínas separadas por técnicas proteómicas.
3. Obtener la butirofilina pura por SDS-PAGE e inmunizar con ella a conejos
4. Obtener los antisueros específicos frente a butirofilina y evaluar su reactividad por ELISA y Western-blotting
5. Realizar una digestión gástrica *in vitro* de *buttermilk* y caracterizar los hidrolizados por:
 - Perfil en SDS-PAGE en gradiente (4-20%)
 - Grado de hidrólisis
 - Actividad antibacteriana
6. Caracterizar los buttermilk comerciales por:
 - SDS-PAGE y 2D-SDS-PAGE

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la caracterización de las proteínas de la MFGM se han utilizado las siguientes muestras:

- Nata procedente de leche cruda de oveja (NO)
- Nata procedente de leche cruda de vaca (NV)
- Nata procedente de leche cruda homogeneizada de vaca
- Productos en polvo comerciales derivados de suero de mantequilla:
 - α -Buttermilk (α -BM) (Westland Milk Products, Hokitika, Nueva Zelanda)
 - β -Buttermilk (β -BM) (Westland Milk Products)
 - Westland-Buttermilk (W-BM) (Westland Milk Products)
 - Meggle-Buttermilk (M-BM) (Meggle Group, Wasserburg, Alemania)

La composición de estos productos es:

PRODUCTO	Humedad	Grasa	Proteínas
α -BM	4,3	5,0	38,9
β -BM	3,7	22,2	30,3
W-BM	3,8	9,7	33,6
M-BM	3,5	38,6	49,0

Tabla 3: Composición porcentual en masa de los diferentes buttermilk comerciales, datos de las especificaciones técnicas de los fabricantes

El esquema que sigue este apartado se corresponde con los objetivos de este TFM, primero se expondrán los métodos para la extracción y caracterización de las fracciones enriquecidas en las proteínas de la MFGM, después los métodos para la obtención y evaluación de un antisuero policlonal obtenido en conejo frente a la butirofilina y por último, los métodos para llevar a cabo la hidrólisis de los diferentes productos derivados de los *buttermilk*, así como para la caracterización y evaluación de la actividad de estos hidrolizados.

IV.1 Obtención de las proteínas de la MFGM

El proceso para la obtención de las proteínas de la MFGM se compone de dos etapas básicas: lavado y extracción por precipitación. Si las muestras iban a ser sometidas a una electroforesis en 2D (2DE) se incluía una tercera etapa de precipitación con solventes orgánicos a -20°C.

IV.1.a Preparación de las muestras

En este TFM se utilizaron dos tipos de derivados lácteos enriquecidos en proteínas de la MFGM: productos comerciales en polvo derivados de suero de mantequilla de vaca o *buttermilk* y otros procedentes de nata de leche cruda de vaca y oveja. La preparación de la muestra fue diferente en función de su naturaleza.

- Los *buttermilk* comerciales se disolvieron a razón de 1 g en 10 ml de agua mili-Q, a 37°C durante 2 horas, dejándose en agitación 2 horas más a temperatura ambiente. Tras esta etapa permanecieron a 4°C, generalmente durante una noche, hasta la siguiente etapa. Previamente a la fase de lavado, las muestras se centrifugaron a 4200 g durante 25 min a 4°C, obteniendo una fase líquida blanquecina superior y una fase sólida, blanca y granular en la parte inferior, continuándose los experimentos con esta última fase. La muestra M-BM, tras la centrifugación dio lugar a una fase grasa por encima de la fase líquida y el precipitado obtenido fue más denso que en las otras muestras.
- La grasa de oveja y vaca se obtuvieron de leche cruda suministrada por la quesería Villacorona (El Burgo de Ebro, Zaragoza) tras una centrifugación a 2000 g durante 15 min (4°C).
- El *buttermilk* se obtuvo mediante el batido, con una batidora Moulinex de tipo doméstico, a partir de nata cruda de vaca previamente lavada, produciéndose

primero el montado de la nata y después, la inversión de fases que dio lugar a la mantequilla lo que provocó la liberación del *buttermilk*, que se congeló a -20°C hasta su uso.

- La mantequilla obtenida a la vez que el *buttermilk* en el proceso de batido anteriormente descrito, se sometió a un calentamiento de 40°C durante 1 hora. Mediante este proceso se generó aceite de mantequilla y se liberó el resto de membranas que habían quedado atrapadas en los gránulos de la mantequilla en un líquido denominado *butterserum* (BS), que se separó por decantación de la mantequilla. El BS se combinó en algunos casos con el BM y tras centrifugar a 40.000 g durante 1 hora a 4°C se obtuvo un precipitado pardo que contenía la MFGM.

IV.1.b Fase de lavado

Esta operación tiene como fundamento eliminar las impurezas de naturaleza proteica, fundamentalmente las caseínas y proteínas del lactosuero, que quedan en la muestra de partida, bien sea grasa de leche o *buttermilk* en polvo.

En primer lugar, se lavó la muestra (grasa en caso de leche o precipitado en el caso de los *buttermilk* comerciales) con 3 volúmenes de una solución al 0,9% de cloruro sódico (155 mM) a 4°C durante 40 min. Tras el lavado se centrifugó a 2700 g durante 12 min a 4°C. Después de la operación de centrifugación:

- Para la NO y NV: se obtuvo grasa en la zona superior del tubo quedando la solución de lavado en la zona inferior. Se decantó la fase inferior y se continuó con la superior.
- Para la α -BM, β -BM, W-BM y M-BM: se obtuvo un precipitado blanco con el que se continuó tras desechar el sobrenadante.

Tras este primer lavado se repitió la operación, realizando el segundo lavado con 5 volúmenes de agua mili-Q.

IV.1.c Fase de extracción

Las muestras de NO y NV que contenían la MFGM con su estructura íntegra, se llevaron a congelación a -20°C durante 5 min y se sometieron a una vigorosa agitación en vortex con unos 5 ml de una solución de citrato de sodio al 2% y etanol al 5%. Tras

este proceso se obtuvo un líquido blanco espumoso y una grasa más moldeable. De una mezcla de estas dos fases se tomó 1 ml, al que se añadió 1 ml de una solución de Tritón X-100 al 2% o SDS al 2%, dejándose en ultrasonidos durante 15 min. Después se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 10 min a 4°C, obteniéndose un precipitado blanquecino y un sobrenadante. Los precipitados se disolvieron en los siguientes tampones:

- Tampón de electroforesis del Phast System: Tris-HCl 10 mM, pH 8, con EDTA 1 mM cuando las muestras se iban a analizar por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)
- Tampón de rehidratación para isoelectroenfoque: 4% CHAPS, urea 7 M, tiourea 2 M y 2% de tampón IPG (GE Healthcare Europe, Freiburg Alemania).

Posteriormente, se observó que al tratar las muestras sin la etapa de congelación y sin la solución de citrato-etanol se obtenía un mayor rendimiento. Tras esta experiencia se omitieron los pasos de congelación-agitación con citrato y etanol, y al tratar las muestras con ultrasonidos se utilizó SDS al 2%.

Los BM comerciales contenían muchas impurezas para realizar una electroforesis en 2D por lo que hubo que aplicar una última etapa de optimización.

IV.1.d Fase de optimización

Esta fase se realizó mediante una precipitación con acetona o cloroformo y/o ácido tricloroacético (TCA) en acetona, para la eliminación de contaminantes que pudieran interferir en la visualización de las proteínas de la MFGM. En el caso de la utilización de la solución de acetona y TCA, se utilizaba una muestra líquida, que podía estar constituida por:

- Los sobrenadantes obtenidos tras centrifugar (10.000 g, 15 min, 4°C) las muestras sometidas a ultrasonidos con detergente.
- Los precipitados disueltos en el tampón de rehidratación bajo ultrasonidos durante 1 hora. Generalmente, los volúmenes finales fueron de unos 100 µl, salvo para α -BM y M-BM que fueron de 300 µl.

A las muestras se les añadió el triple de volumen de acetona o de TCA al 10% en acetona a -20°C, manteniendo las muestras a dicha temperatura durante al menos 2-3 horas. Tras este tiempo, se observó una suspensión inferior blanca con forma de ovillo de lana, esta mezcla se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4°C. La fase grasa

superior se eliminó junto con la fase líquida intermedia que cubría un precipitado blanco que se conservó. Este precipitado se lavó con acetona para retirar los restos de TCA y se secó al aire o con corriente de nitrógeno.

Después, se disolvió el precipitado, bien en el tampón de Phast System (cuando se iba a hacer una SDS-PAGE) o bien en la solución de rehidratación del isoelectroenfoco (cuando se iba a hacer una 2DE), bajo ultrasonidos durante al menos una hora. Tras esta etapa de ultrasonidos, se centrifugó a 10.000 g durante 10 min quedando tres fases: una fase inferior formada por un precipitado e impurezas de naturaleza micelar, una fase intermedia que contenía las proteínas de la MFGM y una fase superior formada por grasa libre. Tras la centrifugación, se dejaron los viales eppendorf en nevera al menos durante 30 min y se tomó el sobrenadante intermedio para realizar la electroforesis en 2D.

IV.2 Caracterización de las proteínas de la MFGM por electroforesis

Para este objetivo se han utilizado dos tipos de electroforesis, una SDS-PAGE y una electroforesis en dos dimensiones (2DE) con isoelectroenfoco en la primera dimensión y SDS-PAGE en la segunda dimensión. La primera caracterización que se realizó con SDS-PAGE tenía como objetivo seleccionar los mejores métodos de extracción de las proteínas de la MFGM y/o comparar las muestras entre sí. La electroforesis en 2D se realizó con el fin de obtener una caracterización más completa de la muestra, puesto que las proteínas se identificaban así por el peso molecular y por el punto isoelectroforético.

IV.2.a Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Es una técnica de separación electroforética de proteínas por peso molecular, y en este trabajo se ha realizado en geles de poliacrilamida de diferentes porcentajes, con SDS y en condiciones reductoras con mercaptoetanol. Esta técnica se llevó a cabo en dos equipos diferentes:

- Phast System (Amersham Biosciences, actualmente GE Healthcare)
- Miniprotean Biorad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

IV.2.a.1 SDS-PAGE en Phast System

Esta electroforesis se realizó preparando las muestras en la siguiente mezcla:

- 30-50 µl de la muestra de proteínas
- 20-40 µl de tampón de electroforesis (Tris-HCL 50 mM, pH 8, 1 mM EDTA)
- 5-10 µl de SDS al 25%
- 2,5-5 µl de mercaptoetanol

Esta mezcla se sometió a 100°C durante 2 min, y mediante un peine se aplicó un volumen de 1 µl de muestra en el gel. Todas las electroforesis fueron realizadas en geles de 7,5% de poliacrilamida. Las condiciones de electroforesis fueron:

- ✓ Etapla 1: 250 V, 10 mA, 3W
 - ✓ Etapla 2: 250 V, 1 mA, 3W
 - ✓ Etapla 3: 250 V, 10 mA, 3W
- } 15°C

IV.2.a.2 SDS-PAGE en Miniprotean Biorad

Para llevar a cabo la electroforesis en este equipo las muestras se disolvieron en el tampón de electroforesis con la siguiente composición:

- 3,55 ml de agua mili-Q
- 1,25 ml de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
- 2,5 ml de glicerol al 30%
- 2,0 ml de SDS al 10%
- 0,2 ml de azul de bromofenol

A 950 µl de esta solución se le añadieron 50 µl de mercaptoetanol, y esta solución final se mezcló equivolumétricamente con las muestras.

El gel estaba compuesto por una zona de *stacking gel* del 7% de poliacrilamida y otra zona de *running gel*, del 10%. Para analizar las muestras obtenidas de las hidrólisis se usaron geles comerciales con un gradiente del 4-20 % de poliacrilamida (GE Healthcare).

La electroforesis se desarrolló a 100 V hasta que las muestras entraron completamente en la zona de *stacking* y a 150 V durante el resto de la electroforesis. Estas condiciones se aplicaron cuando se utilizó un solo gel, cuando se realizaron las electroforesis con dos geles se aumentó en un 40% el voltaje.

IV.2.b Electroforesis en dos dimensiones (2D)

Este proceso se compone de dos etapas fundamentales:

- I. Isoelectroenfoque: Electroforesis realizada para separar proteínas por su punto isoeléctrico. Para esta prueba se utilizaron tiras comerciales de GE Healthcare de rango de pI de 3-11.
- II. SDS-PAGE: Electroforesis que separa proteínas según su tamaño. En esta prueba la muestra se transfirió desde la tira del isoelectroenfoque al gel de poliacrilamida.

IV.2.b.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque

La muestra se disolvió en el tampón de rehidratación, a 150 µl de muestra se le añadieron 1 mg de DTT y 10 µl de una solución que contenía bromofenol al 0,2% y Tris 0,125 M. De esta mezcla, se distribuyeron 125 µl en forma de minúsculas gotas a lo largo del sarcófago de cerámica donde se iba a llevar a cabo la separación.

