



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE VETERINARIA



Universidad
Zaragoza

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Trabajo Fin de Máster curso 2011-2012

***Estudio de las proteínas presentes en la membrana del
glóbulo graso de la leche de vaca y oveja***

Máster en Iniciación a la Investigación en Ciencia y Tecnología de los
Alimentos

Tutoras: M^a Dolores PÉREZ CABREJAS

M^a Lourdes SANCHEZ PANIAGUA

Daniel Ripollés López

INDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Leche	2
2.1.1. Definición y composición.....	2
2.1.2. Biosíntesis de la leche.....	3
2.2. Fracción grasa de la leche	4
2.2.1. Membrana del glóbulo graso (MFGM)	5
2.2.1.1. Estructura	5
2.2.1.2. Proteínas.....	5
2.2.1.3. Lípidos.....	8
2.3. Aislamiento de la membrana del glóbulo graso	9
2.4. Efectos beneficiosos de los componentes de la MFGM sobre la salud	11
2.4.1. Fracción lipídica de la MFGM	11
2.4.1.1. Actividad antibacteriana.....	11
2.4.1.2. Actividad antiolesterolémica	12
2.4.1.3. Otros efectos a nivel intestinal.....	12
2.4.2. Fracción proteica de la MFGM	13
2.4.2.1. Actividad antitumoral.....	13
2.4.2.2. Actividad anti-adhesión de agentes patógenos	13
2.4.2.3. Actividad antibacteriana.....	14
2.4.2.4. Otras actividades	14
2.5. Propiedades tecnológicas de la MFGM	15
2.5.1. Capacidad emulsificante.....	15
2.5.2. Formación de liposomas a partir de MFGM.....	15
3. OBJETIVOS	17

4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1. Materiales	18
4.2. Métodos	19
4.2.1. Preparación del <i>buttermilk</i> y el <i>butterserum</i> de vaca y oveja	19
4.2.1.1. Desnatado de la leche y lavado de la grasa.....	19
4.2.1.2. Obtención del <i>buttermilk</i> y el <i>butterserum</i>	19
4.2.1.3. Centrifugación del <i>buttermilk</i> y el <i>butterserum</i>	19
4.2.2. Preparación de los <i>buttermilk</i> comerciales	20
4.2.2.1. Incubación con quimosina.....	20
4.2.2.2. Incubación con citrato sódico.....	20
4.2.3. Aislamiento de la butirofilina	21
4.2.3.1. Desnatado de la leche y lavado de la grasa.....	21
4.2.3.2. Aislamiento de la MFGM	21
4.2.3.3. Cromatografía de afinidad con Concanavalina- A - Sepharose 4B	22
4.2.4. Aislamiento de la parte extracelular de la mucina-1.....	22
4.2.4.1. Desnatado de la leche y lavado de la grasa.....	22
4.2.4.2. Aislamiento de la MFGM	23
4.2.4.3. Liberación de la parte extracelular de la MUC-1 mediante tripsinización.....	23
4.2.4.4. Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50.....	23
4.2.5. Electroforesis con SDS	24
4.2.6. Métodos de tinción de las electroforesis	25
4.2.6.1. Tinción con Azul de Coomassie	25
4.2.6.2. Tinción específica para glicoproteínas (Glycoprotein Staining Kit).....	25
4.2.6.3. Tinción con plata de forma manual.....	26
4.2.6.4. Tinción con plata en el Phast-System.....	26
4.2.7. Secuenciación de bandas obtenidas en las electroforesis	27

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1. Caracterización electroforética del <i>buttermilk</i> y el <i>butterserum</i> de vaca y oveja	28
5.2. Caracterización electroforética de diferentes <i>buttermilk</i> comerciales clarificados con quimosina con y sin cloruro cálcico	31
5.2.1. Incubación con quimosina	31
5.2.2. Incubación con citrato de sodio	32
5.3. Aislamiento de la butirofilina	34
5.3.1. 1er Aislamiento	34
5.3.2. 2º Aislamiento	36
5.4. Aislamiento de la parte extracelular de la mucina-1	37
6. CONCLUSIONES	40
7. BIBLIOGRAFÍA	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la membrana del glóbulo graso.....	8
Figura 2. Procedimiento para el aislamiento de la membrana del glóbulo graso.....	11
Figura 3. Fundamento de la cromatografía de DEAE-Sephadex.....	24
Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones de buttermilk y butterserum de vaca.....	28
Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones de buttermilk y butterserum de vaca y oveja... ..	29
Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de fracciones de buttermilk y butterserum de vaca y de oveja.	30
Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS del α -serum powder tratado con quimosina y cloruro cálcico.....	32
Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de los diferentes sobrenadantes obtenidos de los buttermilk comerciales clarificados.....	32
Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS del Westland powder tratado con citrato sódico y sometido a microfiltración.. ..	33
Figura 10. Perfil de la cromatografía del 1 ^{er} aislamiento, realizada en Concanavalina-A-Sephrose 4B de la fracción enriquecida en proteínas de la MFGM de leche de vaca.....	34
Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones de la cromatografía del 1 ^{er} aislamiento realizada en Concanavalina-A-Sephrose 4B.....	35
Figura 12. Perfil de la cromatografía del 2 ^o aislamiento realizada en Concanavalina-A-Sephrose 4B de la fracción enriquecida en proteínas de la MFGM de leche de vaca. .	36
Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, de las fracciones de las cromatografías del 2 ^o y 1 ^{er} aislamiento en Concanavalina-A-Sephrose 4B.....	37
Figura 14. Perfil de la cromatografía en DEAE-Sephadex de la fracción enriquecida en la parte extracelular de la mucina-1 obtenida tras la tripsinización de la fracción enriquecida en proteínas de la MFGM de leche de oveja.	38
Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las diferentes etapas seguidas para el aislamiento de la parte extracelular de la mucina-1.	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Composición media de la leche de vaca y oveja (Park et al., 2007)</i>	3
Tabla 2. <i>Composición lipídica media de la leche (Varnam y Sutherland, 1995)</i>	4
Tabla 3. <i>Proteínas de la membrana del glóbulo graso con sus respectivos pesos moleculares (Singh, 2006)</i>	6
Tabla 4. <i>Composición lipídica de la MFGM. Las diferentes clases de fosfolípidos aparecen en relación al total de fosfolípidos (Singh, 2006)</i>	9
Tabla 5. <i>Composición de los diferentes buttermilk comerciales utilizados (Westland Milk Products. Hokitika, Nueva Zelanda)</i>	31

1. RESUMEN

Las proteínas de la membrana del glóbulo graso representan del 25 al 70% del total de sus componentes. Se han descrito alrededor de 40 proteínas diferentes con pesos moleculares de entre 15 y 240 KDa, las cuales ejercen importantes funciones biológicas. La localización de estas proteínas en 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. En general se trata de proteínas difíciles de aislar por su alto grado de hidrofobicidad y su baja concentración.

En este trabajo se ha realizado una caracterización electroforética de las proteínas presentes en el suero de mantequilla (*buttermilk*) y en el suero obtenido de la fusión de la mantequilla (*butterserum*) de leche de vaca y oveja, así como en los *buttermilk* comerciales. Para ello las electroforesis realizadas con SDS se tiñeron con tres técnicas: Azul de Coomassie, nitrato de plata y un reactivo específico para glicoproteínas.

Además, se llevaron a cabo los procedimientos descritos por otros autores para el aislamiento de la butirofilina y de la parte extracelular de la mucina-1. En el caso de la butirofilina, tras la obtención de una fracción rica en membranas del glóbulo graso se sometió a una cromatografía de afinidad con Concanavalina-A, en la que nuestra proteína de interés quedó retenida, para ser recuperada posteriormente en una elución con α -metil-manósido.

Para el aislamiento de la parte extracelular de la mucina-1, se obtuvo una fracción enriquecida en membranas del glóbulo graso que se incubó con tripsina para liberar dicha parte externa a la membrana de 32 KDa. Finalmente se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex en la que el fragmento quedó retenido y se eluyó con un gradiente de cloruro sódico.

El presente trabajo fin de máster se engloba dentro de un proyecto cuyo objetivo es caracterizar las proteínas de la membrana del glóbulo graso con actividad defensiva, procedentes tanto de leche de vaca y oveja como de productos comerciales de mazada, y estudiar el efecto de los tratamientos tecnológicos sobre su integridad y actividad para su utilización en alimentos funcionales.

2. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha generado un gran interés por estudiar con mayor profundidad los componentes bioactivos de la leche, por una parte con el objetivo de relacionar dichos componentes con el desarrollo de los tejidos y el establecimiento de las funciones fisiológicas del recién nacido, y por otra, con el fin de poder utilizar eventualmente dichos componentes como ingredientes de alimentos que posean no sólo un valor nutritivo, sino también un valor funcional.

En occidente, la leche se ha consolidado como un alimento cotidiano, incluso después de la infancia. Esto es debido al hecho de que la leche es un producto apetecible, que se digiere bien, barato y fácil de obtener. Debido también a la aplicación de las tecnologías térmicas de conservación de alimentos a la leche, desde hace unas décadas, podemos decir que se trata de un producto seguro y estable. Desde un punto de vista nutricional se podría considerar un alimento completo ya que contiene los tres macronutrientes básicos (proteínas, lípidos y carbohidratos) en una relación óptima y una gran cantidad de micronutrientes.

Además la leche no es sólo un alimento, es también un vehículo que utilizan las madres para proporcionar al recién nacido las inmunoglobulinas y otras proteínas defensivas que necesitan para su completa protección (Riccio, 2004).

2.1. Leche

2.1.1. Definición y composición

El CAE (Código Alimentario Español) define la leche como el “producto íntegro, no alterado ni adulterado, y sin calostros, obtenido del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras domésticas sanas y bien alimentadas” (Decreto 2484/1967, del 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del código alimentario español).

La leche es un fluido complejo cuya composición y propiedades físicas varían de una especie a otra en función de las necesidades de las crías. El constituyente mayoritario de la leche es el agua y contiene, según las especies, cantidades variables de lípidos, proteínas y carbohidratos que se sintetizan en la glándula mamaria. 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 (Varnam y Sutherland, 1995).

En la Tabla 1 se muestra la composición de la leche de vaca y oveja, que son las especies con las que se ha llevado a cabo este trabajo.

Tabla 1. Composición media de la leche de vaca y oveja (Park *et al.*, 2007)

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

2.1.2. Biosíntesis de la leche

La leche es el producto de la glándula mamaria. Se sintetiza en el tejido secretor y se recoge en una serie de canales, que van siendo de mayor tamaño conforme la leche avanza hacia el pezón.

El alvéolo es la unidad funcional de producción (en la glándula mamaria hay millones de ellos), tiene forma esférica con un lumen central de almacenamiento rodeado por una monocapa de células epiteliales secretoras. Los capilares sanguíneos y las células mioepiteliales rodean el alvéolo y la leche secretada se encuentra en la cavidad interna.

Las células secretoras están orientadas de forma que el extremo apical, que tiene una membrana sencilla, está situado adyacente al lumen, mientras que el extremo basal está separado por la membrana basal de la sangre y la linfa. Los metabolitos entran a la célula por el extremo basal y son utilizados en la producción de leche por el retículo endoplásmico. El aparato de Golgi se transforma en las vesículas que transportan los componentes de la fase acuosa de la leche hasta la membrana plasmática apical. Las vesículas de Golgi, se unen con la membrana plasmática apical, fundiéndose hasta formar parte de la membrana y verter la fase acuosa en el lumen (Varnam y Sutherland, 1995).

La fase lipídica también se sintetiza en el retículo endoplásmico 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, denominada membrana del glóbulo graso. En el lumen alveolar se completa la síntesis de lactosa y las glicosilación y fosforilación de las proteínas (Varnam y Sutherland, 1995).

2.2. 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. El diámetro de estos glóbulos de grasa varía desde 0,2 hasta 15 μm , siendo el tamaño medio de unos 4,5 μm . El diámetro está relacionado con el contenido graso de la leche y es mayor en las leches más ricas en grasa. El tamaño de estos glóbulos también depende de la raza y del estado de lactación, entre otros factores (Walstra *et al.*, 2001).