El gel utilizado en forma de tira de 7 cm con un gradiente de pI de 3-11 se conservaba deshidratado y en congelación, tal como lo suministra la casa comercial. La tira se colocó con el lado del gel boca abajo dentro del sarcófago haciendo contacto con las muestras que se habían depositado en gotitas en toda su longitud. La tira se cubrió con un aceite comercial llamado *cover fluid* (GE Healthcare) que impide la evaporación de la muestra, y el soporte donde se alojaba el sarcófago se tapó con una cubierta de plástico. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en un equipo Multiphor II de la casa Amersham Biosciences.

El proceso del isoelectroenfoque se llevó a cabo en dos etapas:

- A. Rehidratación que tuvo lugar a 20°C durante 14 horas
- B. Isoelectroenfoque, que se desarrolló a 50 mA (por cada gel) durante 2 horas

IV.2.b.2 Segunda dimensión: SDS-PAGE

Tras el isoelectroenfoque, la tira se sometió a dos etapas de reequilibrado, primero dentro de un tubo que contenía 5 ml de una solución de reequilibrado compuesta por urea 6 M, glicerol al 30%, SDS al 2% y azul de bromofenol con DTT (100 mg en 10 ml), y en segundo lugar se llevó a cabo otra etapa de reequilibrado con la

misma solución anterior (5 ml) pero con iodoacetamida (250 mg en 10 ml). En ambos casos se dejó la tira 15 min en agitación.

Tras el reequilibrado se depositó la tira sobre un papel humidificado con agua mili-Q, durante unos 10 min, para que perdiera el exceso de solución de reequilibrado. Después se sumergió en el tampón donde se llevó a cabo la electroforesis, que es una disolución en agua mili-Q de Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, pH 8, con SDS al 0,1%, y se colocó sobre el gel de poliacrilamida (10% ó 12,5%), evitando la formación de burbujas. También se introdujo un cuadradito (de aproximadamente 7 mm) de papel de filtro Whatman 3 mm (Maidstone, Gran Bretaña) impregnado en una solución patrón de pesos moleculares altos, HMW standard, de la casa GE Healthcare. Por último, se selló con agar al 0,5% en el tampón donde se llevó a cabo la electroforesis, dejándose solidificar antes de proceder a la electroforesis.

La electroforesis se llevó a cabo a una intensidad de 15 mA hasta que las muestras pasaron de la tira al gel y avanzaron en éste unos milímetros, y a 45 mA hasta el final del proceso. En el caso de realizar la electroforesis con dos geles la intensidad se aumentó en un 40%.

IV.3 Obtención y evaluación de los antisueros frente a butirofilina

Otro de los objetivos de este TFM era la obtención de anticuerpos específicos frente a las proteínas de la MFGM, en concreto frente a la butirofilina, para poder estudiar sus niveles según los tipos de extracción de las MFGM y en las diferentes muestras de *buttermilk* comerciales. Los anticuerpos también se han utilizado en un Western-blotting para la identificación de la butirofilina en diferentes muestras de hidrolizados.

La obtención y caracterización de los antisueros se ha llevado a cabo en dos etapas:

- A. Inmunización de los conejos con las proteínas separadas por electroforesis
- B. Obtención de los antisueros y titulación

IV.3.a Inmunización

Los procedimientos de inmunización se realizaron bajo el proyecto con licencia PI48/10 aprobado por el Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El cuidado y uso de los animales se llevó a cabo de acuerdo

con la Normativa española de Protección Animal RD1201/05, de acuerdo con la Directiva de la Unión Europea 86/609.

Se extrajeron varias bandas que correspondían con la butirofilina de un mismo gel de electroforesis, mediante el corte con un bisturí estéril. Estas bandas se trituraron mediante un homogeneizador de vidrio con 0,5 ml de tampón fosfato potásico 15 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (PBS) estéril y se mantuvieron en congelación hasta su utilización.

La inmunización del conejo se realizó según el siguiente protocolo: la muestra que se le inyectó consistía en 0,5 ml de la mezcla obtenida tras triturar las bandas con PBS como se ha descrito, en la primera inmunización mezclándola con 0,5 ml del adyudante de Freund completo (Sigma-Aldrich St. Louis, MI, EE.UU), y en las siguientes inmunizaciones con adyudante de Freund incompleto (Sigma-Aldrich). En ambos casos tras añadir el adyudante al homogeneizado, la emulsión se sometió a ultrasonidos tres veces durante 15 segundos cada vez.

La emulsión se inyectó al conejo con una jeringuilla estéril de forma subcutánea, en cinco o seis inoculaciones. A partir de la primera inmunización, cada dos semanas se extrajeron hasta un máximo de 60 ml de sangre mediante una cánula en la vena auricular. A las dos semanas de la extracción se realizó otra inmunización y el ciclo se repitió mensualmente.

IV.3.b Obtención de los antisueros

La sangre extraída de los conejos se dejó coagular a temperatura ambiente durante varias horas y a continuación se mantuvo una noche a 4°C para una buena retracción del coágulo. Por último, se separó el suero por centrifugación a 1000 g durante 10 min y se congeló a -20°C.

IV.3.c Titulación de un antisuero: técnica de ELISA no competitivo indirecto

El objetivo de este ensayo es determinar qué dilución del antisuero es la óptima para realizar el ELISA competitivo indirecto, así como evaluar el título de todas las extracciones. Para ello, se recubrieron las placas con 120 µl/pocillo de una solución de 5 µg/ml de las muestras de BM o BS de vaca en tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,6, y se incubaron a 4°C durante toda la noche.

Después, se lavaron las placas cinco veces con 300 µl/pocillo de agua destilada. A continuación, las placas se incubaron con 300 µl/pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v) en tampón fosfato potásico 15 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (PBS) a temperatura ambiente durante 2 horas, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas de la placa. Después, se lavaron las placas tres veces con agua destilada y se dejaron secar en el caso de que no se fueran a utilizar inmediatamente. Antes de continuar con la siguiente etapa, las placas se lavaron tres veces con PBS conteniendo 0,05% Tween-20 (PBST).

Después, se incubaron las placas con 100 µl/pocillo de diferentes diluciones del antisuero frente butirofilina, desde 1/2 hasta 1/2¹⁵, a 37°C durante 30 min, tras la incubación se lavaron las placas 5 veces con PBST y se incubaron los pocillos con 100 µl/pocillo de una dilución 1/4000 de IgG de cabra anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa (Sigma-Aldrich) en tampón PBS, y se incubaron a 37°C durante 30 min.

Tras la incubación con el antisuero se lavaron las placas cinco veces con PBST, se añadieron 100 µl/pocillo de una solución del sustrato comercial (ZEU -Inmunotec, Zaragoza, España) que contiene tetrametilbencidina (TMB) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2 M.

Finalmente, se midió la absorbancia de los pocillos a 450 nm en un lector de placas ELISA (Labsystem Multiscan MS, Helsinki, Finlandia) y se representó la relación existente entre la absorbancia y el logaritmo en base 2 de la dilución del suero.

IV.3.d Determinación de la concentración de butirofilina por ELISA competitivo

Se han realizado dos tipos de ELISA con los anticuerpos obtenidos, un ensayo no competitivo indirecto, y un ensayo competitivo indirecto. Mientras que el primer ensayo tuvo como objetivo demostrar la reactividad del suero, mediante el segundo se pretendía estimar la cantidad de butirofilina en diferentes *buttermilk* comerciales en polvo y disponer de una técnica para determinar esta proteína en posteriores estudios.

Para ello, se realizaron los lavados y las tres primeras etapas como en un ELISA no competitivo: recubrir la placa con BM, incubar con antisuero frente a butirofilina, incubar con antisuero frente a IgG de conejo y revelar con el sustrato. Sólo que en este caso la segunda incubación con el primer antisuero se hizo en competición con

diluciones de *buttermilk* comerciales y diferentes diluciones de BM de vaca como estándares, concretamente, 1/2, 1/5 y 1/10. La otra diferencia de esta técnica, respecto al ELISA no competitivo, es que el blanco se lleva a cabo mediante la incubación del suero frente a la butirofilina sin añadir la muestra de BM.

La técnica se calibró incluyendo la curva patrón mediante la diferencia de absorbancia entre el suero incubado sin BM y la medida en las muestras en las que se había incubado el antisuero con las diferentes diluciones de BM. Con esta relación señal de absorbancia-cantidad de butirofilina se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos en las medidas de las BM comerciales y se estimó su contenido en butirofilina.

IV.3.e Western-blotting

Esta técnica permite identificar mediante anticuerpos una proteína en una mezcla proteica sometida a una electroforesis y transferida a una hoja de nitrocelulosa (Biorad). Primero se realizó una SDS-PAGE en el equipo de Biorad como se ha indicado previamente, con la serie de muestras por duplicado. Cuando concluyó la electroforesis, se cortó el gel por la mitad, cada una de las mitades conteniendo la serie completa de muestras, una parte se llevó a tinción con azul de Coomassie y la otra se sometió a la transferencia.

Previamente a la finalización de la electroforesis, se cortaron 6 papeles de filtro Whatman 3 mm y uno de nitrocelulosa (Biorad), de tal forma que tuvieran las mismas dimensiones que el gel que se iba a someter a la transferencia y se sumergieron en las siguientes diluciones:

- 1 papel Whatman en un tampón Tris-HCl 0,3M pH=10,4 y metanol al 10%
- 2 papeles Whatman en un tampón Tris-HCl 25 mM pH=10,4 y metanol al 10%
- Papel de nitrocelulosa en agua mili-Q
- 3 papeles Whatman en un tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 40 mM y metanol al 10%

Inmediatamente al terminar la electroforesis, se colocaron en el equipo de transfer (Amersham Biosciences) los papeles, eliminando el exceso de líquido, en el mismo orden que se ha indicado arriba, el gel se situó entre los tres últimos papeles de Whatman y el de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo a una intensidad de 52 mA (2,5 mA/cm² de gel) durante 20 min.

Tras la transferencia, el papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se incubó con ovoalbúmina al 5% en el tampón NaCl 150 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, K_2HPO_4 8,3 mM, pH=7,4 (TF) durante 30 min, para saturar el papel de nitrocelulosa y minimizar fijaciones inespecíficas. El gel se sometió a tinción para comprobar que las proteínas se habían transferido correctamente. Tras la saturación con la ovoalbúmina, la nitrocelulosa se lavó cinco veces con TF durante dos minutos por lavado, y después se incubó 1 hora con el suero antibutirofilina diluido 1/100 en ovoalbúmina al 3% en TF. A continuación, se volvió a lavar la nitrocelulosa cinco veces con TF y se procedió a la segunda incubación con un antisuero anti-IgG diluido 1/1000 en ovoalbúmina al 3% en TF y tras este paso se lavó de nuevo siguiendo el mismo procedimiento que en los lavados anteriores. Por último, el revelado se realizó incubando la nitrocelulosa durante 8 min con una solución que contenía 6 mg de 4-cloronafol, 8 ml de TF, 2 ml de metanol y 10 μl de H_2O_2 al 33%.

IV.4 Digestión gastrointestinal *in vitro*

IV.4.a. Hidrólisis con pepsina

Para realizar la hidrólisis se preparó un medio que simulaba el fluido gástrico SGF (*simulated gastric fluid*) y que contenía NaCl 35 mM con un pH de 2.

El proceso de digestión se llevó a cabo a 37°C en un baño con la siguiente mezcla en agitación:

- 10 ml de muestra
- 5 ml de SGF (pH=2)
- Un volumen de HCl 0,1 N necesario para ajustar el pH a 2 (fue como mínimo de 2 ml)

La muestra se sometió a ultrasonidos durante 10 min, se atemperó a 37°C y se tomó una alícuota de 2 ml de la mezcla para evaluar si las condiciones del medio alteraban la muestra, es decir, como un control de muestra sin pepsina. Tras tomar esta alícuota se adicionaron al medio las muestras indicadas en la siguiente tabla:

MUESTRA	Conc. proteica (mg/ml)	Proteínas a digerir (mg)	Pepsina adicionada (mg)	Proteína (mg)/ pepsina (mg)
BMV	0,15	3,3	16	0,21
BSV	0,6	6,6	16	0,41
α -BM	4,60	5,06	225	0,02
β -BM	3,95	4,35	200	0,02
W-BM	4,35	4,79	225	0,02
M-BM	6,47	7,12	325	0,02

Tabla 4: Composición protéica de las muestras sometidas a hidrólisis

Cuando la mezcla quedó completamente disuelta se procedió a llevar a cabo la digestión. Se extrajeron muestras a los tiempos 0, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min (en algunos experimentos también se extrajeron muestras a las 18 y 24 horas de hidrólisis) y se neutralizaron con el mínimo volumen posible de una solución de NaOH 4 y 1 N hasta llegar a un pH \geq 6,5, en el que la pepsina ya no presenta actividad.

Durante el experimento también se realizó un control de la estabilidad del enzima compuesto por SGF, HCl y pepsina en las mismas proporciones que en las muestras pero sustituyendo la muestra por agua y que se mantuvo en la estufa a 37°C durante todo el tiempo que duraron los experimentos de hidrólisis (4 ó 24 horas), y cuando concluyó la experiencia se neutralizó.