Aproximadamente el 98% de los lípidos de la leche son triglicéridos, aunque también podemos encontrar pequeñas cantidades de di- y monoglicéridos, y ácidos grasos libres. Hay además cantidades mensurables de fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y cerebrosidos (Tabla 2). Otros componentes se encuentran en cantidades muy pequeñas, pero pueden ser importantes en las propiedades organolépticas o desde un punto de vista nutritivo. Entre ellos podemos citar las vitaminas liposolubles A, D y E, junto con pequeñas cantidades de vitamina K y pigmentos carotenoides (Varnam y Sutherland, 1995).

Tabla 2. Composición lipídica media de la leche de vaca (Varnam y Sutherland, 1995)

Lípidos	% en peso
Triglicéridos	97-98
Diglicéridos	0,3-0,6
Monoglicéridos	0,02-0,04
Ácidos grasos libres	0,1-0,4
Esteroles libres	0,2-0,4
Ésteres de esteroles	Trazas
Fosfolípidos	0,2-1
Hidrocarburos	Trazas

Los glóbulos grasos de la leche consisten básicamente en un núcleo de triglicéridos, rodeados de una fina membrana denominada membrana del glóbulo graso, que en inglés se denomina *milk fat globule membrane* y se abrevia con las siglas MFGM.

2.2.1. Membrana del glóbulo graso (MFGM)

La composición de la membrana del glóbulo graso incluye proteínas, fosfolípidos, lípidos neutros, enzimas y otros componentes minoritarios. Dicha membrana actúa como un agente emulsificante natural, previene la coalescencia de los glóbulos grasos y protege a la grasa de la degradación enzimática. La MFGM se ve muy afectada por los tratamientos tecnológicos de la leche, tales como el calor, el frío, la homogeneización, la evaporación o la liofilización (Singh, 2006).

Se ha demostrado que algunas proteínas y lípidos de la MFGM poseen propiedades funcionales y beneficiosas para la salud (Dewettinck *et al.*, 2008).

2.2.1.1. Estructura

La membrana 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 el núcleo de triglicéridos. 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) (Dewettinck *et al.*, 2008).

2.2.1.2. Proteínas

Las proteínas de la membrana del glóbulo graso representan del 25 al 70% del total de sus componentes. Se han descrito 40 proteínas con unas masas moleculares entre 15.000 y 240.000 Da, que representan alrededor del 1-2% del total de proteínas de la leche. No todas las proteínas están unidas a la membrana del glóbulo graso de la misma forma. Pueden ser integrales, periféricas o bien establecer una interacción débil con la membrana, lo que condiciona la forma de obtenerlas (Dewettinck *et al.*, 2008).

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 proteína

CD36 (PAS IV), la butirofilina (BTN) y la lactadherina (PAS VI/VII). La adipofilina (ADPH) y la proteína fijadora de ácidos grasos (*fatty acid binding protein*, FABP) son proteínas de la membrana no glicosiladas (Riccio, 2004). Los pesos moleculares de estas proteínas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Proteínas de la membrana del glóbulo graso con sus respectivos pesos moleculares (Singh, 2006)

Proteins	Molecular weight (Da)
Mucin I (MUC 1)	160,000–200,000
Xanthine oxidase	150,000
PAS III	95,000–100,000
CD36 or PAS IV	76,000–78,000
Butyrophilin	67,000
Adipophilin (ADPH)	52,000
PAS 6/7	48,000–54,000
Fatty acid binding protein (FABP)	13,000
BRCA1	210,000

La butirofilina es la proteína mayoritaria de la MFGM, tiene un peso molecular alrededor de 67.000 Da y según la raza representa del 20 al 40% del total de proteínas de la membrana del glóbulo graso (Singh, 2006). La butirofilina pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que incluye además proteínas de adhesión, receptores y proteínas del sistema inmune. Se ha indicado que la butirofilina está firmemente asociada a la MFGM ya que no puede ser extraída ni con agentes caótopicos ni con detergentes. Sin embargo, puede ser solubilizada en soluciones con dodecil sulfato sódico (SDS) y en presencia de un agente reductor (Mather, 2000). Hay evidencias que muestran que hay interacciones específicas entre la butirofilina y la xantín-oxidasa (Nielsen *et al.*, 1999), y se ha observado la existencia de una relación constante entre ellas de 4:1 a lo largo de la lactación. Esta interacción parece implicar la formación de puentes disulfuro entre las dos proteínas. Otras proteínas que pueden interaccionar con la butirofilina son la PAS III y la PAS 6 (Singh, 2006).

La mucina-1 (MUC 1) es una proteína fuertemente glicosilada (los glicanos representan hasta un 50% de su peso). Se han identificado en la leche de diversas especies tres tipos de mucinas: la MUC1, la MUCX y la MUC15. Se estima que la MUC-1 podría estar en la leche a concentraciones de 40 mg/l. Por microscopía electrónica se

pueden observar filamentos de esta proteína que están orientados radialmente y sobresalen entre 0,2-0,7 μm de la membrana. Estos filamentos se corresponden con la parte extracelular de la MUC-1, la cual se caracteriza por su intensa glicosilación (Pallesen *et al.*, 2001). Este dominio extracelular tiene un tamaño entre 32.300 y 60.600 Da y puede ser liberado mediante digestión con tripsina (Sando *et al.*, 2009). Aunque la mucina-1 es una proteína integral de la membrana, ciertas operaciones como el enfriamiento o la agitación pueden liberarla del glóbulo al suero (Pallesen *et al.*, 2001). La mucina-1 humana es similar a la bovina, oscilando su peso molecular entre 160.000 y 200.000 Da (Singh, 2006). Se trata de una proteína que potencia la inmunidad innata, proporcionando defensa frente a agentes infecciosos que contactan con el animal por primera vez, mediante una unión no específica con el agente infeccioso. Por ello, parece jugar un papel importante en la prevención de infecciones de la glándula mamaria y del intestino del recién nacido (Sando *et al.*, 2009). Las mucinas parecen intervenir también en el desarrollo de los conductos y cavidades en la embriogénesis (Mather, 2000).

La lactadherina es una glicoproteína ampliamente distribuida en los tejidos, de unos 50.000 Da, 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 (Hvarregard *et al.*, 1996). La lactadherina está formada por una cadena sencilla con dos dominios homólogos con el factor de crecimiento epidermal (EGF), y otros dos dominios C-terminales con homología con los factores de coagulación (Mather y Keenan, 1998). La lactadherina de la leche humana presenta una elevada actividad inhibidora de los rotavirus, uniéndose a ellos y bloqueando su capacidad infectiva (Newburg *et al.*, 1998). Esta actividad anti-rotavirus de la lactadherina parece estar ligada a su contenido en glicanos (Kvistgaard *et al.*, 2004).

La xantín-oxidasa representa alrededor del 20% del total de proteínas de la membrana del glóbulo graso. Se trata de una compleja enzima redox que contiene molibdeno, cuya función consiste en transformar la xantina en ácido úrico (Mather, 2000). La xantín-oxidasa bovina es una proteína dímera con dos subunidades idénticas

de aproximadamente 150.000 Da. 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 (Singh, 2006). 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, proceso que no se ha demostrado en trabajos posteriores al trabajo en el que se propuso esta actividad (Björck y Claesson, 1979).

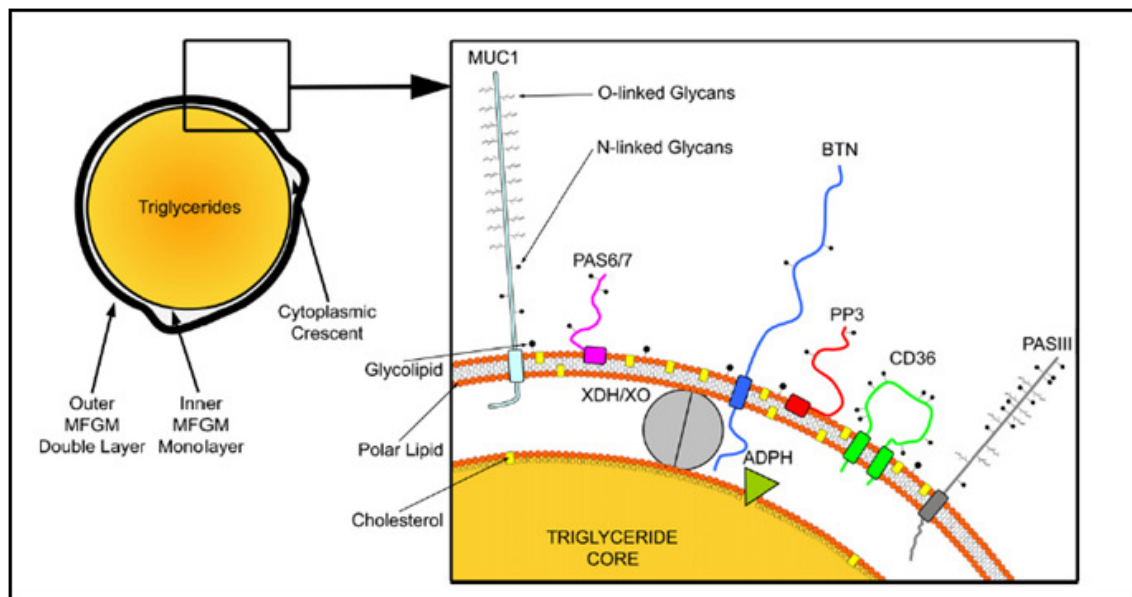


Figura 1. Estructura de la membrana del glóbulo graso y disposición de las principales proteínas de ésta (Dewettinck *et al.*, 2008)

2.2.1.3. Lípidos

La composición de los principales lípidos, tanto neutros como polares, de la MFGM está bien definida (Dewettinck *et al.*, 2008). Los lípidos neutros representan el 56-80% del total de lípidos de la membrana, de los cuáles los triglicéridos son los más abundantes. La mayor parte de esos lípidos apolares parecen provenir del núcleo de los glóbulos grasos durante el proceso de aislamiento de la membrana (Vanderghem *et al.*, 2010). Así, el método utilizado para el aislamiento de la membrana tiene una gran importancia en el contenido en lípidos neutros de ésta. Entre los lípidos de la membrana se encuentran también los diglicéridos, los monoglicéridos, el colesterol y sus ésteres (Singh, 2006).

Los lípidos polares están constituidos por fosfolípidos y esfingolípidos, los cuales representan el 15-43% del total de lípidos de la membrana. Los fosfolípidos más abundantes son la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, mientras que las formas aniónicas como el fosfatidilinositol y la fosfatidilserina se presentan en cantidades mucho menores (Singh, 2006). Dentro del grupo de los esfingolípidos predominan la esfingomielina, la lactosilceramida y la glucosilceramida (Vanderghem *et al.*, 2010).

Tabla 4. Composición lipídica de la MFGM. Las diferentes clases de fosfolípidos aparecen en relación al total de fosfolípidos (Singh, 2006)

Constituent class	% of total lipids
Triglycerides	62
Diglycerides	9
Sterols	0.2–2.0
Free fatty acids	0.6–6.0
Phospholipids ^a	26–31
Sphingomyelin	22
Phosphatidyl choline	36
Phosphatidyl ethanolamine	27
Phosphatidyl inositol	11
Phosphatidyl serine	4
Lysophosphatidyl choline	2

2.3. Aislamiento de la membrana del glóbulo graso

Existen diferentes métodos para aislar la membrana del glóbulo graso (Figura 2). En todos ellos, en primer lugar se separa la grasa de la leche por centrifugación y después la grasa se lava dos o más veces en 3-15 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) (Le *et al.*, 2009). 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 (Dewettinck *et al.*, 2008).

En el proceso de extracción de la membrana por agitación, al batir la grasa se introduce aire en pequeñas burbujas. Los glóbulos grasos se disponen alrededor de las

burbujas de aire y se aproximan entre sí, llegando a romper la estructura del glóbulo, formándose pequeños grumos de grasa y saliendo parte de la grasa líquida del glóbulo al exterior (Walstra *et al.*, 2001). Finalmente, se produce una inversión de fases y se libera una fase acuosa denominada suero de mantequilla, mazada o en inglés *buttermilk*, que contiene fragmentos de la membrana del glóbulo, proteínas, lactosa y minerales (Vanderghem *et al.*, 2010). Este proceso es similar al que se utiliza en la elaboración de la mantequilla.

La composición del *buttermilk* es similar a la de la leche desnatada, aunque la concentración de lípidos polares sobre extracto seco es cuatro, cinco y diez veces más alta que en la leche desnatada, la leche entera y la nata respectivamente. La mayoría de los lípidos polares de la leche están presentes en la MFGM, que representa menos del 5% del total de sólidos del *buttermilk*. En cuanto a las proteínas, diversos estudios han confirmado que aproximadamente el 19% de las proteínas de la MFGM se encuentran en el suero de mantequilla (Vanderghem *et al.*, 2010).

En algunos métodos de obtención de la MFGM, con el objetivo de recuperar una mayor cantidad, se combina el *buttermilk* con el *butterserum*, que es el producto resultante de la fusión de la mantequilla a 40°C durante 5 minutos, y la posterior eliminación del aceite de mantequilla o *butteroil* por centrifugación. Finalmente, en este método, la MFGM es obtenida por ultracentrifugación, microfiltración, por precipitación a bajo pH o mediante la adición de sulfato de amonio. El concentrado proteico obtenido se puede someter a un lavado con solventes orgánicos (mezcla de cloroformo: metanol) con el objetivo de eliminar los lípidos presentes (Dewettinck *et al.*, 2008).

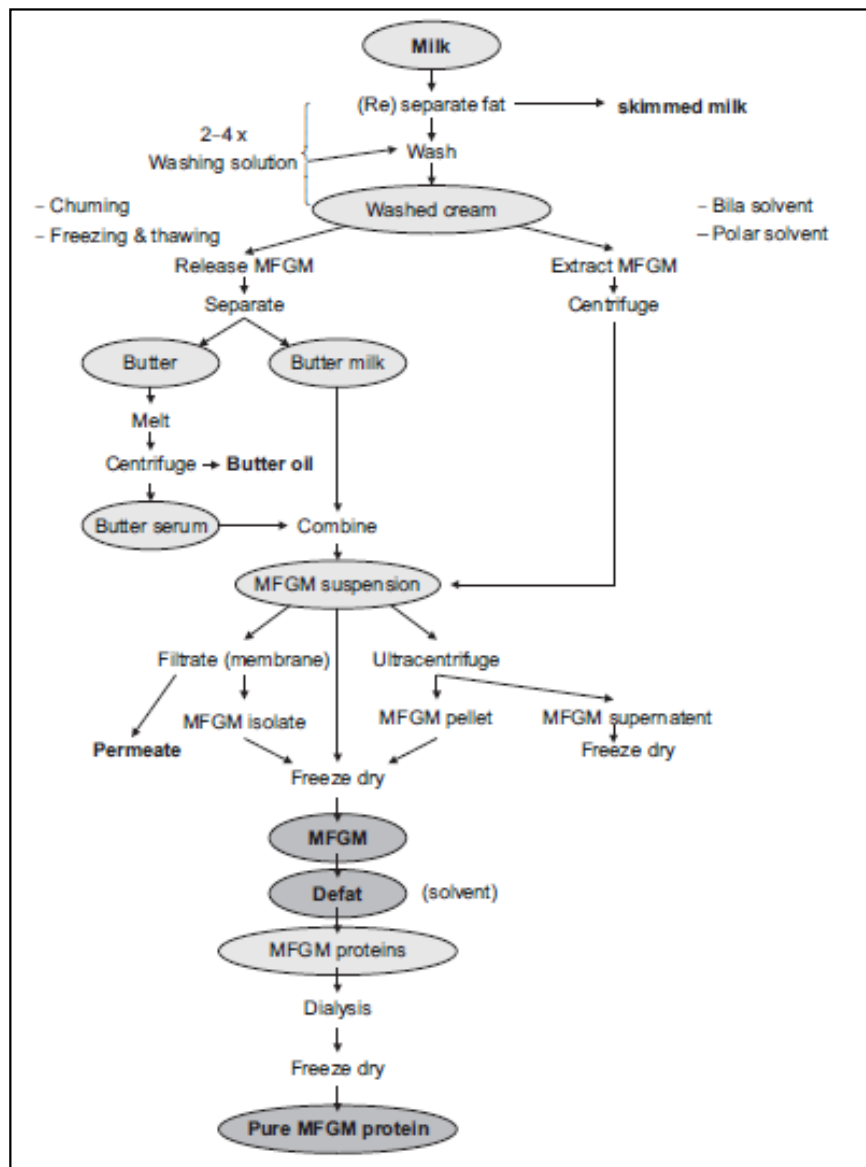


Figura 2. Procedimiento para el aislamiento de la membrana del glóbulo graso y las proteínas de ésta (El-Loly, 2011)

2.4. Efectos beneficiosos de los componentes de la MFGM sobre la salud

2.4.1. Fracción lipídica de la MFGM

2.4.1.1. Actividad antibacteriana

Se ha indicado que los esfingolípidos de la MFGM podrían tener una actividad protectora frente a virus, bacterias y sus toxinas. Todos estos agentes patógenos interaccionan con glicoesfingolípidos de las células intestinales para su entrada en

ellas. La competición con los esfingolípidos de la dieta permitiría inhibir la adhesión de los patógenos al intestino, previniendo la infección (Vesper *et al.*, 1999).

En diversos estudios se ha confirmado que cuando a los niños de corta edad se les suplementa la dieta con gangliósidos, se observa un mayor número de bifidobacterias y un menor número de *Escherichia coli* en sus heces, respecto a los microorganismos que se encuentran en el correspondiente grupo control. En otros estudios, se ha observado que la lisoesfingomielina posee una alta capacidad bactericida frente a *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium perfringens* (Possemiers *et al.*, 2005).

2.4.1.2. Actividad anticolesterolémica

Los esfingolípidos participan también en la absorción intestinal del colesterol. Se ha demostrado que la esfingomielina reduce la absorción intestinal del colesterol y de la grasa en ratas de una manera dosis-dependiente. Esta inhibición ha sido explicada por el efecto que tienen los ácidos grasos saturados de la esfingomielina sobre la lipólisis luminal, la solubilización micelar y el transporte de micelas lipídicas hacia los enterocitos (Spitsberg, 2005).

Así, los esfingolípidos de la dieta tienen un gran potencial para contribuir en el tratamiento de diversas enfermedades como la dislipidemia, algunas enfermedades cardiovasculares y la resistencia a la insulina.

2.4.1.3. Otros efectos a nivel intestinal

En condiciones normales, las células intestinales se someten a una rápida renovación excepto en los procesos de cáncer, en los cuáles el crecimiento normal se detiene y la apoptosis se retrasa. Hay estudios realizados en animales de experimentación, que indican que la esfingomielina podría tener un efecto en el cáncer de colon, en el que sus metabolitos, la ceramida y la esfingosina, podrían detener el crecimiento de las células tumorales e inducir la apoptosis (Merrill *et al.*, 2001). Otros estudios indican que la esfingomielinasa, que cataliza la conversión de esfingomielina a ceramida, podría tener efectos antiproliferativos en las células cancerígenas del colon (Duan *et al.*, 2003). Cabe señalar que no se ha realizado ningún ensayo con humanos ni ningún

estudio epidemiológico para evaluar la influencia de los esfingolípidos en el cáncer de colon, pero se ha demostrado que tanto la esfingosina como la ceramida inducen apoptosis en la línea celular humana HT29, un adenocarcinoma de colón (Dewettinck *et al.*, 2008).

La fosfatidilcolina presente en la MFGM es una fuente de colina, la cuál es un nutriente esencial para los humanos que promueve la síntesis y transmisión de los neurotransmisores, protege a la mucosa gastrointestinal frente a diversas toxinas y reduce el riesgo de aparición de enterocolitis necrotizante en neonatos prematuros hospitalizados (Dewettinck *et al.*, 2008). Además este fosfolípido parece también contribuir a la recuperación del hígado del daño producido por ciertos agentes químicos e infecciones víricas (Kidd, 2002).

2.4.2. Fracción proteica de la MFGM

2.4.2.1. Actividad antitumoral

Se ha demostrado que una de las proteínas aisladas de la MFGM, la proteína fijadora de ácidos grasos (FABP) inhibe la proliferación de varias líneas celulares de cáncer de mama (Spitsberg y Gorewit, 2002). Estos mismos autores demostraron en otra de sus investigaciones la presencia de una proteína producida por el gen BRCA 1, asociado al cáncer de mama, en la MFGM bovina y humana. Esta proteína es onco-supresora, y participa en los procesos de reparación del DNA (Spitsberg y Gorewit, 1998).

En la MFGM hay también presente un inhibidor de la β -glucuronidasa que podría prevenir el cáncer de colon. Esta enzima está presente en muchas bacterias, liberando agentes tóxicos que podrían ser cancerígenos y podrían estimular la aparición de cáncer de colon (Dewettinck *et al.*, 2008).

2.4.2.2. Actividad anti-adhesión de agentes patógenos

Algunas enfermedades gástricas, como la gastritis tipo B, las úlceras pépticas y diversos cánceres se pueden atribuir a la colonización de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori*, microorganismo que puede causar hemoaglutinación *in vitro* (Dewettinck *et al.*, 2008). Se ha observado que la MFGM inhibe la hemoaglutinación producida por

Helicobacter pylori y que la misma fracción de MFGM exenta de lípidos tiene un efecto inhibitorio mayor (Wang *et al.*, 2001).

La proteína MUC-1 puede también desarrollar un papel como inmunoprotectora, debido a su capacidad para unirse a algunos microorganismos patógenos, como *Escherichia coli*, e inhibir su acción en el tracto intestinal (Dewettinck *et al.*, 2008).

2.4.2.3. Actividad antibacteriana

Una de las enzimas de la MFGM, la xantín-oxidasa, se expresa en diferentes células del revestimiento intestinal y su función antimicrobiana se relaciona con su capacidad para producir en el intestino, especies reactivas del hidrógeno (radical superóxido, peróxido de hidrógeno, etc). También puede catalizar la reducción del nitrito inorgánico a óxido nítrico y en presencia de oxígeno a peroxinitrito, ambos compuestos con propiedades bactericidas (Dewettinck *et al.*, 2008).

Las bacterias patógenas interaccionan, en condiciones normales, con el epitelio intestinal del tracto digestivo. A veces la MFGM puede evitar esta interacción, ya que algunas bacterias pueden unirse a ella mediante receptores similares a los de la pared intestinal, de modo que podrían quedar sometidas a la acción de la xantín-oxidasa. Esta enzima inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella Enteritidis* (Martin *et al.*, 2004).

2.4.2.4. Otras actividades

La esclerosis múltiple es una enfermedad neurodegenerativa crónica que afecta al sistema nervioso central, en la cual hay una desmielinización, una pérdida de oligodendrocitos y una degeneración axonal.

La butirofilina, una de las principales proteínas de la MFGM guarda una cierta similitud con una glicoproteína denominada MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) que se encuentra en la vaina de mielina que recubre a los oligodendrocitos y que actúa como un auto-antígeno en la esclerosis múltiple. Debido al gran parecido de la MOG con la butirofilina podría existir una reacción cruzada entre ellas. Por lo tanto, se ha propuesto que el consumo de productos lácteos enriquecidos con MFGM, podría

ayudar a modular la aparición de esta enfermedad, aunque este tema es muy controvertido y está aún por aclarar (Dewettinck *et al.*, 2008).

2.5. Propiedades tecnológicas de la MFGM

2.5.1. Capacidad emulsificante

Debido a su naturaleza anfipática y a su función de estabilizar los glóbulos de grasa en la leche, los fragmentos de la MFGM se pueden considerar unos emulsificantes muy eficientes (Corredig y Dalgleish, 1997). Sin embargo, el método de separación, el tipo de materia prima y el pre-tratamiento de la nata y del *buttermilk* pueden afectar a la composición de los fragmentos de MFGM aislados, y por lo tanto, a sus propiedades emulsificantes (Singh, 2006). La adición de 80 mg de MFGM/g grasa láctea, permite reconstituir los glóbulos de grasa de forma que tengan una estabilidad parecida a la que tenían en la leche original (Kanno *et al.*, 1991).

Corredig y Dalgleish (1997) comprobaron que los fragmentos de MFGM aislados de leche cruda son mejores emulsificantes para soluciones de aceite de soja en agua, que los obtenidos a partir de *buttermilk* industriales. Esto podría ser debido a la desnaturalización de las proteínas de la membrana, así como a su asociación con la β -lactoglobulina durante los tratamientos térmicos o de batido que se aplican en la obtención del *buttermilk* (Morin *et al.*, 2007).