El análisis cualitativo de la digestión con pepsina de las diferentes muestras de *buttermilk* se llevó a cabo mediante una electroforesis en gradiente 4-20% y el análisis cuantitativo se realizó determinando el grado de hidrólisis (mg NH₃/g proteína). Para realizar la electroforesis se conservó una parte de las muestras en congelación sin ser sometidas a una centrifugación previa. No obstante, para el experimento del grado de hidrólisis era necesario centrifugar la muestra con el fin de limpiarla de impurezas, por lo que, tras una centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 4°C se obtuvo una suspensión blanquecina sobre un sobrenadante transparente que contenía un precipitado. Mediante una jeringuilla se separó el sobrenadante del precipitado y la suspensión blanquecina, conservándose por separado las fases.

IV.4.b. Determinación de proteína por BCA

Previamente a la hidrólisis era necesario conocer la cantidad de proteína que contenían las muestras a fin de añadir la cantidad de pepsina proporcional, para lo cual se realizó el ensayo del ácido bicinchónico BCA, utilizando el kit comercial de Pierce (Meridian, Rockford, IL, EE.UU). Esta técnica se basa en una reacción colorimétrica en

la que el Cu^+ forma un complejo coloreado con el BCA, este Cu^+ procede de la reducción en medio básico de sales de Cu^{2+} por los nitrógenos de los grupos amidas de las proteínas y la unión del Cu^+ .

Se tomaron 25 μl tanto de los patrones, de 0 a 2 mg/ml de BSA, como de las muestras a los que se añadieron 200 μl del reactivo, compuesto por una mezcla 50:3 (v:v) de los reactivos A y B del kit. Tras incubar a 37°C durante 30 min se midió la absorbancia a 550 nm en el lector de ELISA. Las medidas de los patrones se realizaron por duplicado, y las muestras por triplicado. Los resultados se obtuvieron mediante interpolación matemática de los valores en la recta patrón.

IV.4.c. Determinación del grado de hidrólisis (DH) mediante TNBS

El método se desarrolló como fue descrito por Adler-Nissen y Spellman (24, 25). Se utiliza para determinar las aminos primarias, el ácido 2,4,8-trinitrobenzosulfúrico que es un compuesto capaz de reaccionar en medio básico con ellas alterando su color, lo que lo hace susceptible de ser utilizado para cuantificar los niveles de aminos primarias, sustancias que se van generando en la hidrólisis gástrica de las muestras. Al tratarse de un experimento espectrofotométrico es necesario calibrar la relación señal:analito, y para ello se utilizó una solución de L-leucina como patrón y se prepararon soluciones de 2, 1,5, 1, 0,5 y 0,25 mM, que se corresponden con 28, 21, 14, 7 y 3,5 mg NH_3/l , respectivamente.

El experimento se desarrolló adicionando 250 μl de muestras o patrón a 2 ml de una solución de fosfato 0,2125 M, pH=8,2, después se añadieron 2 ml de una solución de TNBS (Sigma-Aldrich) al 0,1% y se incubó la mezcla a 50°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se adicionaron 4 ml de HCL 0,1 N y las muestras se dejaron enfriar durante 30 min a temperatura ambiente, protegiéndolas de la luz, tras lo cual se procedió a medir la absorbancia de cada punto por triplicado, a una longitud de onda de 340 nm en un espectrofotómetro.

A partir de la relación ABS-mg NH_3/l (que equivale a la cantidad de aminos primarias) se obtuvo la cantidad de mg NH_3/l de cada punto de la digestión y del control de muestra, para el cálculo también se utilizó el volumen de muestra y la masa de proteínas en las alícuotas extraídas. El grado de hidrólisis se determinó mediante el cociente obtenido entre la diferencia entre las concentraciones del control de muestra (AN0) y de las muestras extraídas a cada tiempo (ANt), teniendo en cuenta la dilución

de la muestra (F.D), su volumen y la cantidad de proteínas que contenía. Los datos obtenidos se aplicaron en la siguiente fórmula:

$$DH = \frac{(ANt - AN0) \cdot F.D \left[\text{mg} \frac{\text{NH}_3}{\text{l}} \right] \cdot \text{Vol. muestra [l]}}{\text{cantidad de proteína [g]}}$$

IV.5 Ensayo de actividad antimicrobiana

En este TFM se ha realizado una prueba preliminar para evaluar la posible existencia de actividad antimicrobiana de los péptidos generados en la hidrólisis de los *buttermilk*. El ensayo consistió en la incubación, a 4 y 8 horas, de una suspensión de *Cronobacter sakazakii* con soluciones del hidrolizado a diferentes concentraciones.

El ensayo se realizó en una campana de flujo laminar (salvo para medir la turbidez), partiendo de una colonia de una placa conservada a 4°C, se realizó primero una siembra en 10 ml de medio triptona-soja (TSB) con extracto de levadura (YE) y se incubó durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente se tomaron 20 µl del medio de cultivo y se sembraron por agotamiento en una placa de agar triptona-soja (TSA)+YE que se llevó a incubar a 37°C durante 24 horas. De esa placa se tomó con un asa de siembra una colonia que se llevó a 50 ml de TSB, dicho caldo sería la suspensión bacteriana de partida.

Se realizaron 3 diluciones decimales (1 ml en 9 ml de agua de peptona, AP, al 0,1%) de la suspensión de partida. De esta dilución, se tomaron 20 µl que se sembraron por extensión en placa a fin de conocer las UFC/ml de la suspensión con la que se realizaba el ensayo.

De la suspensión bacteriana de partida se sembraron 100 µl/pocillo en una placa estéril de 96 pocillos, incluyendo una muestra para control y cuatro muestras con los hidrolizados, todo por triplicado. A la muestra control se le añadieron 100 µl de PBS estéril y las muestras de hidrolizado se añadieron en un volumen de 100 µl de un hidrolizado de BM obtenido de NV, sometido a centrifugación y filtrado por 0,22 µm, diluido al 40, 60 y 80%, y directamente al 100%. El diluyente para las muestras de tratamiento fue PBS estéril. Se midió la turbidez a 640 nm en el lector ELISA al comienzo y durante el ensayo.

Las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas, tras las cuales se volvió a medir la turbidez. De cada pocillo se tomaron 50 µl, previa homogeneización de la muestra con la micropipeta. Estos 50 µl se diluyeron 1000 veces en AP al 0,1%, y de dicha dilución se sembraron 20 µl por el método de la gota en placas de TSA+YE. La placa

del ensayo se volvió a incubar a 37°C y las placas de agar se incubaron también a 37°C durante 24 horas. A las 8 horas de tratamiento se volvió a repetir la operación de medida de turbidez y de toma de muestra con su siembra e incubación correspondientes, como a las 4 horas. Al día siguiente se realizó el contaje de las colonias en las placas, y para los cálculos se tuvo en cuenta el volumen de siembra y las diluciones realizadas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Caracterización de las proteínas de la MFGM

Para estudiar las proteínas de la MFGM se han aplicado varios métodos de extracción, comparándolos con algunos previamente ensayados en el grupo de investigación. En los primeros métodos utilizados se extrajeron las proteínas de la membrana del glóbulo graso por procedimientos fundamentalmente físicos, que demostraron recuperar menor cantidad de proteínas que los métodos químicos, como se aprecia en la Figura 1 comparando las carreras 1 y 2 con las demás. Por ello, tras la comparación de los resultados, se aplicó el método de extracción con detergente que dio como resultado un extracto con mayor cantidad de proteínas, como se aprecia en las carreras 10, 11, 12, 13 y 14. Las bandas señaladas en la imagen con un círculo se corresponden, en la carrera 14, de la superior a la inferior, con la lactaderina, la butirofilina y la xantín-oxidasa. Además de coincidir los pesos moleculares de las bandas con los de dichas proteínas, su identidad se confirmó tras extraer físicamente las bandas e identificarlas por MALDI-TOF y análisis por huella peptídica, identificación que se realizó en la Plataforma Proteómica del Parque Científico de Barcelona.

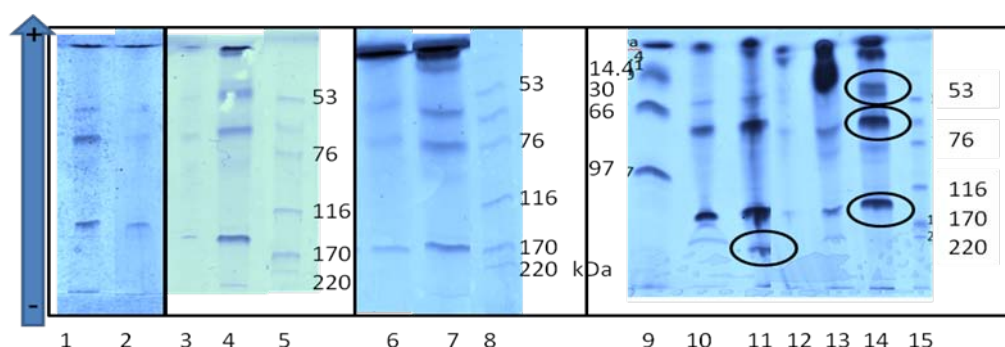


Fig.3: SDS-PAGE en Phast System con geles del 7,5% de poliacrilamida en condiciones reductoras. 1 y 2: NO y NV lavadas y centrifugadas; 3 y 4: NO y NV lavadas y precipitadas con cloroformo-metanol-agua (según 27); 6: la misma muestra que en 3; 7: NO lavada y precipitada con cloroformo-metanol - NaCl 1M; 10 y 11: NO precipitadas con Triton X-100 al 2% sin y con US; 12: mantequilla obtenida por agitación al obtener el BM de vaca; 13 y 14: gránulos y fase líquida del BM de vaca; 5, 8 y 15: Patrón de alto peso molecular (HMW); 9: Patrón de bajo peso molecular (LMW)

El siguiente paso fue comparar el perfil electroforético de las diferentes muestras de *buttermilk* comerciales con los *buttermilk* de las natas de vaca y de oveja y evaluar el efecto de la homogeneización de la nata, como se muestra en la Figura 2.

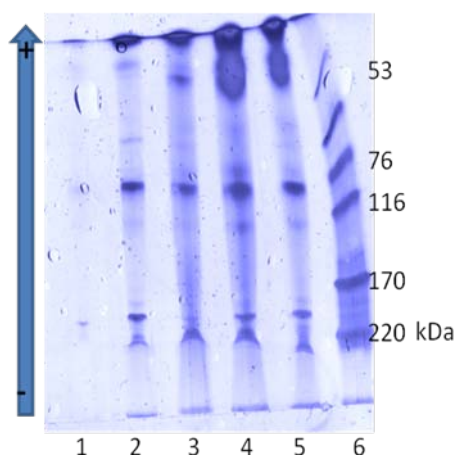


Fig.4: SDS-PAGE en Phast System con geles del 7,5% poliacrilamida en condiciones reductoras; 1: NV homogeneizada; 2: precipitado obtenido con acetona de buttermilk de vaca; 3: α -BM; 4: β -BM; 5: M-BM; 6: Patrón de alto peso molecular (HMW)

Con esta electroforesis se comprueba que la homogeneización provoca una pérdida importante de las proteínas de la MFGM (carrera 1 vs 2). En las muestras de *buttermilk* comerciales, se observó que en todas ellas se mantienen la mayoría de las proteínas de la membrana del glóbulo graso y especialmente una elevada concentración de butirofilina que se corresponde con una banda entre 53000 y 76000 Da del patrón de pesos moleculares. También se pueden apreciar con bastante nitidez dos bandas de elevado peso molecular que corresponderían con la xantín-oxidasa y la mucina, de aproximadamente 146.000 y 160-200.000, respectivamente. Los dos *buttermilk* comerciales que presentan más proteínas de la MFGM son el β -BM y el M-BM, aunque también contienen más proteínas contaminantes del lactosuero y caseínas.

En la siguiente etapa se intentó mejorar las electroforesis eliminando las impurezas como lípidos, flóculos en suspensión y fosfolípidos, que están presentes en las muestras enriquecidas en proteínas de la MFGM, con el objetivo de analizarlas por electroforesis en 2D. Según las instrucciones del equipo de Biorad se recomendaba una precipitación con acetona, que se comprobó que no era suficientemente eficaz, por lo que se llevó a cabo una precipitación a -18°C con TCA y acetona. Este procedimiento dio lugar a la formación de un precipitado amarillento que se redisolvió para comprobar la efectividad del procedimiento mediante SDS-PAGE en el equipo de Phast System. Dada la dificultad en la disolución de las proteínas precipitadas, ésta se llevó a cabo con diferentes compuestos como se indica en la Tabla 5 y los resultados obtenidos en la separación se muestran en la electroforesis de la Figura 5.

MUESTRA	CARRERA	EXTRACCIÓN	MUESTRA	CARRERA	EXTRACCIÓN
Nata de oveja	2	Tampón Phast	BM vaca ↓acetona y ↓TCA	8	Tampón Phast
	3	Urea, CHAPS y DTT		9	Urea, CHAPS y DTT
	4	Mezcla 1:1 de 2 y 3		10	Mezcla 1:1 de 8 y 9
Nata de vaca homogeneizada	5	Tampón Phast	α -BM ↓CHCl ₃ y ↓TCA	11	Tampón Phast
	6	Urea, CHAPS y DTT		12	Urea, CHAPS y DTT
	7	Mezcla 1:1 de 6 y 7		13	Mezcla 1:1 de 11 y 12

Tabla 5: Tratamiento de las diferentes muestras de nata y buttermilk analizadas por electroforesis como se muestra en la Figura 5.

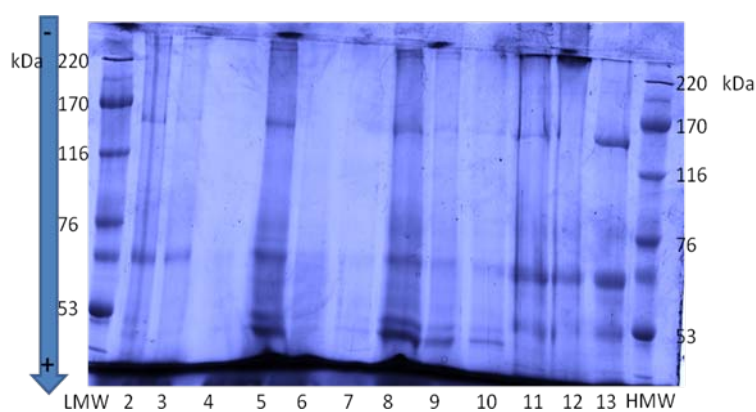
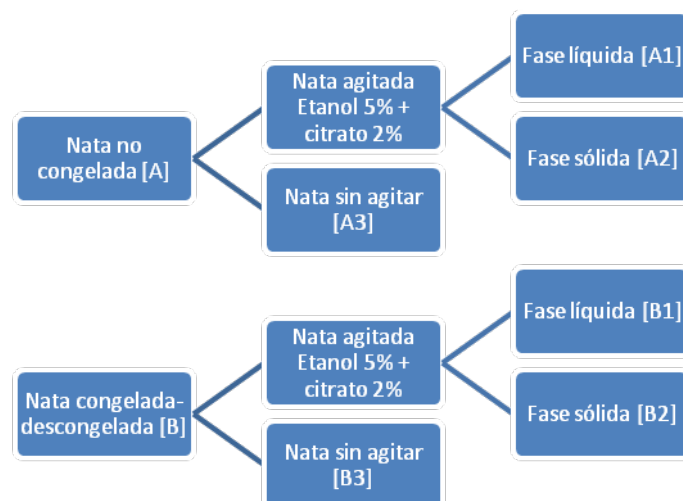


Fig. 5: SDS-PAGE en el equipo de Biorad con geles del 10% de poliacrilamida en condiciones reductoras

Con esta electroforesis se aprecia que la mejor condición de extracción para las muestras tras la precipitación con TCA es mediante la disolución en tampón de electroforesis del Phast (carreras 2-10), salvo para el α -BM (carreras 11-13). Por otra parte, la muestra en la que más proteínas se han conseguido disolver es el precipitado de BM de vaca (carrera 8).

Se planteó un experimento que contemplara varias posibilidades en cada etapa después del lavado para seleccionar el método de extracción más efectivo. Partiendo de una nata lavada de vaca o de oveja, se obtuvieron 24 muestras diferentes; en función de si la nata se sometía a congelación, a agitación para obtener un BM, y de qué fracción se trataba, si la líquida o la sólida del BM. El esquema utilizado fue el siguiente:



Después, cada fase (A₁, A₂, A₃, B₁, B₂, y B₃) fueron sometidas a un tratamiento con Triton X-100 al 2% con ultrasonidos, y centrifugación. Por lo que se obtuvieron seis muestras, tres muestras A, obtenidas de nata no congelada y tres muestras B, procedentes de nata congelada. Los precipitados y sobrenadantes (Sb) obtenidos se disolvieron en diferentes medios.

Las muestras se han denominado con una letra (A o B) y un código de dos cifras, la primera cifra en función de si se agitaba la nata y se trabajaba con la fase líquida o sólida, o si no se agitaba la nata (1, 2 y 3). La segunda cifra indica si ha habido precipitación y el medio de disolución como sigue: (1) muestra disuelta en el tampón del Phast; (2) muestra precipitada con TCA en acetona y disuelta en el tampón del Phast; (3) muestra precipitada con TCA en acetona y disuelta en el tampón de rehidratación.

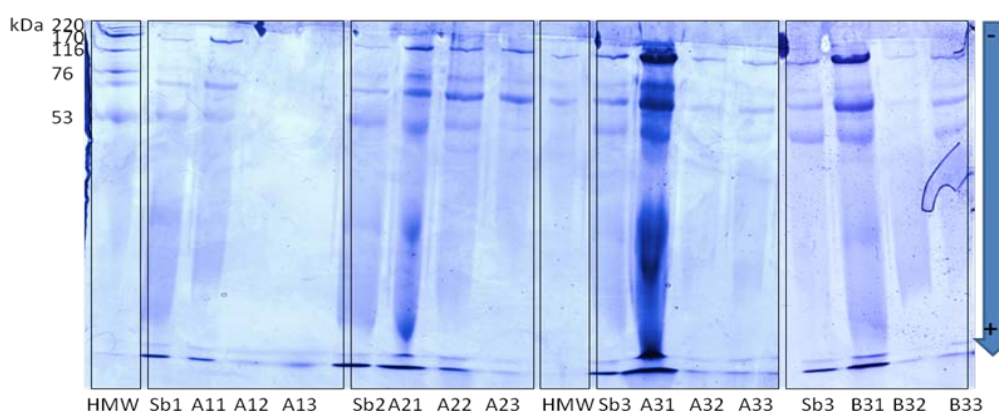


Fig. 6: SDS-PAGE en Biorad con geles del 10% de poliacrilamida en condiciones reductoras de las diferentes muestras obtenidas de nata de oveja

La comparación de los perfiles electroforéticos de las diferentes muestras indica que los sobrenadantes (Sb) todavía contienen proteínas de la MFGM disueltas. Las muestras que más proteínas presentaron fueron las que no habían sido agitadas, el grupo

A₃, más concretamente la disuelta en el tampón de electroforesis del Phast, la A₃₁, y el sobrenadante de esta extracción, el (Sb3) también ha sido el sobrenadante que más bandas contenía.

De las natas que se sometieron a agitación aparecen más proteínas en la fase sólida A₂, y dentro de este grupo en la A₂₁. Se puede concluir que las etapas de agitación y precipitación con TCA hacen que se pierdan proteínas.

Las muestras apenas se diferenciaban entre sí por el aspecto de sus precipitados, salvo aquellas que no fueron precipitadas con TCA/acetona que presentaban un color pardo, que se perdía tras la precipitación con TCA, supuestamente debido a que perdían su contenido en fosfolípidos tras este proceso.

En la Figura 6 se ha adjuntado una parte de la electroforesis de las muestras congeladas, la correspondiente a la nata no agitada (Sb3, B₃₁, B₃₂, B₃₃). Al comparar todas las A₃ con las B₃ se observó que las muestras no congeladas contenían más proteínas que las congeladas-descongeladas.

En la última etapa de la optimización de un método para la extracción de las proteínas de la MFGM se llevó a cabo una comparación entre un método a menor escala (partiendo de 10 ml de nata) y a mayor escala (partiendo de 30 ml de nata) con la NO y la NV. En este proceso la fase de extracción con detergente y su posterior centrifugación se hizo con toda la cantidad de muestra inicial en vez de con alicuotas de 1 ml como se había hecho trabajando a menor escala. Como se aprecia en la electroforesis de la Figura 7 se ve que el método a mayor escala permite obtener un perfil similar de proteínas de la MFGM que el método a menor escala.

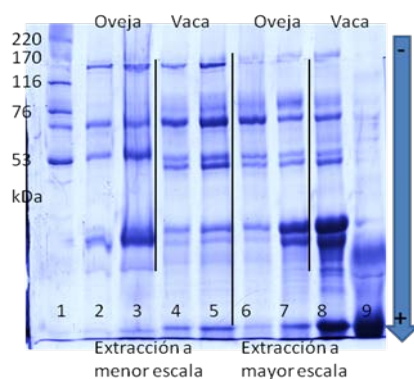


Fig. 7: SDS-PAGE en el equipo de Biorad con geles del 10% de policrilamida en condiciones reductoras; 1: estándares de alto peso molecular ;2 y 3: extracto de proteínas de la MFGM de NO a pequeña escala, precipitado y sobrenadante tras incubación con detergente y ultrasonidos (US); 4 y 5: extracto de proteínas de la MFGM de NV a pequeña escala, precipitado y sobrenadante tras incubación con detergente y US; 6 y 7: extracto de proteínas de la MFGM de NO a mayor escala, precipitado y sobrenadante tras incubación con detergente y US; 8 y 9: extracto de proteínas de la MFGM de NV a mayor escala, precipitado y sobrenadante tras incubación con detergente y US.

Tras una primera caracterización de las proteínas de la MFGM por SDS-PAGE, se realizaron también electroforesis en 2D de las diferentes muestras de *buttermilk* para poder identificar los spots por técnicas de proteómica y comparar los mapas obtenidos entre sí.

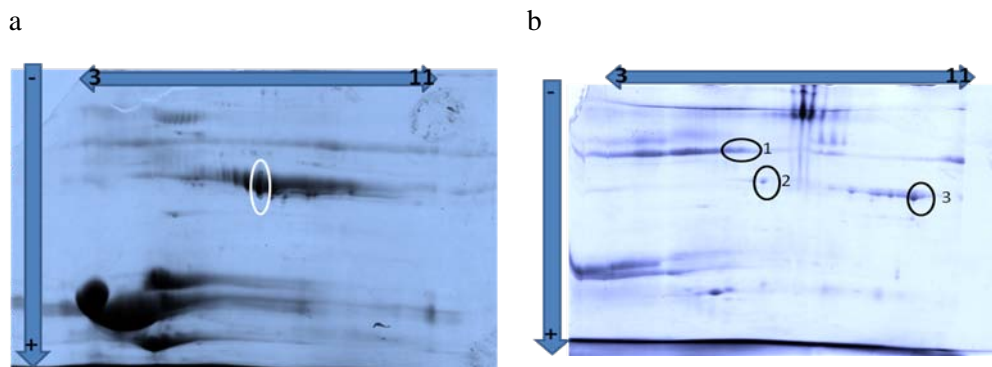


Fig. 8: Electroforesis 2D en un gel de poliacrilamida al 12% de *buttermilk* de NO (8.a) que se corresponde con la muestra de la carrera 3 de la Fig.3 y de un *buttermilk* de NV (8.b).

La electroforesis de la Figura 8.a fue la primera 2DE óptima que se obtuvo en este trabajo, la mancha o spot, señalada con un círculo blanco se identificó mediante análisis por MALDI-TOF y huella peptídica como la lactaderina. En la electroforesis de la Figura 8.b se observó una mayor diversidad de spots que en la de oveja, por lo que se enviaron a analizar los spots que aparecen señalados en la imagen, identificándose con la butirofilina (1), la lactaderina (2) y la adipofilina (3). El resultado de estas electroforesis indicó que el porcentaje de poliacrilamida utilizado podía mejorarse, puesto que las proteínas de la MFGM que pretendíamos caracterizar quedaban en una posición superior, muy cerca de la tira de isoelectroenfoque. Tras esta experiencia se redujo el porcentaje de poliacrilamida al 10% para todas las 2DE.

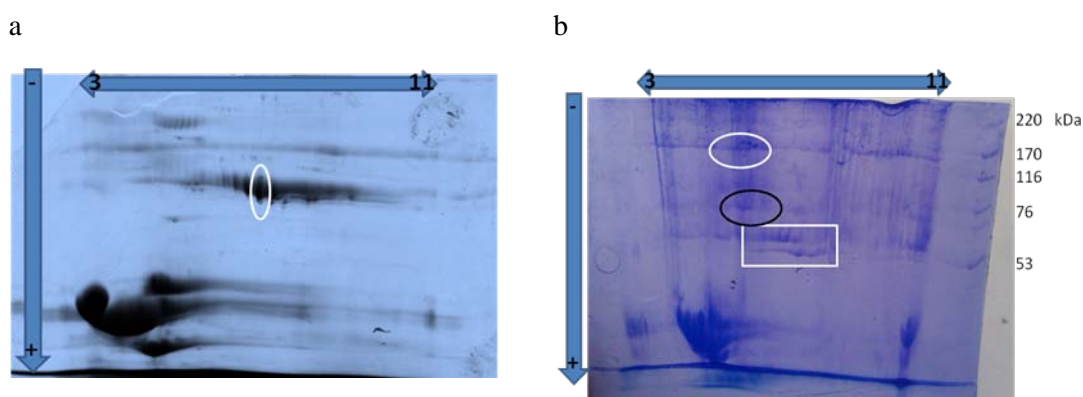


Fig. 9: Electroforesis en 2D de un *buttermilk* obtenido de N.O en un gel de poliacrilamida al 12,5% (9.a) y en un gel al 10% (9.b.)