No se sabe con exactitud si son las proteínas o los fosfolípidos los componentes responsables de esta capacidad emulsificante que tiene la membrana del glóbulo graso, al igual que también se desconoce cómo afectan a esta propiedad, las interacciones de la MFGM con las caseínas y las proteínas del suero (Singh, 2006).

2.5.2. Formación de liposomas a partir de MFGM

Los liposomas son unas vesículas esféricas con diámetros que oscilan entre 20 nm y varias micras, formadas por el auto-ensamblaje de moléculas anfipáticas, normalmente fosfolípidos, formando una o más bicapas y englobando un núcleo acuoso. Durante su proceso de formación, las moléculas hidrofóbicas se pueden incorporar a las bicapas lipídicas y las moléculas hidrofílicas pueden quedar atrapadas en ese núcleo acuoso.

Muchos de los métodos estandarizados para la formación de liposomas son lentos y difíciles de llevar a la práctica, además de usar detergentes y solventes orgánicos, que son indeseables en los productos alimenticios. Un método que podría salvar en gran medida estas limitaciones es la microfluidificación, proceso que produce una gran cantidad de liposomas estables sin el uso de detergentes, solventes o alcoholes (Singh, 2006).

Normalmente, para la producción de liposomas se han utilizado extractos de fosfolípidos obtenidos de aceite de soja o de yema de huevo. En trabajos recientes en los que se han utilizado fracciones ricas en fosfolípidos de la MFGM, se ha observado que los liposomas resultantes son completamente diferentes en cuanto a su estructura y a sus propiedades (Thompson *et al.*, 2006).

Dentro de las muchas aplicaciones que podrían tener los liposomas en la industria alimentaria hay que destacar su papel como protectores de ingredientes particularmente sensibles, su importancia para aumentar la eficacia de los distintos aditivos alimentarios y su capacidad para confinar algunos sabores indeseables (Dewettinck *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

Los principales objetivos del trabajo que se presenta en esta memoria han sido:

- Obtención de las membranas del glóbulo graso de la leche de vaca y de oveja y caracterización de las proteínas por electroforesis utilizando diferentes métodos de tinción.
- Caracterización electroforética de las proteínas de la membrana del glóbulo graso presentes en diferentes *buttermilk* comerciales.
- Aplicación de un método de aislamiento para la obtención de la butirofilina de la membrana del glóbulo graso de leche de vaca.
- Aplicación de un método de aislamiento para la obtención de la parte extracelular de la mucina-1 (MUC 1) de la membrana del glóbulo graso de leche de oveja.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Muestras y reactivos

Las leches de oveja y de vaca fueron suministradas por la quesería Villacorona (El Burgo de Ebro, Zaragoza).

Los diferentes sueros de mantequilla o *buttermilk* comerciales fueron suministrados por la empresa Westland Milk Products (Hokitika, Nueva Zelanda).

Los geles de poliacrilamida para electroforesis Phastgel™, los tampones conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS-buffer strips) y los marcadores de peso molecular fueron suministrados por GE Healthcare (Uppsala, Suecia).

Los geles de cromatografía fueron suministrados por diferentes compañías: Sephacryl™ S-200 (Amersham Pharmacia Biotech. Uppsala, Suecia), Con A Sepharose™ 4B (GE Healthcare) y DEAE-Sephadex A50 (Amersham Pharmacia Biotech).

Los reactivos más específicos utilizados han sido los siguientes:

- PhMeSO₂F o PMSF (Boehringer. Mannheim, Alemania).
- Tripsina, benzamidina y deoxicolato de sodio (Sigma Aldrich. St. Louis, Estados Unidos).
- Quimosina recombinante EC. 3.4.23.4 (amablemente cedida por el laboratorio CHR Hansen. Madrid, España).
- Azul de Coomassie y SDS (SERVA GmbH & Co. Heidelberg, Alemania).
- Glicoprotein Staining Kit (Thermo Scientific. Meridian Rd. Rockford, Estados Unidos).
- 2-Mercaptoetanol (Merck. Darmstadt, Alemania).
- Metil- α -D-manopiranosido (Alfa Aesar. Karlsruhe, Alemania).
- Nitrato de plata y citrato de sodio (Panreac Química S.A. Barcelona, España).

El resto de productos utilizados a los que no se hace referencia fueron reactivos de tipo analítico obtenidos de diversas fuentes.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparación del *buttermilk* y el *butterserum* de vaca y oveja

4.2.1.1. Desnatado de la leche y lavado de la grasa

Se partió de leche cruda de vaca y oveja, de las que se obtuvo la grasa por centrifugación a 2000 g durante 15 minutos. La fracción grasa se sometió a tres lavados en cinco volúmenes de una solución de NaCl al 0,9%. Cada lavado consistía en la adición de la solución salina, agitación durante 15 minutos en un agitador de tubos (J. P. Selecta S. A., Barcelona, España) y después una centrifugación a 2000 g durante 15 minutos a 4°C, para volver a obtener la fracción grasa.

Una vez realizados los lavados se dejó la grasa en refrigeración a 4°C-durante 12 horas y después se añadió a la grasa un volumen del tampón Tris 50 mM, conteniendo NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y el inhibidor de proteasas PMSF 1 mM, equivalente al peso de la grasa.

4.2.1.2. Obtención del *buttermilk* y el *butterserum*

La fracción grasa extraída se mantuvo en la última solución durante 15 minutos en un agitador de tubos hasta que se formaron los granos de mantequilla. Para favorecer la formación de la mantequilla, los tubos se agitaron durante un minuto en un homogeneizador ultraturax (IKA Vortex Genius 3. Staufen, Alemania).

Para la obtención del suero de mantequilla o *buttermilk* se filtró la mantequilla por un paño de quesería. Para la obtención del *butterserum*, se calentó la mantequilla a 40°C durante 5 minutos y seguidamente se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos a 30°C. Tras esta centrifugación, quedaron tres fracciones en los tubos, una fina capa de grasa superficial, una capa intermedia de aceite de mantequilla o *butteroil* y una inferior que corresponde al *butterserum*.

4.2.1.3. Centrifugación del *buttermilk* y el *butterserum*

Los tubos con *buttermilk*, con *butterserum* o con una mezcla de ambos se centrifugaron a 100.000 g en una ultracentrífuga (Beckman Coulter TM, Palo Alto, California, Estados Unidos) durante 1 hora a 4°C, con el objetivo de obtener muestras

enriquecidas con las proteínas del MFGM. Los sobrenadantes y los precipitados obtenidos tras esta centrifugación fueron las muestras que posteriormente se analizaron por electroforesis.

4.2.2. Preparación de los *buttermilk* comerciales

Se disponía de tres tipos de *buttermilk* comerciales: α -serum powder, β -serum powder y Westland powder. Con el objetivo de conseguir una buena caracterización electroforética de los *buttermilk* se utilizó quimosina con y sin cloruro cálcico o citrato de sodio combinado con microfiltración, con el objetivo de eliminar las caseínas presentes en los preparados.

4.2.2.1. Incubación con quimosina

Se partió de 2 g de *buttermilk* que se resuspendieron en 20 ml de agua destilada. Se utilizaron 10 ml de esta suspensión para la incubación con quimosina y 10 ml para la incubación con quimosina y cloruro cálcico.

La cantidad de quimosina que se añadió a los 10 ml de la suspensión fue de 400 μ l de una solución de 1 mg/ml. A los otros 10 ml, además de la quimosina se les añadió 500 μ l de cloruro cálcico al 10%. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 1 hora y se centrifugaron los tubos a 2000 g durante 30 minutos, eliminando el precipitado y recogiendo el sobrenadante.

Los sobrenadantes se centrifugaron de nuevo durante 30 minutos a 11.000 g y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis por electroforesis.

4.2.2.2. Incubación con citrato sódico

Para realizar este ensayo tan sólo se utilizó el *buttermilk* comercial Westland powder, del cual se disolvieron 40 g en 400 ml de agua destilada. A esta solución se le añadieron 10 g de citrato de sodio, de forma que éste último quedó a una concentración del 2,5% (Morin *et al.*, 2007). La solución final se agitó a 4°C durante 12 horas.

Un volumen de 200 ml de la solución anterior se pasó por un filtro de 0,22 μm de poro y una superficie de 50 cm^2 (Pellicon XL, Millipore. Billerica, Estados Unidos) y los otros 200 ml por un filtro de 0,45 μm y 50 cm^2 (Pellicon XL, Millipore. Billerica, Estados Unidos). Para poder pasar la muestra por estos filtros se utilizó una bomba peristáltica. De ambas filtraciones se recogieron las fracciones de permeado y de solución retenida, que posteriormente se analizaron por electroforesis.

4.2.3. Aislamiento de la butirofilina

4.2.3.1. Desnatado de la leche y lavado de la grasa

Se partió de 2 litros de leche cruda de vaca que se desnataron mediante centrifugación a 3000 g durante 15 minutos. La fracción grasa se lavó cuatro veces en 5 volúmenes de un tampón Tris-HCl 0,01 M de pH 7,5, conteniendo sacarosa 0,25 M y MgCl_2 1 mM. Entre los lavados, los tubos que contenían la grasa con el tampón se agitaron 15 minutos y se centrifugaron a 3000 g durante 15 minutos a 10°C.

Tras realizar los lavados en las condiciones descritas, la fracción grasa se resuspendió en tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 hasta alcanzar un volumen de 100 ml. Esta suspensión se distribuyó en dos viales de plástico de 50 ml, que permanecieron durante 12 horas a una temperatura de 4°C.

4.2.3.2. Aislamiento de la MFGM

Los tubos con la fracción grasa se atemperaron a 12°C y se agitaron en un ultraturrax hasta que se formaron los granos de mantequilla. Con la mantequilla ya formada, se llevaron los tubos a un baño a 40°C con el objetivo de liberar las membranas del glóbulo graso atrapadas por los granos de mantequilla.

El *butter serum* resultante de este calentamiento se centrifugó a 100.000 g en una ultracentrífuga a 37°C durante 1 hora, tras lo cual se obtuvo un precipitado rojizo que se lavó dos veces con agua mili Q, y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Los precipitados conteniendo las membranas del glóbulo graso se guardaron en congelación a -80°C.

4.2.3.3. Cromatografía de afinidad con Concanavalina-A-Sepharose 4B

La Concanavalina-A es una lectina (proteína que se une a carbohidratos) extraída originalmente de la planta *Canavalia ensiformis*. Está compuesta por cuatro subunidades idénticas, cada una de 237 aminoácidos, que se disponen según los vértices de un tetraedro. La Concanavalina-A presenta también en su estructura iones metálicos, en concreto, un ión Mn^{++} y un ión Ca^{++} .

La Concanavalina-A se utiliza en la cromatografía de afinidad debido a que puede unirse específicamente a ciertas estructuras contenidas en varios azúcares, como el α -D-manósido y el α -D glucósido, presentes en glicoproteínas y glicolípidos (Battaner, 1993).

En nuestro ensayo, utilizamos una columna de Concanavalina A-Sepharose 4B (10 x 0,6 cm), previamente equilibrada con el tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 7,9, con NaCl 0,15 M y deoxicolato sódico al 0,25%. Tras equilibrar la columna, se aplicaron 5 ml de muestra a un flujo de 0,1 ml/minuto. Después de pasar la muestra, la columna se lavó con el mismo tampón a un flujo de 0,5 ml/ minuto, hasta que la absorbancia a 280 nm fue inferior a 0,02. Para la elución de las proteínas retenidas se utilizó el mismo tampón de equilibrado con α -metil-manósido 0,1 M, un azúcar que desplaza a las glicoproteínas unidas a la Concanavalina-A, y se llevó a cabo a un flujo de 0,3 ml/minuto. La pureza de las fracciones obtenidas se determinó mediante electroforesis con SDS, según el protocolo posteriormente indicado.

4.2.4. Aislamiento de la parte extracelular de la mucina-1

4.2.4.1. Desnatado de la leche y lavado de la grasa

Se partió de 2 litros de leche cruda de oveja los cuáles se desnataron mediante una centrifugación a 2000 g durante 15 minutos. La fracción grasa se lavó tres veces en el mismo volumen de un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y benzamidina 1 mM. Entre los lavados, los tubos que contenían la grasa con el tampón se agitaron 15 minutos y se centrifugaron a 2000 g durante 15 minutos a 10°C. Tras realizar los lavados, se resuspendió la grasa en la misma cantidad de tampón a 4°C.