La comparación de las dos electroforesis nos indicó que se pueden apreciar mejor las diferencias entre las proteínas con un menor porcentaje de poliacrilamida al

haber un menor efecto de tamiz molecular. Se localizaron dos grupos de spots, recuadrados en blanco, en la zona de peso molecular próximo a 53 kDa y pI próximo al de la lactaderina (pI 6,42). Por encima de éste spot, se encuentra el correspondiente a la butirofilina, rodeado en negro, a una altura de unos 66 kDa y con un pI de 4,5. También se han rodeado en blanco una serie de spots de un peso molecular de unos 170 kDa y con un pI algo inferior a 4,5 que se podrían corresponder con la mucina, como se indica en el trabajo de Dewettinck et al. (7).

Se realizó también una caracterización en 2D de muestras de BM comerciales.

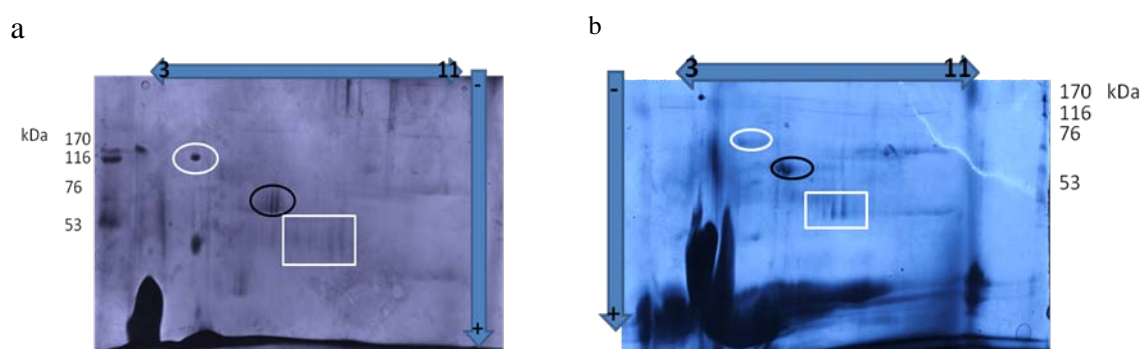


Fig.10: Electroforesis en 2D de α -BM (10.a) y de W-BM (10.b) en gel de poliacrilamida al 12,5%.

En esta electroforesis podemos apreciar que los perfiles electroforéticos de los *buttermilk* comerciales son similares entre sí. En la Figura 10.a aparecen rodeados en negro una serie de spots que por su peso molecular y pI (unos 66 kDa y 4,5, respectivamente) se corresponderían con la butirofilina. Más abajo, y de forma más difusa aparecen una serie de manchas que por su peso molecular y posición en el intervalo de puntos isoeléctricos (53 kDa y 6,4) se podrían identificar como lactaderina, estas manchas aparecen recuadradas en blanco. El resto de spots no se pueden llegar a identificar tan fácilmente como los anteriormente citados, no obstante, y basándonos en la electroforesis en 2D del trabajo de Dewettinck et al. (7), la mancha rodeada en blanco con un pI inferior a 4,5 bien podría tratarse de la PAS III, de 100 kDa.

Para las demás BM comerciales, la β -BM y la M-BM, los resultados de las 2D realizadas (imágenes no incluidas) indican que se debería utilizar algún kit comercial para eliminar de forma más efectiva las interferencias puesto que aparecía un defecto; denominado *steacking* horizontal, que consiste en que los spots forman bandas continuas en el plano horizontal en vez de puntos definidos.

V. 2 Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales frente a la butirofilina

El primer ensayo que se realizó con los antisueros obtenidos del conejo inmunizado con butirofilina fue evaluar su reactividad frente a diferentes fracciones obtenidas de la MFGM. Mediante un ensayo ELISA no competitivo se analizaron los antisueros de la primera (S1) y segunda extracción (S2) frente al *buttermilk* y *butterserum* de vaca.

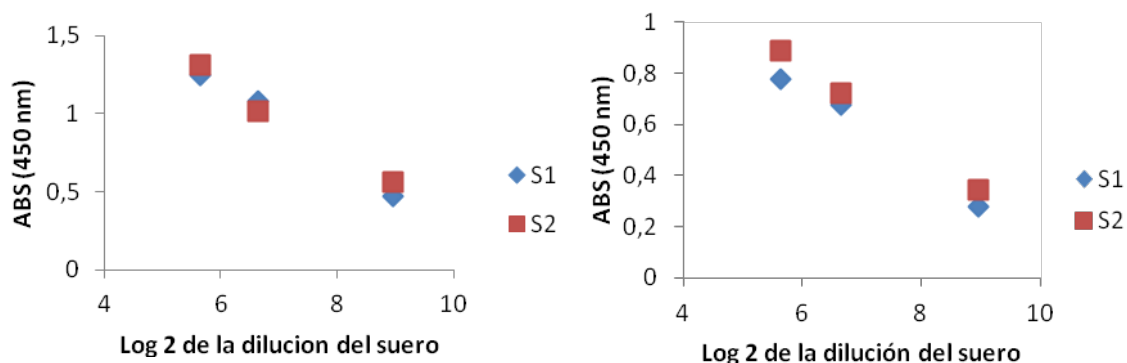


Fig. 11: ELISA directo en el que se enfrentan el antisuero frente a butirofilina bovina de dos extracciones diferentes (S1 y S2) con la fracción de buttermilk de vaca. (11.a) y con la fracción de butterserum de vaca (11.b).

Los antisueros de las dos extracciones mostraron reactividad frente a las fracciones enriquecidas en proteínas de la MFGM, *buttermilk* y *butterserum*, indicando que se había producido una respuesta inmune frente a la butirofilina. Además, la señal de absorbancia obtenida para las dos fracciones resultó coherente con el contenido en proteínas de la MFGM, puesto que el BM es la fracción que más butirofilina contiene, mientras que la otra fracción utilizada resulta ser una fracción enriquecida en lactaderina, pero con menor cantidad de butirofilina, como parecen indicar las electroforesis realizadas. Por otra parte, también se aprecia que la reactividad de la primera y segunda extracción es bastante similar. El siguiente paso fue realizar la titulación de los antisueros obtenidos de diferentes extracciones haciendo reaccionar diluciones seriadas de los antisueros con BM.

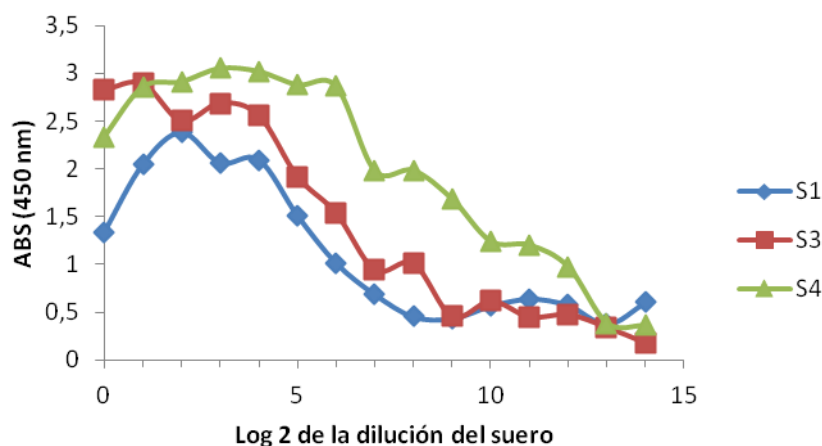


Fig. 12: Curva de titulación de los antisueros específicos frente a la butirofilina bovina procedentes de la primera, tercera y cuarta extracción frente al BM de vaca.

Se realizaron diluciones seriadas desde la dilución $1/2$ hasta la dilución $1/2^{14}$, y también se incluyeron los sueros sin diluir. Hasta la dilución $1/2^8$ se ve que la señal de absorbancia producida por el suero de la tercera extracción es superior a la del suero de la primera extracción. En ambos sueros a partir de la dilución $1/2^4$ hasta $1/2^7$ hay un descenso lineal en la señal, cosa que no ocurre para el suero de la cuarta extracción para el que la señal denota saturación durante las primeras seis diluciones. Para establecer las condiciones óptimas para el ELISA competitivo que se realizó posteriormente para la cuantificación de butirofilina, necesitábamos conocer cuál era la dilución con una señal de absorbancia de entre 1,5 y 2, que nos permitiera tener un amplio intervalo de respuesta. Según la curva de titulación obtenida para el suero de la primera extracción es la dilución $1/2^4$ mientras que para la segunda extracción es $1/2^5$ y para la cuarta extracción la $1/2^9$, siendo éste por tanto el antisuero con el mayor título.

V.2.a Determinación de la concentración de butirofilina bovina mediante ELISA competitivo

Dado que en este trabajo no se ha procedido al aislamiento y purificación de la butirofilina, aunque sí es un objetivo que se está llevando a cabo por otros miembros del grupo de investigación, asumimos una concentración para la butirofilina en el BM de vaca, según datos obtenidos de la bibliografía. Determinamos la concentración de proteína del BM por el método del BCA siendo de 0,155 mg/ml. En el BM la concentración de las proteínas de la MFGM es cinco veces superior a la del lactosuero, por lo que en nuestro BM tendríamos alrededor de 0,023 mg/ml de proteína de la MFGM. Se ha considerado que la butirofilina se encuentra en una proporción de

alrededor del 35% según cita Fong et al (34). Nuestro BM utilizado como estándar contendría alrededor de 8,138 $\mu\text{g/ml}$ de butirofilina.

En la Figura 13 se presenta el ensayo realizado para la determinación de butirofilina en diferentes *buttermilks* donde figura la calibración y las medidas interpoladas:

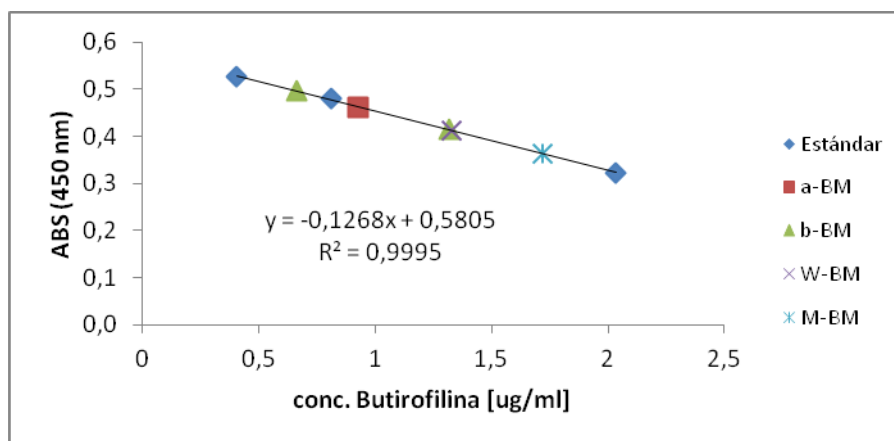


Fig. 13: Calibrado del ELISA competitivo indirecto para la determinación de butirofilina utilizando BM de vaca como estándar a las diluciones 1/2, 1/5, y 1/10. Determinación de butirofilina en muestras de *buttermilk* comerciales.

Para determinar la concentración de butirofilina, se tuvo en cuenta la dilución de las muestras, 1/100 para el α -BM, el M-BM y el β -BM y 1/50 para el W-BM y para el β -BM, los resultados se recogen en la siguiente tabla:

PRODUCTO	Conc. butirofilina \pm SD [$\mu\text{g/ml}$]	Conc. proteica muestra [mg/ml]	% Respecto a la proteína total
BMv	8,14	0,155	5,25
α -BM	92,93 \pm 1,20	46,00	0,20
β -BM	65,79 \pm 12,48	39,54	0,17
M-BM	172,06 \pm 20,14	64,73	0,27
W-BM	66,44 \pm 17,84	43,52	0,15

Tabla 6: Resultados del ELISA competitivo indirecto para la determinación de butirofilina en las BM comerciales, resultados de las medidas realizadas por triplicado.

Con estos resultados se aprecia que las BM comerciales tienen una mayor concentración de butirofilina que la BM de vaca, no obstante, en la relación butirofilina/proteínas la BM de vaca tiene una mayor proporción que las muestras comerciales.

V.3 Digestión gástrica de *buttermilk* y *butter serum*: caracterización cualitativa y cuantitativa de los hidrolizados

V.3.a Digestión gástrica de los *buttermilk* obtenidos a partir de nata cruda de vaca y oveja

Partiendo de nata cruda de vaca y oveja, se obtuvieron el *buttermilk* (BM) y el *butter serum* (BS), como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Para realizar la digestión con pepsina el BM se concentró dos veces por ultrafiltración y el BS se hidrolizó tal y como se había obtenido. A ambas muestras se le adicionaron 16 mg de pepsina y se hizo una digestión durante 4 horas, extrayendo muestras a tiempos determinados. Cuando terminó la hidrólisis se llevó a cabo una electroforesis de todas las muestras extraídas:

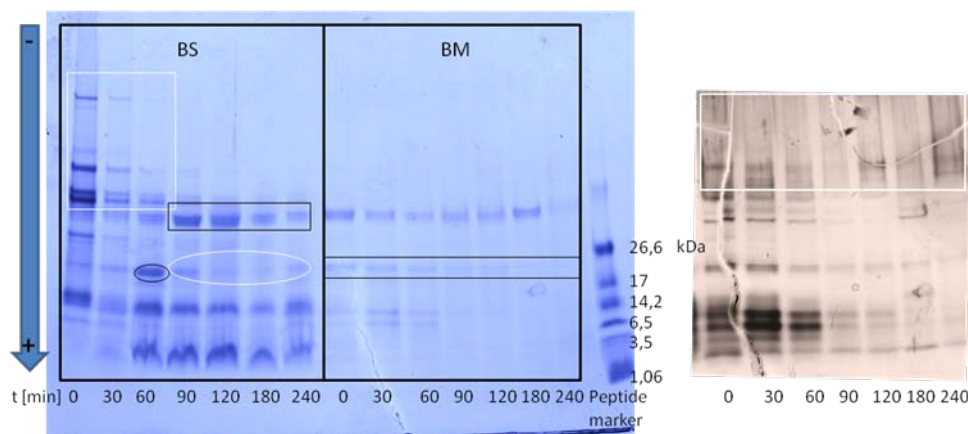


Fig. 14: SDS-PAGE realizada en el equipo de Biorad en gel de poliacrilamida en gradiente 4-20% de los hidrolizados con pepsina de *buttermilk* (BM) y *butter serum* (BS) de vaca

En la Figura 14 se aprecia como durante la digestión con pepsina van desapareciendo las bandas de mayor peso molecular y van apareciendo bandas correspondientes a proteínas más ligeras y péptidos. En el BS de vaca se ve durante los 60 primeros minutos cómo las proteínas más pesadas (recuadradas en blanco) van desapareciendo y se van generando péptidos por debajo de unos 17 kDa (rodeado con un círculo negro en la carrera de 60 min). Aunque antes de la primera hora de hidrólisis ya aparecía una banda en dicha posición, fue a los 60 min cuando alcanzó su máxima concentración. En las tres últimas horas de hidrólisis las bandas de mayor peso molecular de la muestra ya habían desaparecido por completo, la pepsina, recuadrada en negro se observa de forma tenue a la altura de su peso molecular, de 35 kDa, El control del enzima indica que su concentración se mantiene constante a lo largo del proceso. Durante el proceso de hidrólisis, a partir de la tercera carrera correspondiente a los 60

min, la concentración de péptidos ligeros fue aumentando en tal cantidad, que incluso se distorsionó la forma de las bandas.

La digestión del BM de vaca no presentó un patrón de hidrólisis tan claro como el del BS, desapareciendo las bandas más pesadas sin generar aparentemente ninguna ligera, salvo en el caso de los tiempos 30 y 60 min en los que se observó un ligero aumento de un par de bandas de pesos moleculares de aproximadamente 14,2 y 6,5 kDa. Dado que la menor visualización de las bandas en el BM se debe a una menor concentración de las proteínas se realizó una tinción en plata, de mayor sensibilidad. Esta tinción mostró que la hidrólisis del BM genera al principio proteínas y péptidos de entre 14 kDa y 3 kDa.

Las muestras hidrolizadas se sometieron a una determinación de aminos primarias para evaluar el grado de hidrólisis, mostrándose los resultados en la siguiente gráfica:

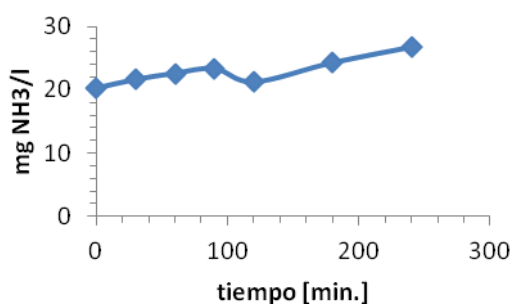


Fig. 15: Niveles de aminos primarios libres a lo largo del tiempo en el proceso de hidrólisis por pepsina del BM de vaca

Esta muestra sometida a hidrólisis presenta un aumento de aminos libres moderado en los primeros 90 min que se incrementan después muy lentamente.

V.3.b Digestión gástrica de los *buttermilk* comerciales

Antes de hacer la hidrólisis con pepsina se realizó una caracterización proteica de las muestras de *buttermilk* comerciales en polvo mediante un análisis electroforético y una determinación proteica. A partir de las muestras disueltas y tras una centrifugación como se indica en el apartado de Materiales y Métodos se obtiene un sobrenadante y un precipitado, siendo todas las fracciones analizadas por BCA y electroforesis.

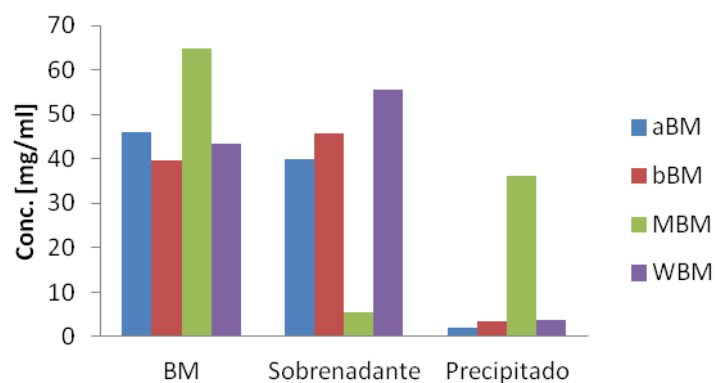


Fig. 16: Niveles de proteína en las diferentes fracciones de los buttermilk comerciales.

Tras esta cuantificación se realizó una electroforesis para determinar el perfil proteico de todas las fracciones de las muestras comerciales.

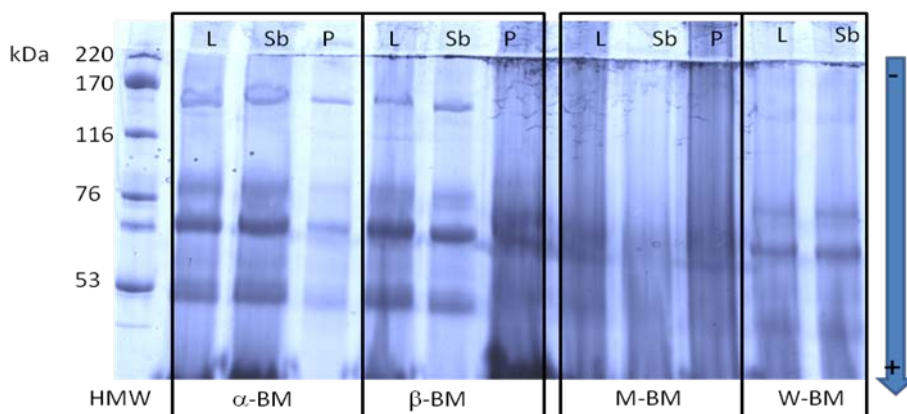


Fig. 17: SDS-PAGE en el equipo de Biorad con geles del 10% de policrilamida en condiciones reductoras de las fracciones de los buttermilk comerciales, donde L: es el buttermilk disuelto, Sb el sobrenadante y P el precipitado tras la centrifugación de L como se indica en Materiales y Métodos. Las muestras L y Sb se diluyeron 1/10.

Como se aprecia en esta figura, el perfil electroforético de los *buttermilk* diluidos 1/10 es similar al de los extractos de proteínas de la MFGM, por lo que se utilizaron estas muestras diluidas para hacer las digestiones *in vitro*.

V.3.b.1 Digestión de α -BM

Se siguió el proceso de digestión que aparece en el apartado de Materiales y Métodos, y tras la hidrólisis se analizaron las muestras por electroforesis.

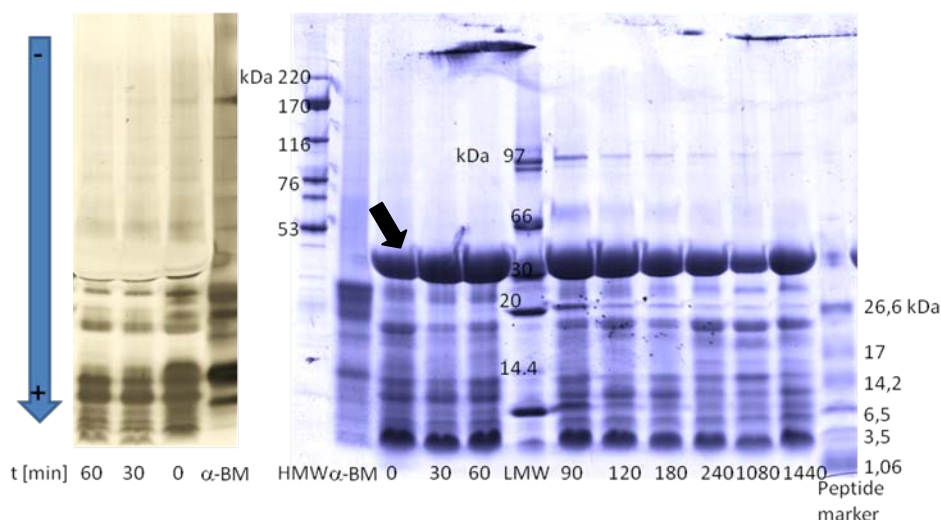


Fig. 18: SDS-PAGE en gel de 4-20% de poliacrilamida desarrollada en el equipo de Biorad de las muestras obtenidas a lo largo del tiempo en el proceso de hidrólisis con pepsina del α -BM diluido 1/10

En esta electroforesis se aprecia cómo evoluciona el perfil peptídico durante una hidrólisis de 24 horas. La banda señalada con una flecha corresponde a la pepsina (35 kDa). Se observa que en el tiempo 0 aparecen algunas bandas de bajo peso molecular (de 22, 14 y 1 kDa) que no están presentes en la muestra inicial, por lo que proceden claramente de la proteólisis. A partir de los 90 minutos aparecen tres bandas a 97, 66 y 26 kDa que se van degradando según transcurre la hidrólisis, aunque no llegan a desaparecer. En la zona inferior del gel a partir de los 90 minutos van apareciendo nuevas bandas entre 26 y 1 kDa. Tras la tinción en azul de Coomasie se hizo otra en plata para apreciar mejor la evolución de las proteínas de la MFGM, de mayor peso molecular.

Como se puede apreciar en la electroforesis teñida con plata, la banda de la butirofilina (situada entre 53 y 76 kDa) es la que más rápido desaparece, a partir de los 60 min ya deja de apreciarse. No obstante a los 90 min aparece otra banda en la zona de su peso molecular, que podría ser butirofilina que ha estado unida a la xantin-oxidasa y que en el proceso de hidrólisis ha sido liberada. Por otro lado, tenemos tres bandas que resisten mejor que la butirofilina la primera hora de hidrólisis, como la lactaderina (banda en torno a 53 kDa) y otra banda de 76 kDa.

Por último, se realizó el análisis mediante reacción con el TNBS de los hidrolizados mostrándose la evolución en la gráfica de la Figura 19:

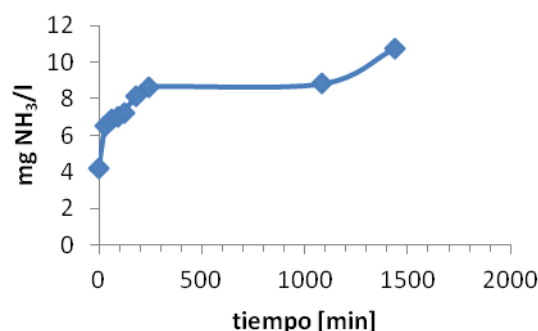


Fig. 19: Niveles de aminas primarias libres a lo largo del tiempo en el proceso de hidrólisis por pepsina del α -BM de vaca diluido 1/50.

La curva, de forma sigmoidea indica que la proteólisis inicial es rápida, posee su mayor pendiente durante las cuatro primeras horas y luego su evolución es más lenta, aunque experimenta de nuevo un aumento al final del proceso.

V.3.b.2 Digestión de β -BM

Se siguió el proceso de digestión que aparece en el apartado de Materiales y Métodos, y tras la hidrólisis se analizaron por electroforesis las muestras extraídas:

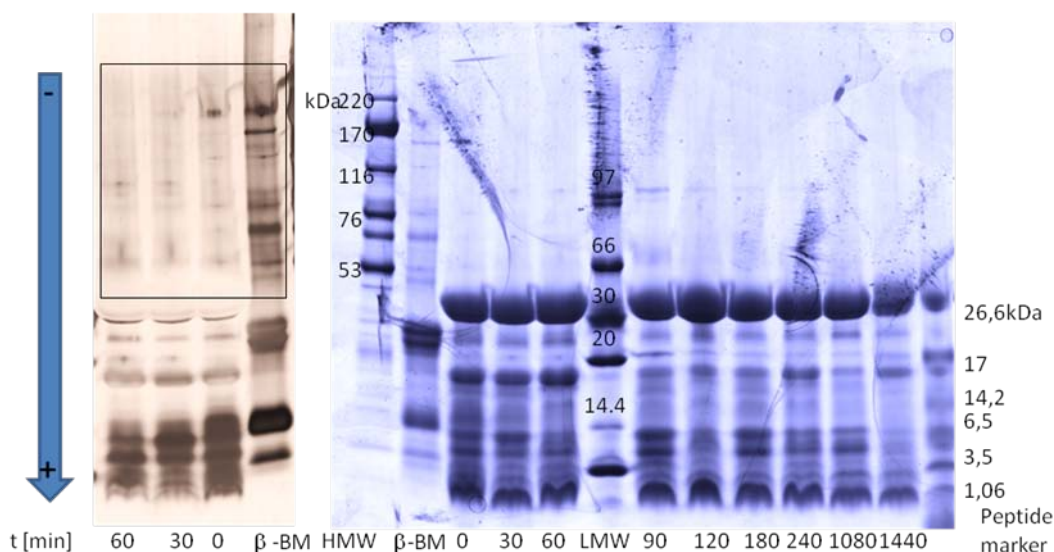


Fig. 20: SDS-PAGE en gel de 4-20% de poliacrilamida desarrollada en el equipo de Biorad de las muestras obtenidas a lo largo del tiempo en el proceso de hidrólisis con pepsina del β -BM diluido 1/10

El perfil protéico de la electroforesis indica que la muestra presenta inicialmente cuatro bandas mayoritarias por debajo de 45 kDa que tras el proceso de digestión, y como en el caso del α -BM, tras las 24 horas tenemos un perfil muy heterogéneo de bandas. Como en el caso anterior, la electroforesis también se tiñó en plata para visualizar las proteínas de mayor peso molecular, que están en menor proporción. En esta electroforesis se aprecian las proteínas de la MFGM (recuadradas), en concreto la butirofilina (banda de peso entre 53 y 76 kDa), que desaparece a los 30 minutos. La

lactaderina muestra una mayor resistencia a la hidrólisis y se conserva su banda a los 60 minutos.