4.2.4.2. Aislamiento de la MFGM

La fracción grasa lavada y mantenida a una temperatura de 4°C se llevó hasta los 12°C y se agitó en un ultraturrax hasta que se empezaron a formar los granos de mantequilla. El *buttermilk* se recogió por filtración a través de un paño de quesería y se centrifugó a 100.000 g durante 1 hora a 4°C, recogiendo el precipitado rico en MFGM. El precipitado se lavó dos veces con PBS (NaCl 140 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, KCl 2,7 mM pH 7,4), utilizando las mismas condiciones de centrifugación.

4.2.4.3 Liberación de la parte extracelular de la MUC-1 mediante tripsinización

Para la liberación de la parte extracelular de la mucina-1, los precipitados lavados con PBS se resuspendieron con un tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, conteniendo 0,4 mg/ml de tripsina y la mezcla se incubó durante 4 horas a 37°C. Después, la suspensión se ultracentrifugó a 100.000 g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se dializó frente a un tampón Tris-HCl 20 mM de pH 7, conteniendo benzamidina 1 mM y EDTA 1 mM. Este procedimiento de tripsinización libera el dominio extracelular de la mucina-1.

4.2.4.4. Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50

La cromatografía de intercambio iónico se basa en las interacciones electrostáticas y permite la separación de macromoléculas en función de sus cargas mediante su interacción diferencial con una fase estacionaria de naturaleza iónica. Es por ello una técnica ampliamente utilizada para la separación de proteínas.

La fase estacionaria consta de un intercambiador iónico, que contiene grupos cargados, unidos covalentemente a un soporte o matriz. Estos grupos están asociados a iones de carga opuesta o contraiones, la asociación reversible de éstos se intercambia y está en equilibrio con las moléculas de los solutos de su misma carga presentes en la muestra. La carga y naturaleza química de los intercambiadores determina la carga de los solutos iónicos que se unen a ellos y la fuerza con que lo hacen. Por su parte, la interacción de los solutos con los intercambiadores es más fuerte a medida que su relación carga/masa es mayor.

La fase estacionaria de la columna utilizada en este trabajo fue un intercambiador aniónico DEAE-Sephadex constituido por una matriz de dextrano con un grupo iónico (dietil-amino-etil) cargado positivamente (Figura 3). Por ello, en esta columna quedan retenidas las moléculas con carga negativa (aniones).

Un volumen de aproximadamente 10 ml de la muestra dializada tras la tripsinización, se aplicó en una columna de DEAE-Sephadex (10 x 2 cm) previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7, con benzamidina 1 mM y EDTA 1 mM. La columna se lavó con el mismo tampón y la elución de las proteínas retenidas se llevó a cabo con un gradiente de NaCl entre 200 y 400 mM a un flujo de 0,5 ml/minuto. La pureza de las fracciones obtenidas se determinó mediante electroforesis con SDS, según el protocolo posteriormente indicado.

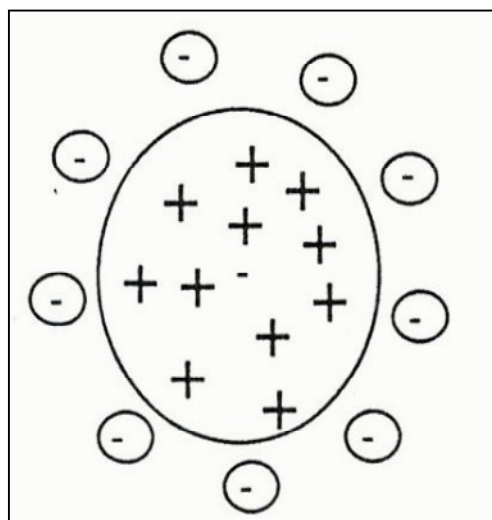


Figura 3. Fundamento de la cromatografía de DEAE-Sephadex utilizada en este ensayo

4.2.5. Electroforesis con SDS

Para preparar las muestras de proteína para su análisis por electroforesis, un volumen de 50 μ l de muestra se mezcló con 40 μ l de tampón Tris 10 mM, pH 8, que contenía EDTA 1 mM y azul de bromofenol, y con 10 μ l de SDS al 25% (p/v, en agua destilada) y se mantuvo a 100°C en un baño durante 5 minutos. Posteriormente, se aplicó con un peine 1 μ l de las muestras tratadas, en un gel de poliacrilamida en gradiente (8-25%).

La electroforesis se llevó a cabo en un equipo de electroforesis Phast System (Pharmacia LKB Biotechnology. Uppsala, Suecia) siguiendo el protocolo establecido.

4.2.6. Métodos de tinción de las electroforesis

4.2.6.1. Tinción con Azul de Coomassie

Este método de tinción utiliza la solución colorante compuesta por 0,65 g de Azul de Coomassie R, 300 ml de metanol, 100 ml de ácido acético y 500 ml de agua destilada. Tras mantener el gel sumergido en el colorante durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente, el colorante se retiró y se añadió una mezcla de decolorante compuesta por 250 ml de metanol, 80 ml de ácido acético, 20 ml de glicerina y 650 ml de agua destilada. El gel se mantuvo sumergido en el decolorante hasta que quedaron incoloras las zonas donde no había bandas de proteína, aproximadamente unas 4 horas.

4.2.6.2. Tinción específica para glicoproteínas (Glycoprotein Staining Kit)

Una vez concluida la electroforesis se fijaron las proteínas en el gel, para lo cual éste se sumergió en una solución de metanol al 50% en agua mili Q y se lavó dos veces con una solución de ácido acético al 3% en agua mili Q.

Después del lavado, el gel se sumergió en 10 ml de solución oxidante y se mantuvo en agitación suave durante 15 minutos. Para preparar la solución oxidante se añadieron 250 ml de ácido acético al 3% al reactivo oxidante incluido en el kit. Tras este paso se realizaron tres lavados con ácido acético al 3%. Seguidamente, el gel se transfirió a 10 ml del reactivo específico de tinción de glicoproteínas que contiene ácido peryódico de Schiff (PAS), en el que se dejó agitando durante 15 minutos.

Después, el gel se sumergió en 10 ml de solución reductora y se agitó durante 5 minutos. Para preparar la solución reductora se añadieron 250 ml de agua mili Q al reactivo reductor. Finalmente, el gel se lavó tres veces con ácido acético al 3%. Las bandas de glicoproteína aparecen de color magenta.

4.2.6.3. Tinción con plata de forma manual

Una vez realizada la electroforesis las proteínas se fijaron en el gel con una solución compuesta por etanol al 58,3% y ácido acético al 11,6% en agua mili Q durante aproximadamente 30 minutos. Seguidamente el gel se sumergió en una solución compuesta por la solución anterior al 11,6% en agua mili Q durante otros 30 minutos. Antes de sumergirlo en las posteriores soluciones se realizaron tres lavados con agua mili Q cada 30 segundos.

Posteriormente, el gel se sumergió en una solución de tiosulfato de sodio al 0,02% durante 1 minuto, y se volvió a lavar otras tres veces con agua mili Q cada 30 segundos.

A continuación el gel se colocó en una solución con nitrato plata al 0,2 % y 0,075% de formaldehído al 75% en agua mili Q, durante 5 minutos. En este paso es cuando las proteínas del gel fijan la plata. Se realizaron tres lavados con agua mili Q para eliminar el nitrato de plata sobrante.

Para revelar las bandas de proteína que fijaron la plata se utilizó una solución compuesta por 6% de carbonato de sodio, 0,05% de formaldehído al 37% y 2% de la solución compuesta por 0,02% de tiosulfato de sodio en agua mili Q. Hay que controlar cuidadosamente el tiempo de este revelado para que no aparezcan manchas pardo-amarillentas en el gel, que dificulten la visión de las bandas de proteína.

Después del revelado el gel se introdujo en una solución de ácido acético al 5% en agua mili Q durante 10 minutos y para finalizar la tinción, se sumergió en una solución de glicerol al 11,6% en agua mili Q durante 10 minutos, sin lavado entre ellas.

4.2.6.4. Tinción con plata en el Phast-System

Para realizar la tinción con plata en la unidad de tinción del equipo Phast System, fue necesario preparar una serie de soluciones como se describe a continuación.

La solución 1 estaba compuesta por etanol al 10% y ácido acético al 5% en agua destilada. Esta solución sirve de lavado y de fijación para las proteínas. El gel permaneció en contacto con la solución de fijación durante 6 minutos. A continuación

se colocó la solución 2 compuesta por glutaraldehído al 5%, con la que el gel estuvo en contacto 6 minutos, tras los cuales se volvió a colocar el gel en la solución 1 otros 8 minutos para eliminar los restos de glutaraldehído. Antes y después de impregnar el gel durante 7 minutos con la solución 3 de tinción, compuesta por nitrato de plata al 0,4%, se lavó en agua destilada.

A continuación, el gel se sumergió durante 5 minutos en la solución 4, compuesta por formaldehído al 0,13% y carbonato de sodio al 2,5%. Finalmente, el gel se lavó con la solución 5, compuesta por tiosulfato de sodio al 2,5%, pH 5,5, durante 2 minutos. Para la mejor conservación del gel se pasó por una solución de glicerol al 10%.

4.2.7. Secuenciación de bandas obtenidas en las electroforesis

Las bandas de gel teñidas con Azul de Coomassie correspondiente a las proteínas que se querían identificar, se escindieron cuidadosamente y se transfirieron a un vial que contenía 50 µL de agua mili Q. Esta muestra fue analizada mediante HPLC y espectroscopía de masas (MALDI-TOF) por la Unidad de Proteómica del Parque Científico de Barcelona, según el protocolo que se describe a continuación.

En primer lugar se realizó una reducción y alquilación de las muestras tras lo cual se llevo a cabo una digestión con tripsina. La identificación de los péptidos obtenidos se realizó mediante separación en cromatografía líquida acoplada a un sistema de análisis por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionization- Time of flight).

Una vez obtenidos los resultados de dicho análisis se realizó una búsqueda en la base de datos de proteínas del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI de sus siglas en inglés) con los parámetros de búsqueda predefinidos en el servidor MASCOT.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización electroforética del *buttermilk* y el *butterserum* de vaca y oveja

En la primera fase de este trabajo se ha puesto a punto un método para la obtención de las membranas del glóbulo graso de leche de vaca y se ha caracterizado la composición de sus proteínas. Los resultados de la caracterización electroforética se muestran en la Figura 4. En ellos se puede notar la gran importancia de la recuperación de las membranas que quedan atrapadas en los glóbulos grasos durante el proceso de batido de la grasa y que se recuperan con la obtención del *butterserum*. Esta fracción presenta una mayor concentración de proteínas de la MFGM que el *buttermilk* y enriquecen esta fracción en dichas proteínas cuando se combinan ambas fracciones.

Aunque se observan algunas proteínas de bajo peso molecular en el *buttermilk*, correspondientes a caseínas y proteínas del lactosuero, la mayoría de bandas que se visualizan tienen pesos moleculares superiores a 45 KDa que corresponden principalmente con los pesos moleculares de las proteínas de la MFGM.

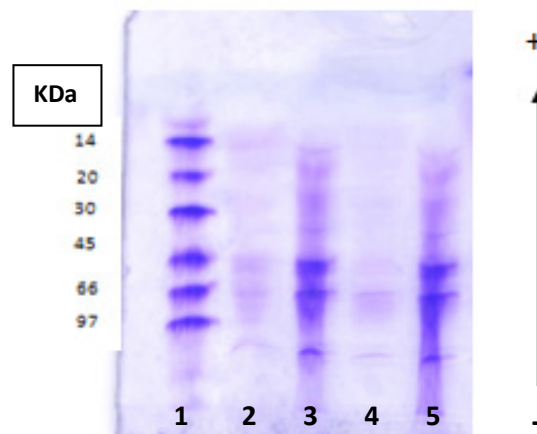


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente (8-25%) con SDS de las fracciones de *buttermilk* y *butterserum* de vaca. La tinción se ha realizado con Azul de Coomassie

1. Patrón de pesos moleculares, constituido por las siguientes proteínas: fosforilasa B (97,0 KDa), albúmina sérica bovina (67,0 KDa), ovoalbúmina (45,0 KDa), anhidrasa carbónica (30,0 KDa), inhibidor de tripsina (20,1 KDa) y α -lactalbúmina bovina (14,4 KDa)

2. *Buttermilk* de vaca

3. *Butterserum* de vaca

4. Precipitado del *buttermilk* de vaca

5. Precipitado del *buttermilk* + *butterserum* de vaca

En la electroforesis que se muestra en la Figura 5 aparecen las fracciones obtenidas a partir de los precipitados del *buttermilk* y el *butterserum* derivados de la grasa de leche de oveja, en comparación con las obtenidas de la grasa de leche de vaca.