Tras la hidrólisis se determinó el nivel de aminas libres por el método del TNBS:

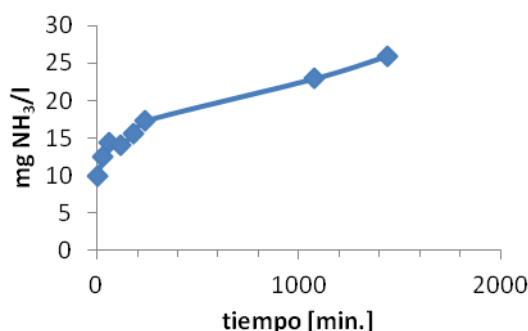


Fig. 21: Niveles de aminas primarias libres a lo largo del tiempo en el proceso de hidrólisis por pepsina del β -BM de vaca diluido 1/10.

Como en el caso del α -BM, durante las cuatro primeras horas la hidrólisis es mayor. Sin embargo, la apariencia sigmoidea de la curva de este producto es menor que la del anterior, siendo la velocidad de hidrólisis es más constante a lo largo del proceso.

V.3.b.2 Digestión del M-BM

La digestión que se llevó a cabo como en las muestras anteriores dio lugar a una serie de muestras cuyo análisis por electroforesis se muestra en la siguiente imagen:

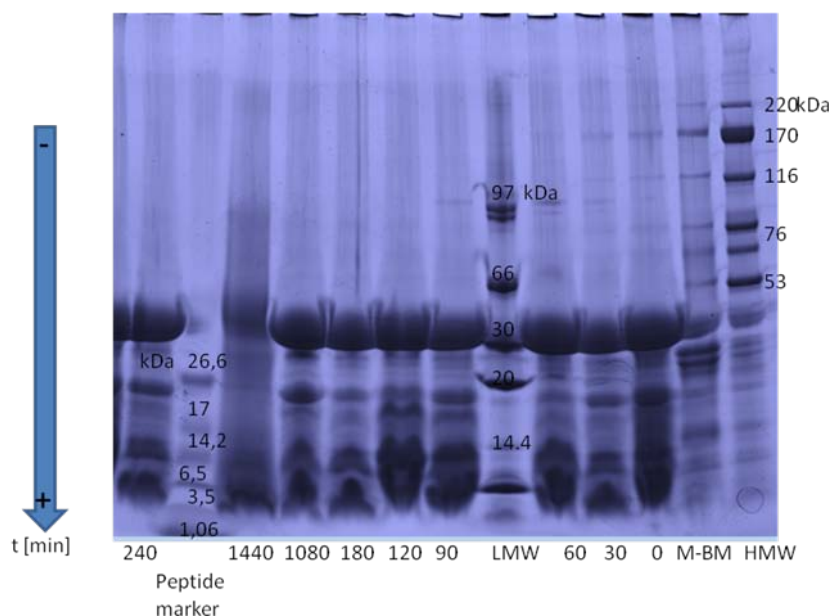


Fig. 22: SDS-PAGE en gel de 4-20% de poliacrilamida desarrollada en el equipo de Biorad de las muestras obtenidas a lo largo del tiempo en el proceso de hidrólisis con pepsina del M-BM diluido 1/10

En esta electroforesis se aprecia que la concentración de los péptidos más pequeños es más alta que en los casos anteriores, a partir de los 60 min la apariencia difusa de las bandas se debe a un exceso de concentración de proteínas de bajo peso

molecular y péptidos en la zona inferior del gel. En este caso, como en los anteriores la banda de la butirofilina desaparece, entre los 30 y 60 min.

Desde el comienzo de la hidrólisis aparece una banda de 17 kDa, que se mantiene constante a lo largo del proceso, esto podría indicar que es un fragmento muy resistente a la digestión.

La determinación de aminas libres tras reaccionar con el TNBS se muestra en lo gráfica siguiente;

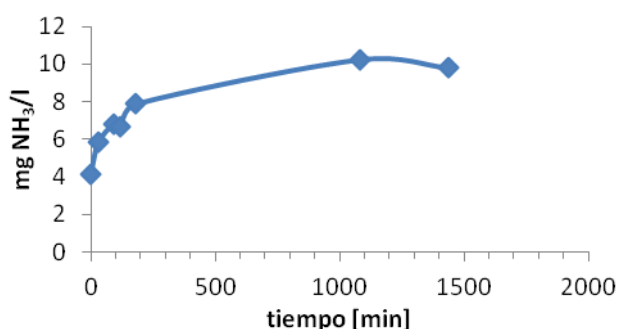


Fig. 23: Niveles de aminas primarias libres a lo largo del tiempo en el proceso de hidrólisis por pepsina del M-BM de vaca diluido 1/50.

Esta BM comercial presenta una intensa degradación durante los 30 primeros minutos, en la que casi alcanza la mitad de las aminas libres totales producidas en el proceso. Después, entre los 90 min y las 2 horas, aparece otro incremento relevante en el nivel de aminas

V.3.b.4 Digestión W-BM

El perfil protéico de la hidrólisis con pepsina de esta muestra comercial analizado por electroforesis se muestra en la imagen siguiente:

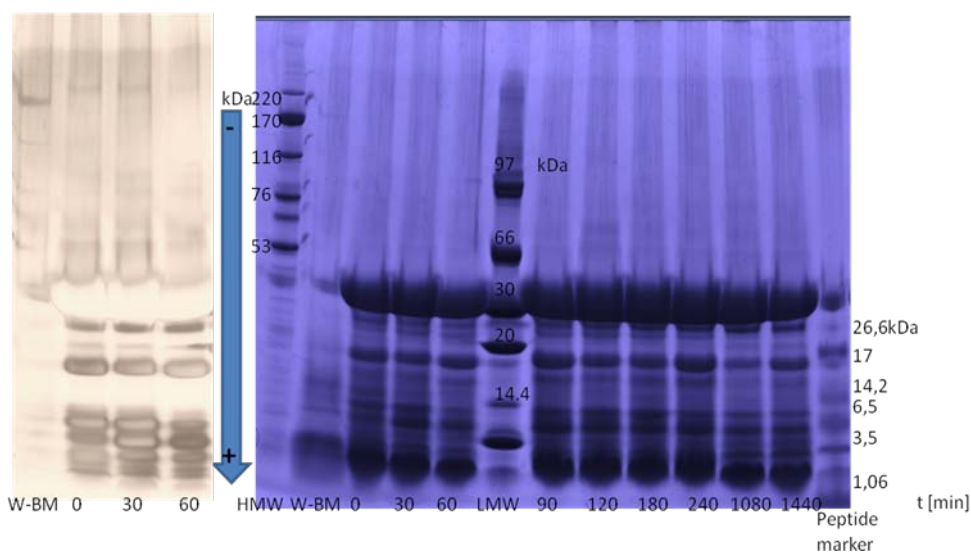


Fig. 24: SDS-PAGE en gel de 4-20% de poliacrilamida desarrollada en el equipo de Biorad de las muestras obtenidas a lo largo del tiempo en el proceso de hidrólisis con pepsina del W-BM diluido 1/10

En esta electroforesis, en la mitad superior del gel sólo se puede apreciar que la lactaderina soporta todo el proceso sin apenas degradarse, la banda de 53 kDa no desaparece, mientras que la butirofilina, que no se ve al principio del proceso aparece a las 2 horas y prácticamente no desaparece, esto puede ser debido a que se ha liberado de la xantin-oxidasa (7) con la que podría interaccionar debido al tratamiento térmico que sufren las muestras comerciales.

Por otra parte, el perfil de proteínas de bajo peso molecular y péptidos, se mantiene bastante constante a lo largo de todo el proceso de hidrólisis.

La determinación de aminos libres mediante reacción con el TNBS de estos hidrolizados sigue la forma de las BM α y β , el grado de hidrólisis aumenta con el tiempo, y es mayor especialmente en las 3-4 primeras horas del proceso.

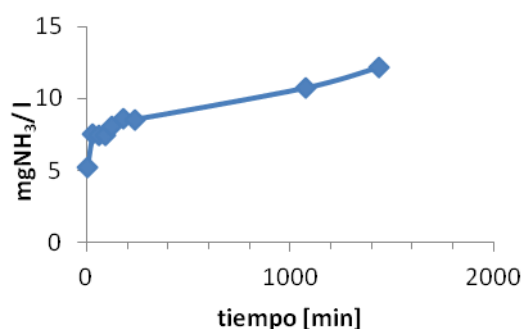


Fig. 25: Niveles de aminos primarios libres a lo largo del tiempo en el proceso de hidrólisis por pepsina del W-BM de vaca diluido 1/10.

Para comparar todas las BM se calculó la relación mg NH₃/g proteína de la muestra, tras lo que se representó este nuevo valor frente al tiempo.

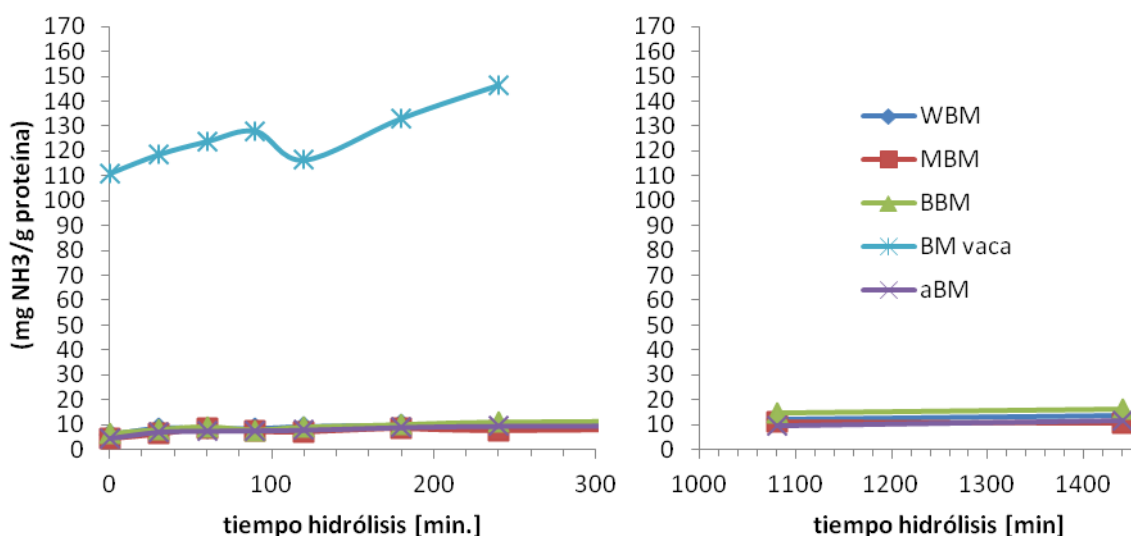


Fig. 26: Comparación del grado de hidrólisis de las diferentes muestras de BM

En esta representación se aprecia que el BM más hidrolizable es el de vaca, que comparándolo con el resto de muestras presenta un grado de hidrólisis mayor y también una proteólisis más rápida.

De los BM comerciales los que sufren una mayor hidrólisis son la β -BM y la WBM, mientras que la MBM y la α -BM presentan un grado de hidrólisis inferior a las anteriores muestras.