Se puede ver que el perfil electroforético de las proteínas de los *buttermilk* y *butterserum* de vaca y oveja es bastante similar, pero en las fracciones de *buttermilk* de vaca aparecen más bandas que en el de oveja. Esto puede ser debido a una mayor concentración de proteínas en las muestras.

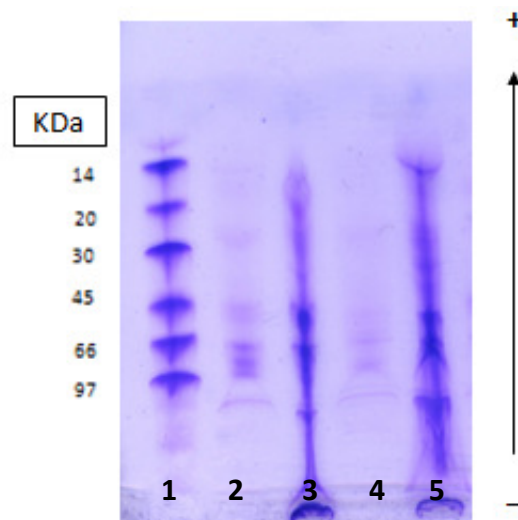


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente (8-25%) con SDS de las fracciones de *buttermilk* y *butterserum* de vaca y oveja. La tinción se ha realizado con Azul de Coomassie

1. Patrón de pesos moleculares, constituido por las siguientes proteínas: fosforilasa B (97,0 KDa), albúmina sérica bovina (67,0 KDa), ovoalbúmina (45,0 KDa), anhidrasa carbónica (30,0 KDa), inhibidor de tripsina (20,1 KDa) y α -lactalbúmina bovina (14,4 KDa)
2. Precipitado del *buttermilk* de vaca
3. Precipitado del *buttermilk* + *butterserum* de vaca
4. Precipitado del *buttermilk* de oveja
5. Precipitado del *buttermilk* + *butterserum* de oveja

Como se muestra en la Figura 6, en la electroforesis teñida con el kit específico para glicoproteínas observamos en todas las muestras, excepto en la del *buttermilk* de oveja, una serie de bandas con un peso molecular superior a 40 KDa, cuando se comparan las carreras con la correspondiente a la muestra utilizada como control positivo. Estas bandas podrían tratarse de algunas de las principales glicoproteínas de la MFGM, como la butirofilina, la mucina-1 y la lactadherina, entre otras. Por otra parte, se observan

algunas proteínas con un peso molecular por debajo de 40 KDa que pueden corresponder con proteínas del lactosuero, que no se han eliminado completamente en el lavado de la grasa y que no se ven tan intensamente teñidas debido a que algunas de ellas no son glicoproteínas.

El perfil de las carreras correspondientes a las muestras de *buttermilk* y *butterserum* muestran un arrastre que dificulta la visualización de las bandas y que puede deberse a la alta concentración de sales en las muestras, procedentes de las soluciones de lavado, por lo que sería conveniente eliminar las sales antes de analizar las fracciones utilizando este método de tinción.

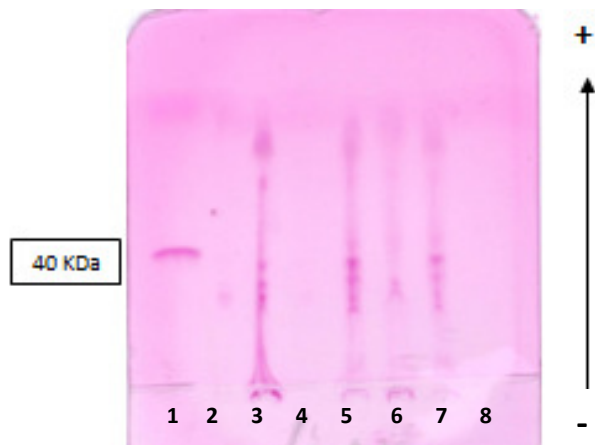


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente (8-25%) con SDS de fracciones de *buttermilk* y *butterserum* de vaca y de oveja. Tinción con el Glycoprotein Staining Kit

1. Control positivo: peroxidasa de rábano, peso molecular 40 KDa
2. Precipitado obtenido del *buttermilk* de vaca
3. Precipitado del *buttermilk* + precipitado del *butterserum* de vaca
4. Precipitado del *buttermilk* de oveja
5. Precipitado del *buttermilk* + precipitado del *butterserum* de oveja
6. *Butterserum* de oveja
7. Precipitado del *butterserum* oveja
8. Control negativo: inhibidor de la tripsina procedente de soja

5.2. Caracterización electroforética de diferentes *buttermilk* comerciales clarificados con quimosina con y sin cloruro cálcico

5.2.1. Incubación con quimosina

En este trabajo se han analizado tres productos comerciales en polvo, procedentes de suero de mantequilla, y amablemente cedidos por la compañía Westland Milk Products de Nueva Zelanda, cuyas diferencias en cuanto a la composición aparecen en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de los diferentes *buttermilk* comerciales utilizados (Westland Milk Products. Hokitika, Nueva Zelanda)

Buttermilk	Proteínas (% m/m)	Grasa (% m/m)	Humedad
α-Serum Powder	38,9	5	4,3
B-Serum Powder	30,3	22,2	3,7
Westland Powder	33,6	9,7	3,8

La presencia de una gran cantidad de caseínas en las soluciones obtenidas de los *buttermilk* comerciales, nos llevó a buscar un método para eliminarlas y facilitar así el análisis electroforético de las proteínas de la MFGM. En la electroforesis que se muestra en la Figura 8, se aprecia como los *buttermilk* a los que además de quimosina se les ha añadido cloruro cálcico se han clarificado mejor, puesto que la cantidad de caseínas que quedan en el sobrenadante final es mucho menor, como se resalta en rojo en la imagen. Esta clarificación podría facilitar la obtención de las proteínas de la MFGM, que se encuentran en estos productos comerciales en baja concentración, como se aprecia en las bandas que aparecen por debajo de las caseínas.

En la Figura 7, vemos como con la tinción de plata realizada de forma manual, en comparación con la realizada en la unidad de tinción del Phast System, aparece un perfil proteico muy parecido pero las bandas correspondientes a las proteínas de la MFGM, se visualizan mejor.

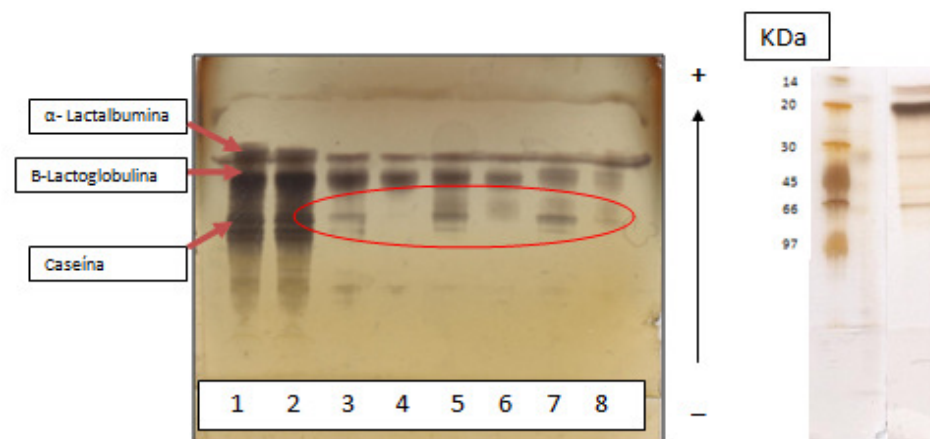


Figura 7 (derecha). Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente (8-25%) con SDS del α -serum powder tratado con quimosina y cloruro cálcico. La tinción se realizó con plata de forma manual

Figura 8 (izquierda). Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente (8-25%) con SDS de los diferentes sobrenadantes obtenidos de los *buttermilk* comerciales clarificados. La tinción se realizó con plata en la unidad de tinción del Phast-System. Todas las muestras están diluidas 1/10

1. α -Serum powder
2. β -Serum powder
3. α -Serum powder tratado con quimosina
4. α -Serum powder tratado con quimosina y cloruro cálcico
5. β -Serum powder tratado con quimosina
6. β -Serum powder tratado con quimosina y cloruro cálcico
7. Westland powder tratado con quimosina
8. Westland powder tratado con quimosina y cloruro cálcico

Los resultados obtenidos con los productos comerciales derivados del suero de mantequilla, indican que la fracción derivada del producto α -serum powder tras tratamiento con quimosina, es la que presenta una mayor concentración de las proteínas de la MFGM, correspondiéndose con su composición. Sin embargo, habría que utilizar un método de concentración para poder obtener las proteínas del MFGM en una cantidad importante.

5.2.2. Incubación con citrato de sodio

En los procedimientos de obtención de la MFGM a partir de la grasa láctea, las caseínas y las proteínas del suero son eliminadas en los lavados a los que se somete la fracción grasa con los diferentes tampones (Corredig *et al.*, 2003). Sin embargo, esto no es aplicable en el aislamiento de MFGM a partir de los *buttermilk* comerciales. Por ello, en

este trabajo se ha ensayado la utilización del citrato de sodio combinado con una microfiltración con filtros de tamaño de poro entre 0,1 y 1,4 μm según el procedimiento de Morin *et al.* (2004). El citrato de sodio provoca la disociación de las micelas de caseína, haciendo que pasen a través del filtro concentrando la MFGM en el retenido (Morin *et al.*, 2007). En la Figura 9, observamos el efecto de la combinación del citrato de sodio y la microfiltración sobre uno de los *buttermilk* comerciales, el Westland powder.

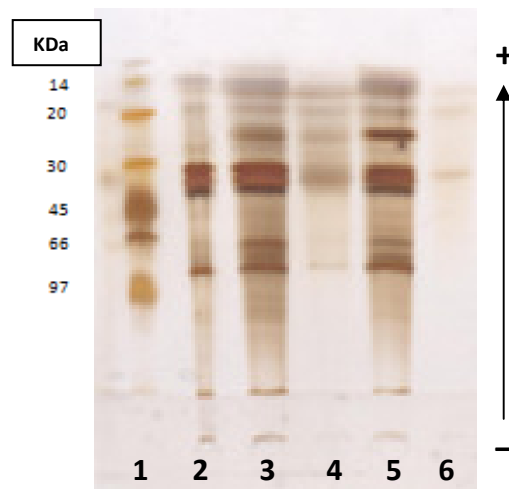


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente (8-25%) con SDS del Westland powder tratado con citrato sódico y sometido a microfiltración. La tinción se realizó con plata de forma manual

1. Patrón de pesos moleculares, constituido por las siguientes proteínas: fosforilasa B (97,0 KDa), albúmina sérica bovina (67,0 KDa), ovoalbúmina (45,0 KDa), anhidrasa carbónica (30,0 KDa), inhibidor de tripsina (20,1 KDa) y α -lactalbúmina bovina (14,4 KDa)
2. Westland powder. Dilución 1/50
3. Westland powder con citrato sódico. Filtro 0,2 μm . Concentrado. Dilución 1/100
4. Westland powder con citrato sódico. Filtro 0,2 μm . Permeado. Dilución 1/50
5. Westland powder con citrato sódico. Filtro 0,45 μm . Concentrado. Dilución 1/100
6. Westland poder con citrato sódico. Filtro 0,45 μm . Permeado. Dilución 1/50

Las caseínas presentes en el *buttermilk* comercial siguen apareciendo en los concentrados tanto de 0,2 como de 0,45 μm y dónde tendrían que salir sería en el permeado. En los concentrados sí que observamos sin embargo una mayor concentración de proteínas con pesos moleculares entre 66 y 97 KDa, las cuales se corresponden con las proteínas de la membrana del glóbulo graso. La presencia de caseínas en el *buttermilk*, a pesar de haber realizado la adición de citrato sódico y la

microfiltración, podría deberse a que se ha utilizado un sistema y unas condiciones de filtración diferente al utilizado por Morin *et al.* (2007).