V.3.d Análisis por Western-Blotting del hidrolizado de *buttermilk* de vaca

El BM de vaca hidrolizado con pepsina se analizó por Western-blotting utilizando el antisuero policlonal de la cuarta extracción frente a butirofilina:

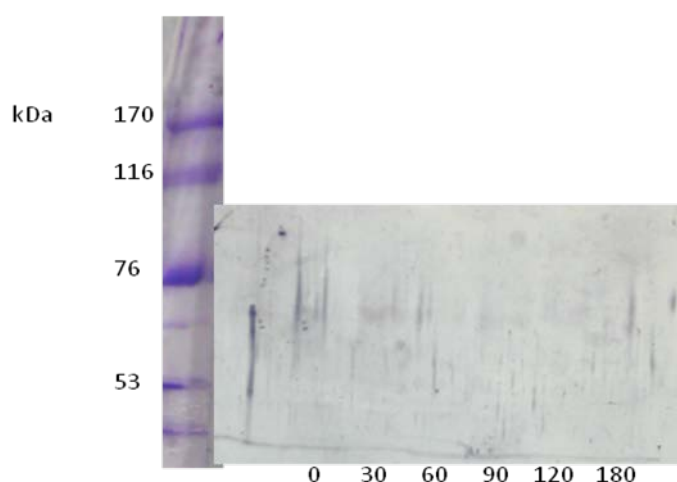


Fig. 27: Western-blotting del hidrolizado de BM de vaca utilizando antisuero frente a butirofilina.

En esta imagen se ha incluido la hoja de nitrocelulosa revelada y la parte del gel no transferido correspondiente al patrón de pesos moleculares teñida con azul de Coomassie. En la nitrocelulosa se aprecia una mancha correspondiente con la banda de la butirofilina, sólo visible a los 0, 30 y 60 min de hidrólisis, perdiendo intensidad conforme avanza el proceso de digestión. Esta técnica nos confirma los resultados vistos anteriormente en las electroforesis.

V.4 Efecto antibacteriano del hidrolizado de 4 horas de *buttermilk* de vaca

El ensayo antibacteriano se ha realizado con *Cronobacter sakazakii*, un patógeno emergente de gran interés en los últimos años, dado que ha causado serios problemas por su aparición en las leches en polvo infantiles. En el grupo de investigación se están realizando ensayos con algunas proteínas lácteas, que han demostrado tener una actividad antibacteriana frente a este patógeno.

Durante la realización de este ensayo, se midió la turbidez de las muestras con el fin de comprobar que se producía crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo, mostrándose los resultados en la Figura 28. Todas las muestras a tiempo 0 tienen una turbidez similar, lo cual indica que la siembra de la suspensión bacteriana se ha hecho correctamente, y que en todos los pocillos tenemos una cantidad similar o equivalente de microorganismos. A las 4 horas ocurre lo mismo, pero los valores son superiores a los anteriores, lo que indica que se ha producido crecimiento de las bacterias. A las 8 horas sólo el valor de la muestra control es superior a los valores de los tiempos anteriores, mientras que la turbidez de las muestras con diferentes concentraciones del hidrolizado es menor que la del control en todos los casos. Esto último parece indicar que el hidrolizado inhibe el crecimiento de la bacteria.

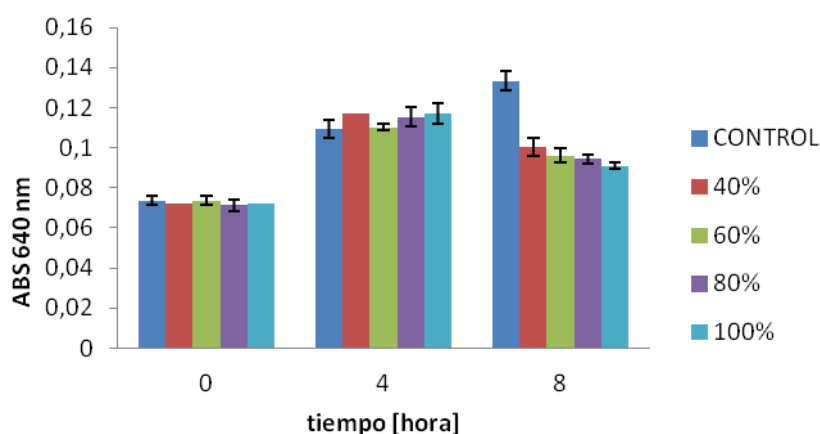


Fig. 28: Evolución del valor medio de turbidez (absorbancia a 640 nm) de la suspensión de *C. sakazakii* incubada con el hidrolizado de BM de vaca de 4 horas a diferentes tiempos y porcentajes.

Tras realizar el recuento, teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se representa las UFC/ml en función del tiempo y la concentración del hidrolizado:

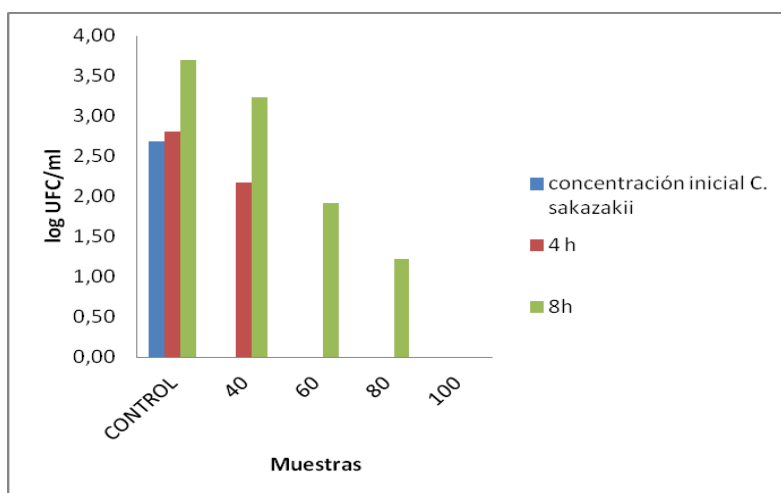


Fig. 29: Representación del log UFC/ml de la suspensión de *C. sakazakii* incubada con el hidrolizado de BM de vaca de 4 horas a diferentes tiempos y porcentajes.

Los resultados indican que la población control aumentó con la incubación, especialmente a las 8 horas, aumentando casi dos unidades logarítmicas. De las diferentes muestras de hidrolizado sólo la concentración del 40% permitió el crecimiento bacteriano a las 4 horas, mientras que a las 8 horas hubo crecimiento bacteriano para los hidrolizados del 40, 60 y 80%. Para la concentración del 100% del hidrolizado no se obtuvo crecimiento bacteriano ni a 4 ni a 8 horas. Analizando estos resultados parece que existe una relación inversamente proporcional entre el crecimiento bacteriano y la concentración del hidrolizado.

Durante el tratamiento a las 8 horas, para un 40% de hidrolizado sólo ha crecido el 13% de bacterias respecto al control, para el 60% hay una reducción de una vigésima parte respecto al crecimiento en la muestra del 40%. Por último, para un 80% de hidrolizado apenas crece un 0,11% de las bacterias con respecto al control de muestra.

Estos resultados, aunque preliminares, son muy prometedores e indican que la hidrólisis con pepsina genera péptidos en las proteínas de la MFGM que pueden tener un gran interés por sus propiedades antibacterianas.

VI. CONCLUSIONES

1. De los métodos utilizados para la extracción de las proteínas de la membrana del glóbulo graso se ha visto que la extracción con detergentes y ultrasonidos es la más eficaz y rápida. La caracterización las proteínas de la MFGM en 2DE requiere una fase de precipitación con acetona y TCA a -20°C.

2. Los perfiles electroforéticos en SDS-PAGE de los *buttermilk* obtenidos de los leche de vaca y oveja cruda indican que se conservan la mayoría de las proteínas de la MFGM. Los perfiles obtenidos en las electroforesis 2D de todos los *buttermilk* analizados han permitido identificar las proteínas butirofilina, lactaderina y adipofilina por técnicas proteómicas.

3. Se han obtenido anticuerpos policlonales frente a la butirofilina bovina y se ha puesto a punto un método de ELISA competitivo para la determinación de su concentración. Mediante esta técnica se ha comprobado que los diferentes tipos de *buttermilk* comerciales en polvo obtenidos de leche de vaca son una buena materia prima para aislar la butirofilina y otras proteínas de la MFGM.

4. Se han obtenido hidrolizados con pepsina de los *buttermilk* de nata y oveja de leche cruda y de los *buttermilk* comerciales. Se ha analizado su perfil electroforético a lo largo del tiempo de hidrólisis y se ha observado que la lactaderina es una proteína más resistente a las condiciones de hidrólisis que la butirofilina.

5. Los experimentos preliminares que se han realizado para evaluar la actividad antibacteriana del hidrolizados del *buttermilk* de leche de vaca cruda obtenido a las 4 horas frente al patógeno emergente *C. sakazakii* indican una inhibición del crecimiento a concentraciones del 40, 60 y 80%, mientras que para el 100% no se ha apreciado crecimiento bacteriano a las 4 y 8 horas de incubación.

VII. BIBLIOGRAFIA

- (1) Gopal, P.K. y Gill, H.S. (2000). Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Brit. J. Nutr.*, 84, S69-S74.
- (2) Fong, B.Y. y Norris, C.S. (2009). Quantification of milk fat globule membrane proteins using selected reaction monitoring mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 6021-6028.
- (3) Spitsberg, V. L. (2005). Invited review: bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *J. Dairy Sci.* 88, 2289–2294.
- (4) Riccio, P. (2004). The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. *Trends Food Sci. Technol.*, 15, 458-461.
- (5) Varnam, A.H., Sutherland J.P. (1995). *Leche y productos lácteos: Tecnología, Química y Microbiología*. Ed Acribia, S.A. Zaragoza. ISBN: 84-200-0794-3
- (6) Singh, H. 2006. The milk fat globule membrane-a biophysical system for food applications. *J. Colloid Interface Sci*, 11, 154-163.
- (7) Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K., Van Camp, J. 2008. Review: Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int.J Dairy J.*, 18, 436-457
- (8) Meisel, H. y Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. *A. Van Leeuw. J. Microb.*, 76, 207–215.
- (9) Mather, I. (2000). A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, 83, 203–247.
- (10) Williams, A. F. y Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 6, 381–405.
- (11) Pallesen, L.T. et al. (2001). Purification of MUC1 from bovine milk fat globules and characterization of a corresponding full-length cDNA clone. *J. Dairy Sci.*, 84, 2591-2598.
- (12) Schroten, H. et al., (1992). Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. *Infect. Immun.*, 60, 2893-2899.

- (13) Hirno, S. et al. (1998). Inhibition of *Helicobacter pylori* sialic acid-specific haemagglutination by human gastrointestinal mucins and milk glycoproteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 20, 275-281.
- (14) Hvarregaard, J. et al. (1996). Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *Eur. J. Biochem.*, 240, 628-636.
- (15) Kvistgaard, A. S. et al. (2004). Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infection. *J. Dairy Sci.*, 87, 4088-4096.
- (16) Newburg, D.S. (1998). Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet*, 351, 1160-1164.
- (17) Bjorck, L., Claesson, O. 1979. Xanthine oxidase as a source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase system in milk. *J. Dairy Sci.*, 62, 1211-1215.
- (18) Le, T.T., Van Camp, J., Rombaut, R., Van Leeckwyck, F., Dewettinck, K. 2009. Effect of washing conditions on the recovery of milk fat globule membrane proteins during the isolation of milk fat globule membrane from milk. *J. Dairy Sci.*, 92 3592-3603.
- (19) Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. 2001. *Ciencia de la Leche y Tecnologia de los Productos Lacteos*. Ed Acribia, S.A. Zaragoza. ISBN: 84-200-0961-X
- (20) Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., Blecker, C. 2010. Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 14, 485-500.
- (21) Charlwood et al. (2002). Use of proteomic methodology for the characterization of human milk fat globular membrane proteins. *Anal. Biochem.*, 301, 314-324
- (22) Gagnaire, V. et al. (2009). Invited review: proteomics of milk and bacteria used in fermented dairy products: from qualitative to quantitative advances. *J. Dairy Sci.*, 92, 811-825.
- (23) O'Donnell, R. et al. (2004). Milk Proteomics. *Int. Dairy J.*, 14, 1013-1023.
- (24) Adler-Nissen, J. (1979a). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1256-1262.
- (25) Spellman, D. et al (2003) Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *Int. Dairy J.*, 13, 447-453

- (26) Montagne, L. et al. (1999) Amino-terminal sequencing of the ovine milk fat globule membrane protein butyrophilin. *Lait*, 79, 275-279.
- (27) Quaranta, S. et al (2001) Human proteome enhancement: High-recovery method and improved two-dimensional map of calostrat fat globule membrane protein Electrophoresis, 22, 1810-1818.
- (28) Wessel, D. et al (1984) A method for the Quantitative Recovery of protein in dilute solution in presence of detergents and lipids *Anal. Biochem.*, 138, 141-143.
- (29) O'Connell, J. E., & Fox, P. F. (2000). Heat stability of buttermilk. *J. Dairy Sci.*, 83, 1728-1732.
- (30) Morin, P., Pouliot, Y. y Britten, M. (2008). Effect of buttermilk made from creams with different heat treatment histories on properties of rennet gels and model cheeses. *J. Dairy Sci.*, 91, 871-882.
- (31) Tamime, A. Y. y Robinson, R. K. (1999). *Yoghurt science and technology* (2nd ed.). Washington, DC, USA: Woodhead Publishing Limited.
- (32) Rombaud, R., Van Camp, J., Dewettinck, K. (2006). Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41, 435-443.
- (33) Park, Y.W., et al (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rum. Res.*, 68, 88-113.
- (34) Fong, BY. et al (2009). Quantification of Milk Fat Globule Membrane Proteins Using Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 14, 6021-6028.