5.3. Aislamiento de la butirofilina

En este apartado se muestran los resultados de las cromatografías que se llevaron a cabo en la columna de Concanavalina-A-Sepharose 4B para la obtención de butirofilina, en dos aislamientos diferentes. En ambos aislamientos se partió de una fracción enriquecida en la MFGM de leche de vaca y se siguió el procedimiento descrito por Imam *et al.* (1981), en el cual a partir de leche cruda conseguían el aislamiento de una proteína de un peso molecular alrededor de 70 KDa, sometiendo al *buttermilk* a una serie de ultracentrifugaciones y a una posterior cromatografía en Concanavalina-A.

5.3.1. 1^{er} Aislamiento

En el cromatograma del primer aislamiento (Figura 10) se observan dos picos, el primero corresponde con las proteínas que no son retenidas por la Concanavalina y el segundo contiene las proteínas retenidas, que han sido desplazadas por el α -metil-manósido. En el pico obtenido tras pasar por la columna el tampón de elución conteniendo α -metil-manósido debería localizarse la butirofilina.

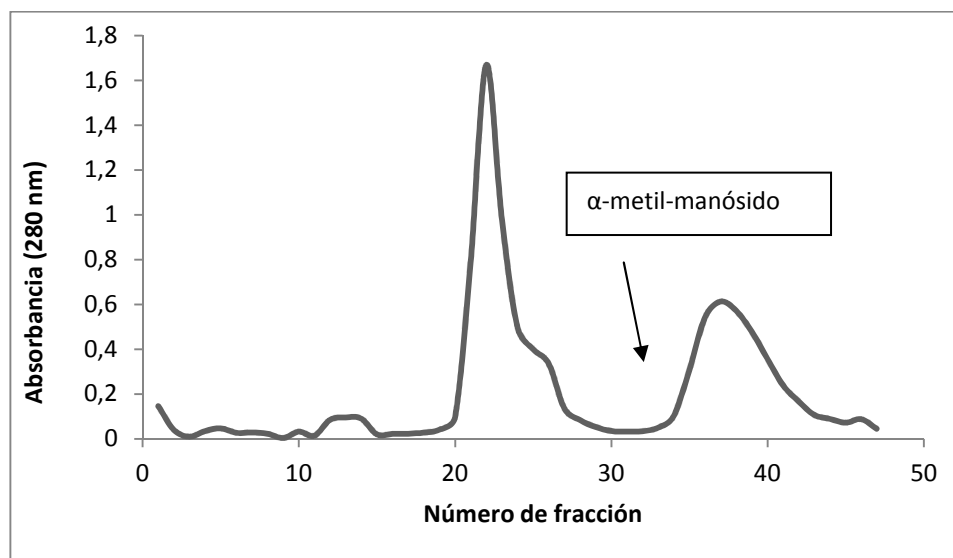


Figura 10. Perfil de la cromatografía del 1er aislamiento, realizada en Concanavalina-A-Sepharose 4B de la fracción enriquecida en proteínas de la MFGM de leche de vaca. Las fracciones recogidas fueron de 2 ml

En la figura 11 se muestra la electroforesis de las fracciones obtenidas de la cromatografía anterior.

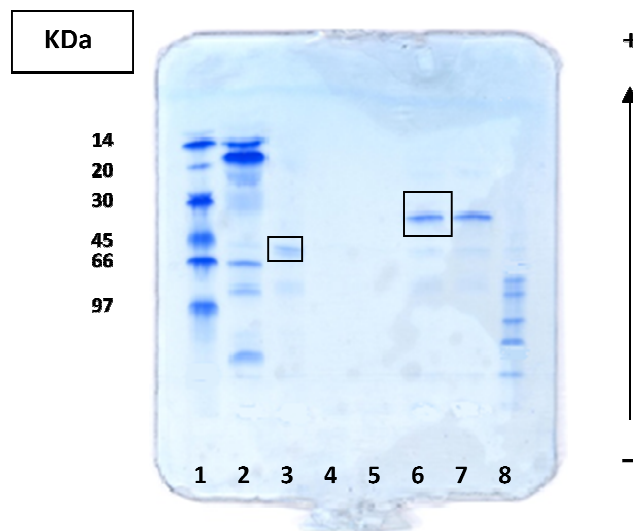


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente (8-25%) con SDS de las fracciones de la cromatografía del 1^{er} aislamiento realizada en Concanavalina-A-Sepharose 4B. La tinción se realizó con Azul de Coomassie

1. Patrón de pesos moleculares, constituido por las siguientes proteínas: fosforilasa B (97,0 KDa), albúmina sérica bovina (67,0 KDa), ovoalbúmina (45,0 KDa), anhidrasa carbónica (30,0 KDa), inhibidor de tripsina (20,1 KDa) y α -lactalbúmina bovina (14,4 KDa)
2. Lactosuero obtenido por coagulación enzimática
3. Muestra aplicada a la columna de cromatografía
4. Fracción 22
5. Fracción 24
- 6,7. Fracción 39
8. Patrón de pesos moleculares constituido por las siguientes proteínas: miosina (220 KDa), α 2-macroglobulina (170 KDa), β -galactosidasa (116 KDa), transferrina (76KDa), glutamato-deshidrogenasa (53 KDa)

La banda mayoritaria que aparece en la carrera 6 de esta electroforesis, correspondiente al máximo del pico del eluido con el α -metil-manósido se envió a secuenciar. El análisis evidenció que se trataba de un precursor de la Concanavalina-A, por lo que parece que el ligando se estaba liberando de la fase estacionaria en la elución cromatográfica. También se envió a secuenciar la banda mayoritaria de la carrera 3, que resultó corresponder con la secuencia de la lactadherina, una proteína cuantitativamente importante de la membrana del glóbulo graso con un peso molecular de alrededor de 50 KDa.

5.3.2. 2º Aislamiento

En el segundo aislamiento se obtuvo un perfil cromatográfico similar al del primero, como se muestra en la Figura 12.

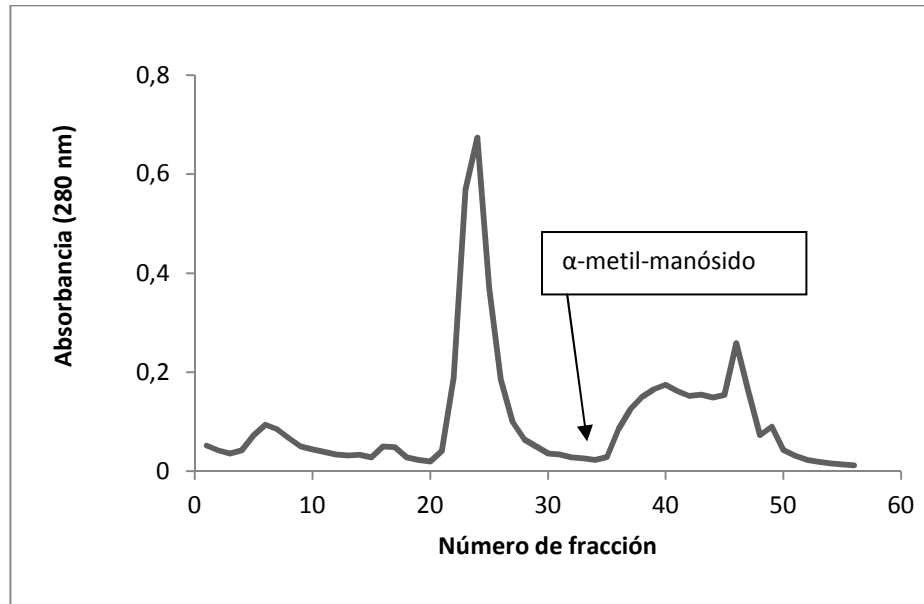


Figura 12. Perfil de la cromatografía del 2º aislamiento realizada en Concanavalina-A-Sepharose 4B de la fracción enriquecida en proteínas de la MFGM de leche de vaca. Las fracciones recogidas fueron de 2 ml

En la electroforesis de la Figura 13 aparecen las fracciones de la cromatografía de Concanavalina-A del 2º aislamiento comparadas con las obtenidas en el 1º aislamiento. La sensibilidad y resolución que se obtiene al realizar la tinción con plata es mayor que cuando se realiza con Azul de Coomassie, según se muestra en la Figura 11. En la carrera 6 se observa una banda de un peso molecular alrededor de 70 KDa (marcada en rojo) que podría ser la butirofilina (Imam *et al.*, 1981). Esta banda no se veía en la tinción con Azul de Coomassie del anterior aislamiento debido a la menor sensibilidad de este método de tinción.

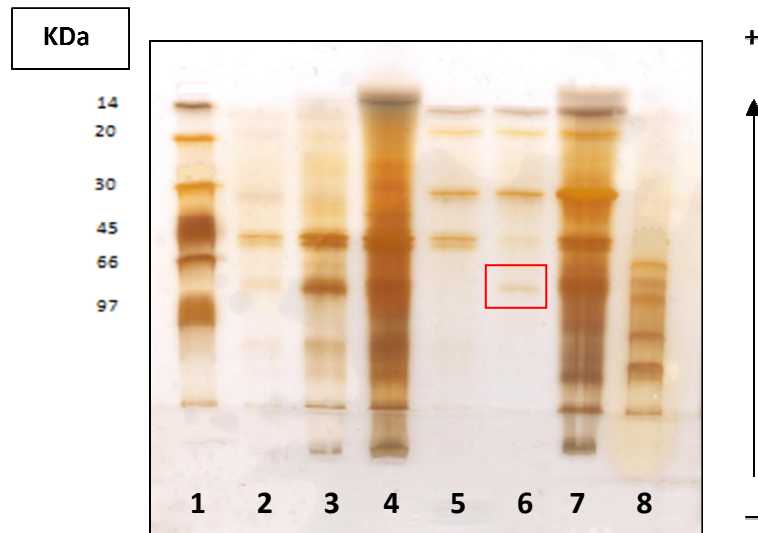


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente (8-25%) con SDS, de las fracciones de las cromatografías del 2º y 1º aislamiento realizadas en Concanavalina-A-Sepharose 4B. La tinción se realizó con plata de forma manual

1. Patrón de pesos moleculares, constituido por las siguientes proteínas fosforilasa B (97,0 KDa), albúmina sérica bovina (67,0 KDa), ovoalbúmina (45,0 KDa), anhidrasa carbónica (30,0 KDa), inhibidor de tripsina (20,1 KDa) y α -lactalbúmina bovina (14,4 KDa)
2. *Buttermilk* de vaca diluido 1/20
3. Muestra aplicada a la cromatografía. 2º aislamiento
4. Muestra aplicada a la cromatografía. 1º aislamiento
5. Fracción 24. 2º aislamiento
6. Fracción 47. 2º aislamiento
7. Fracción 39. 1º aislamiento
8. Patrón de pesos moleculares constituido por las siguientes proteínas: miosina (220 KDa), α 2-macroglobulina (170 KDa), β -galactosidasa (116 KDa), transferrina (76 KDa), glutamato-deshidrogenasa (53 KDa)

5.4. Aislamiento de la parte extracelular de la mucina-1

En este apartado se muestran los resultados de la cromatografía que se llevó a cabo en la columna de DEAE-Sephadex A-50 (Figura 14) para la obtención de la parte extracelular de la mucina-1 a partir de leche de oveja. Para este aislamiento se siguió el procedimiento llevado a cabo por Sando *et al.* (2009), en el cual a partir de leche cruda se obtenía la parte extracelular de la mucina-1 sometiendo al *buttermilk* obtenido tras el batido de la grasa a una serie de ultracentrifugaciones y a una tripsinización. Este tratamiento de hidrólisis permite liberar el fragmento extracelular de esta proteína, el cual tiene un peso molecular de alrededor de 32 KDa.

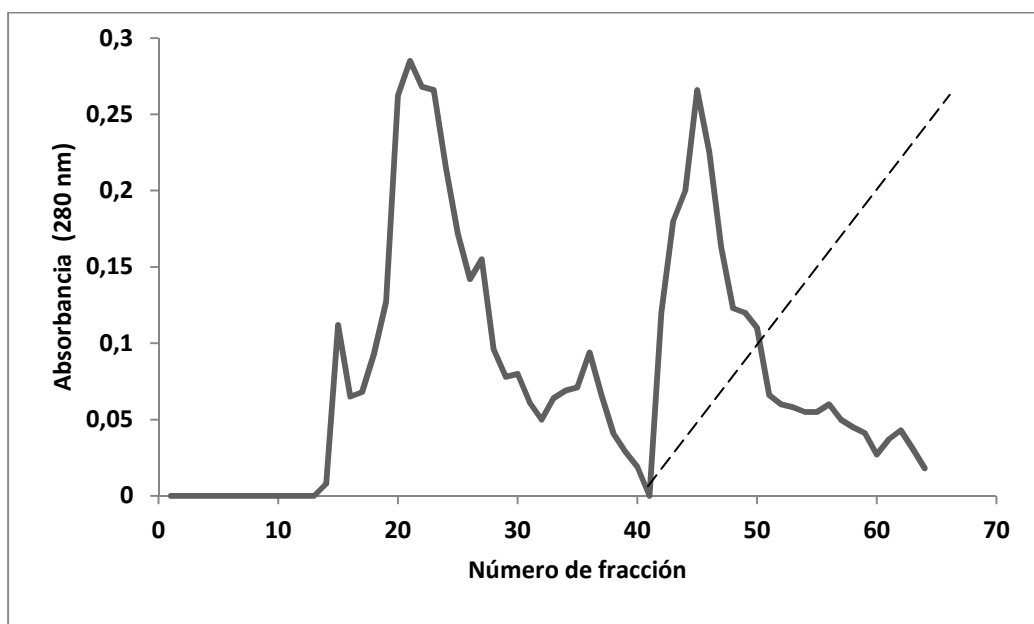


Figura 14. Perfil de la cromatografía en DEAE-Sephadex de la fracción enriquecida en la parte extracelular de la mucina-1 obtenida tras la tripsinización de la fracción enriquecida en proteínas de la MFGM de leche de oveja. Las fracciones recogidas fueron de 2 ml. La línea discontinua negra representa el gradiente de NaCl de 200 mM a 400 mM aplicado para la elución

En la electroforesis de la Figura 15, se incluyen las muestras de las diferentes etapas del proceso de aislamiento de la parte extracelular de la mucina-1, incluyendo las obtenidas en la cromatografía en DEAE-Sephadex.

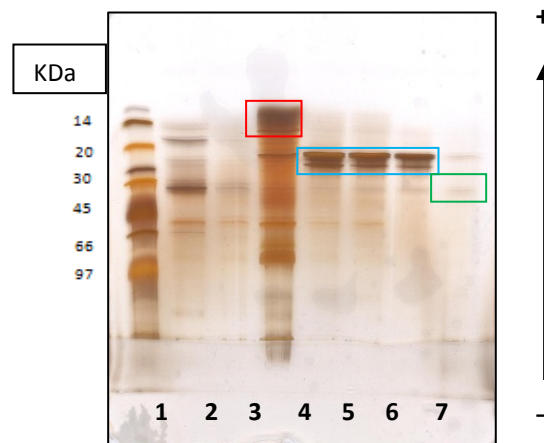


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente (8-25%) con SDS de las diferentes etapas seguidas para el aislamiento de la parte extracelular de la mucina-1 incluyendo las fracciones de la cromatografía en DEAE-Sephadex A-50. La tinción se realizó con plata de forma manual

1. Patrón de pesos moleculares, constituido por las siguientes proteínas: fosforilasa B (97,0 KDa), albúmina sérica bovina (67,0 KDa), ovoalbúmina (45,0 KDa), anhidrasa carbónica (30,0 KDa), inhibidor de tripsina (20,1 KDa) y α -lactalbúmina bovina (14,4 KDa)
2. Sobrenadante obtenido tras ultracentrifugación del *buttermilk* de oveja
3. Lavado del precipitado obtenido tras ultracentrifugación del *buttermilk* de oveja
4. Precipitado obtenido tras ultracentrifugación del *buttermilk* de oveja y sometido a tripsinización
5. Sobrenadante obtenido tras ultracentrifugación del *buttermilk* de oveja y sometido a tripsinización
6. Sobrenadante obtenido tras ultracentrifugación del *buttermilk* de oveja y sometido a tripsinización y diálisis
7. Fracción 22 de la cromatografía en DEAE-Sephadex
8. Fracción 45 de la cromatografía en DEAE-Sephadex

En la electroforesis vemos como en el precipitado obtenido tras la tripsinización, hay una banda muy extensa (marcada con rojo) en la región de bajo peso molecular de la carrera 4. Esta banda corresponde probablemente a péptidos que se encuentran agregados tras la hidrólisis y que se dispersan con el tampón en el que se disuelven las muestras para analizarlas por electroforesis. En las carreras 5, 6 y 7 se observan bandas a la altura de los 23 KDa, que corresponden con la tripsina (marcada en azul), y una banda un poco más tenue a la altura de los 32 KDa, que coincide con la parte extracelular de la mucina (Sando *et al.*, 2009). En la carrera 8, fracción que corresponde a la elución de la columna con el gradiente de NaCl, vemos que la tripsina se ha eliminado casi por completo y queda la parte extracelular de la mucina-1 con un mayor grado de pureza (marcada en verde).

6. CONCLUSIONES

El trabajo realizado nos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- Cuando se utiliza la electroforesis como técnica para caracterizar las proteínas de la membrana del glóbulo graso, que se encuentran en baja concentración, la técnica de tinción con plata de forma manual sería la de elección, por ser la más sensible de las ensayadas.
- Para conseguir una mayor recuperación de las proteínas de la membrana del glóbulo graso de la leche es importante obtener el *butterserum*, en el que estas proteínas están concentradas, y añadirlo al *buttermilk*.
- La utilización de la quimosina con cloruro cálcico resulta más efectiva que la combinación del citrato de sodio con la microfiltración para la eliminación de las caseínas presentes en los *buttermilk* comerciales.
- La cromatografía de afinidad en Concanavalina-A permite obtener una proteína de la membrana del glóbulo graso de un peso molecular de 70 KDa, que posiblemente se identifica con la butirofilina.
- La cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sephadex permite obtener una fracción enriquecida en la parte extracelular de la mucina-1, eliminando casi por completo tanto la tripsina utilizada para su liberación como las otras proteínas presentes en la muestra de partida.

7. BIBLIOGRAFÍA

Artículos y libros:

- Björck, L., Claesson, O. 1979. Xanthine oxidase as a source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase system in milk. *Journal of Dairy Science*, 62, 1211-1215.
- Corredig, M., Dalgleish, D.G. 1997. Isolates from industrial buttermilk: Emulsifying properties of materials derived from the milk fat globule membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4595-4600.
- Corredig, M., Roesch, R.R., Dalgleish, D.G. 2003. Production of a novel ingredient from buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 86, 2744-2750.
- 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. *International Dairy Journal*, 18, 436-457.
- Duan, R.D., Cheng, Y.J., Hansen, G., Hertervig, E., Liu, J.J., Syk, I. 2003. Purification, localization, and expression of human intestinal alkaline sphingomyelinase. *Journal of Lipid Research*, 44, 1241-1250.
- El-loly, M.M. 2011. Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane-a review. *Food and Nutrition Sciences*, 61, 7-32.
- Hvarregaard, J., Andersen, M.H., Berglund, L., Rasmussen, J.T., Petersen, T.E. 1996. Characterization of glycoprotein PAS 6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *European Journal of Biochemistry*, 240, 628-636.
- Imam, A., Laurence, J.R., Neville, A.M. 1981. Isolation and characterization of a major glycoprotein from milk-fat globule membrane of human breast milk. *Biochemical Journal*, 193, 47-54.
- Kanno, C., Shimomura, Y., Takano, E. 1991. Physicochemical properties of milk-fat emulsions stabilized with bovine milk fat globule membrane. *Journal of Food Science*, 56, 1219-1223.
- Kidd, P.M. 2002. Phospholipids: Versatile nutraceutical ingredients for functional foods. *Functional Foods and Nutraceuticals*, 12, 30-40.

- Kvistgaard, A.S., Pallesen, L.T., Arias, C.F., López, S., Petersen, T.E., Heegaard, C.W., Rasmussen, J.T. 2004. Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infection. *Journal of Dairy Science*, 87, 4088-4096.
- 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. *Journal of Dairy Science*, 92, 3592-3603.
- Martin, H.M., Hancock, J.T., Salisbury, V., Harrison, R. 2004. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infection and Immunity*, 72, 4933-4939.
- Mather, I.H. 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *Journal of Dairy Science*, 83, 203-247.
- Mather, I.H., Keenan, T.W. 1998. Origin and secretion of milk lipids. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3, 259-273.
- Merrill, A.H., Schmelz, E.M., Sullards, M.C., Dillehay, D.L. 2001. Sphingolipids: Novel inhibitors of colon carcinogenesis: Dairy nutrition for a healthy future. *Bulletin-International Dairy Federation*, 363, 27-29.
- Morin, P., Britten, M., Jiménez-Flores, R., Pouliot, Y. 2007. Microfiltration of buttermilk and washed cream buttermilk for concentration of milk fat globule membrane components. *Journal of Dairy Science*, 90, 2132-2140.
- Morin, P., Jimenez-Flores, R., Pouliot, Y. 2007. Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, 17, 1179-1187.
- Morin, P., Jimenez-Flores, R., Pouliot, Y. 2004. Effect of temperature and pore size on the fractionation of fresh and reconstituted buttermilk by microfiltration. *Journal of Dairy Science*, 87, 267-273.
- Newburg, D.S., Peterson, J.A., Ruiz-Palacios, G.M., Matson, D.O., Morrow, A.L., Shults, J., Guerrero, M.L., Chaturvedi, P., Newburg, S.O., Scallan, C.D., Taylor, M.R., Ceriani, R.L., Pickering, L.K., 1998. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet*, 351, 1160-1164.

- Nielsen, R.L., Andersen, M.H., Mabhout, P., Berglund, L., Petersen, T.E., Rasmussen, J.T. 1999. Isolation of adipophilin and butyrophilin from bovine milk and characterization of a c DNA encoding adipophilin. *Journal of Dairy Science*, 82, 2543-2549.
- Pallesen, L.T., Andersen, M.H., Nielsen, R.L., Berglund, L., Petersen, T.E., Rasmussen, L.K., Rasmussen, J.T. 2001. Purification of MUC 1 from bovine milkfat globules and characterization of a corresponding full length cDNA Clone. *Journal of Dairy Science*, 84, 2591-2598.
- Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88-113.
- Riccio, P. 2004. The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. *Food Science and Technology*, 15, 458-461.
- Sando, L., Pearson, R., Gray, C., Parker, P., Hawken, R., Thomson, P.C., Meadows, J.R.S., Kongsuwan, K., Smith, S., Tellam, R.L. 2009. Bovine MUC 1 is a highly polymorphic gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria. *Journal of Dairy Science*, 92, 5276-5291.
- Singh, H. 2006. The milk fat globule membrane-a biophysical system for food applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 11, 154-163.
- Spitsberg, V.L. 2005. Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science*, 88, 2289-2294.
- Spitsberg, V.L., Gorewit, R.C. 1998. Solubilization and purification of xanthine oxidase from bovine milk fat globule membrane. *Protein Expression and Purification*, 13, 229-234.
- Spitsberg, V.L., Gorewit, R.C. 2002. Isolation, purification and characterization of fatty-acid binding protein from milk fat globule membrane: Effect of bovine growth hormone treatment. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1, 43-48.
- Thompson, A.K., Haisman, D., Singh, H. 2006. Physical stability of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soya phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6390-6397.

- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., Blecker, C. 2010. Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, 14, 485-500.
- 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.
- Vesper, H., Schmelz, E.M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V., Merrill, A.H. 1999. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *Journal of Nutrition* 129, 1239-1250.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. 2001. Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos. Ed Acribia, S.A. Zaragoza. ISBN: 84-200-0961-X
- Wang, X., Hirno, S., Willen, R., Wadstrom, T. 2001. Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. *Journal of Medical Microbiology*, 50, 430-435.

Sitios Web:

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Modelos moleculares. Universidad Salamanca. Página desarrollada por Dr. Enrique Battaner Arias.
<http://campus.usal.es/~dbbm/modmol/modmol05/mm05t01.htm>

Otros:

Decreto 2484/1967, del 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del código alimentario español. Boletín oficial del estado, 28, 17 Octubre 1967, 14180-14187. BOE-A-1967-16485.