



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

**Estudio del efecto de los tratamientos tecnológicos en la
desnaturalización de las proteínas alergénicas alimentarias**

Study of the effect of technological treatments on the denaturation of
food allergenic proteins

Autora

María Gistas Loscos

Directoras

M^a Dolores Pérez Cabrejas

Isabel Segura Gil

Facultad de Veterinaria

2017-2018

ÍNDICE

Resumen.....	3
Abstract.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Alergia alimentaria.....	7
1.2 Alérgenos alimentarios.....	8
1.3 La soja.....	8
1.3.1 Proteínas de la soja.....	10
1.3.2 Alérgenos de la soja.....	12
1.4 Tratamientos tecnológicos.....	13
1.4.1 Tratamientos térmicos.....	14
1.4.2 Altas presiones hidrostáticas.....	15
1.4.3 Ultrasonidos.....	17
2 OBJETIVOS.....	18
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
3.1 Materiales.....	19
3.2 Métodos.....	19
3.2.1 Aislamiento de glicinina y β -conglucina.....	19
3.2.1.1 Extracción de proteínas de la soja.....	19
3.2.1.2 Precipitación isoelectrica.....	20
3.2.1.3 Precipitación salina.....	20
3.2.1.4 Cromatografía de exclusión molecular.....	20
3.2.2 Determinación de la concentración de proteínas.....	21
3.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	21
3.2.3.1 Preparación del gel.....	21
3.2.3.2 Electroforesis SDS-page.....	22
3.2.4 Técnica de ELISA de tipo Sándwich.....	22
3.2.5 Determinación del espectro de fluorescencia.....	23
3.2.6 Medida de la fluorescencia mediante “quenching” con acrilamida.....	23
3.2.7 Tratamientos tecnológicos.....	24
3.2.7.1 Tratamientos térmicos.....	24
3.2.7.2 Tratamientos con altas presiones.....	24

3.2.7.3	Ultrasonidos.....	24
3.2.8	Estadística.....	25
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1	Aislamiento de glicinina y β -conglucina.....	26
4.2	Determinación de la concentración de glicinina y β -conglucina mediante técnicas ELISA tipo sándwich.....	28
4.3	Efecto de los tratamientos tecnológicos en la glicinina y β -conglucina	29
4.3.1	Efecto de los tratamientos térmicos.....	29
4.3.1.1	Determinación de la inmunorreactividad.....	29
4.3.1.2	Determinación del espectro de fluorescencia e hidrofobicidad.....	32
4.3.1.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	34
4.3.2	Efecto de los tratamientos de altas presiones.....	36
4.3.2.1	Determinación de la inmunorreactividad.....	36
4.3.2.2	Determinación del espectro de fluorescencia e hidrofobicidad.....	39
4.3.2.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	41
4.3.3	Efecto de los tratamientos de ultrasonidos.....	42
4.3.3.1	Determinación de la inmunorreactividad y electroforesis en gel de poliacrilamida.....	42
5	CONCLUSIONES.....	45
6	BIBLIOGRAFÍA.....	46

Resumen

Las proteínas de la soja son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria por su valor nutricional, así como por sus propiedades tecnológicas y su precio competitivo. Sin embargo, también constituyen una de las principales causas de alergia alimentaria.

Los alimentos son sometidos a tratamientos tecnológicos para su higienización, así como para alargar su conservación. Por ello, el efecto que dichos tratamientos tienen en la estructura de las proteínas alergénicas de la soja es de gran relevancia ya que pueden inducir su desnaturalización, y afectar en consecuencia a su capacidad alergénica y/o a su detección.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de algunos tratamientos tecnológicos en la desnaturalización de las proteínas más abundantes y alergénicas de la soja, la glicinina y la β -conglucina.

Para llevar a cabo este trabajo, las proteínas se purificaron a partir de soja cruda mediante técnicas de precipitación y cromatografía. Las proteínas puras y un extracto proteico de soja se sometieron a tratamiento térmico, de altas presiones y ultrasonidos. El efecto de estos tratamientos se ha determinado midiendo la inmunorreactividad mediante una técnica de ELISA de tipo sándwich, así como utilizando técnicas de espectroscopía de fluorescencia y electroforéticas.

Los tratamientos térmicos y de altas presiones aplicados a la glicinina y la β -conglucina purificadas producen cambios en su estructura que disminuyen su inmunorreactividad y aumentan su hidrofobicidad. El grado de desnaturalización térmica es menor en la glicinina que en la β -conglucina en los tratamientos menos intensos pero mayor en los tratamientos más severos. El tratamiento de altas presiones a 400 MPa induce un marcado descenso en la inmunorreactividad de ambas proteínas, que disminuye muy poco a presiones mayores. Sin embargo, los tratamientos de ultrasonidos no parecen afectar sustancialmente a la estructura de la glicinina y la β -conglucina.

El conjunto de los resultados obtenidos indica que tanto los tratamientos térmicos como las altas presiones inducen la desnaturalización de la glicinina y la β -conglucina y que el grado de desnaturalización depende de la intensidad del tratamiento aplicado, así como del medio del tratamiento y de las características intrínsecas de cada proteína.

Abstract

Soybean proteins are widely used in food industry owing to their functional properties and their affordable cost. Nonetheless, they are also one of the most common causes of food allergy.

Food is subjected to several technological treatments for sterilization and to improve their properties. Therefore, the effect of these treatments in soybean allergenic protein structure is relevant due to they can induce denaturation and consequently affect to its allergenic capacity and its detection.

This project aim was to study the effect of technological treatments (thermal and non-thermal) in soybeans allergenic proteins, glycinin and β -conglycinin, denaturalization.

In order to accomplish this aim, allergenic proteins were purified from raw soybeans using isoelectric and salt precipitation techniques and a size exclusion chromatography. Purified proteins and the whole protein extract were subjected to several intensities and times of thermal, high-pressure and ultrasounds treatments. Treatments effects, in glycinin and β -conglycinin, were determinate by testing immunoreactivity lost with an ELISA sandwich and with fluorescence and electrophoretic techniques.

The results obtained indicate that thermal and high-pressure treatments changes glycinin and β -conglycinin structure. Thermal denaturation degree is lower in glycinin than in β -conglycinin in the less intensity treatments but higher in the more severe treatments. 400 MPa high pressure treatment decrease immunorreactivity of both proteins.

Nevertheless, ultrasound treatment does not seem to affect glycinin and β -conglycinin structure. All result obtained conclude that glycinin and β -conglycinin denaturalization depends on the treatment intensity, as well as, on the treatment medium and the intrinsic characteristics of each protein.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Alergia alimentaria

Se define la alergia alimentaria como aquella reacción adversa debida a la ingestión, contacto o inhalación de alimentos cuya patogenia es de origen inmunitario. La alergia alimentaria incluye tanto las reacciones mediadas por inmunoglobulinas de tipo E (IgE), como las mediadas por otro tipo de mecanismo inmunitario, como pueden ser otros tipos de inmunoglobulinas o células del sistema inmune. También es posible la participación mixta de varios mecanismos inmunitarios.

Las reacciones alérgicas mediadas por IgE son las más comunes y mejor caracterizadas y se les denomina alergias de tipo inmediato ya que su presentación tiene lugar tras un tiempo corto (generalmente menor de 2 horas) tras la ingesta del alimento. Estas reacciones constan de dos etapas: sensibilización y reacción alérgica (Figura 1).

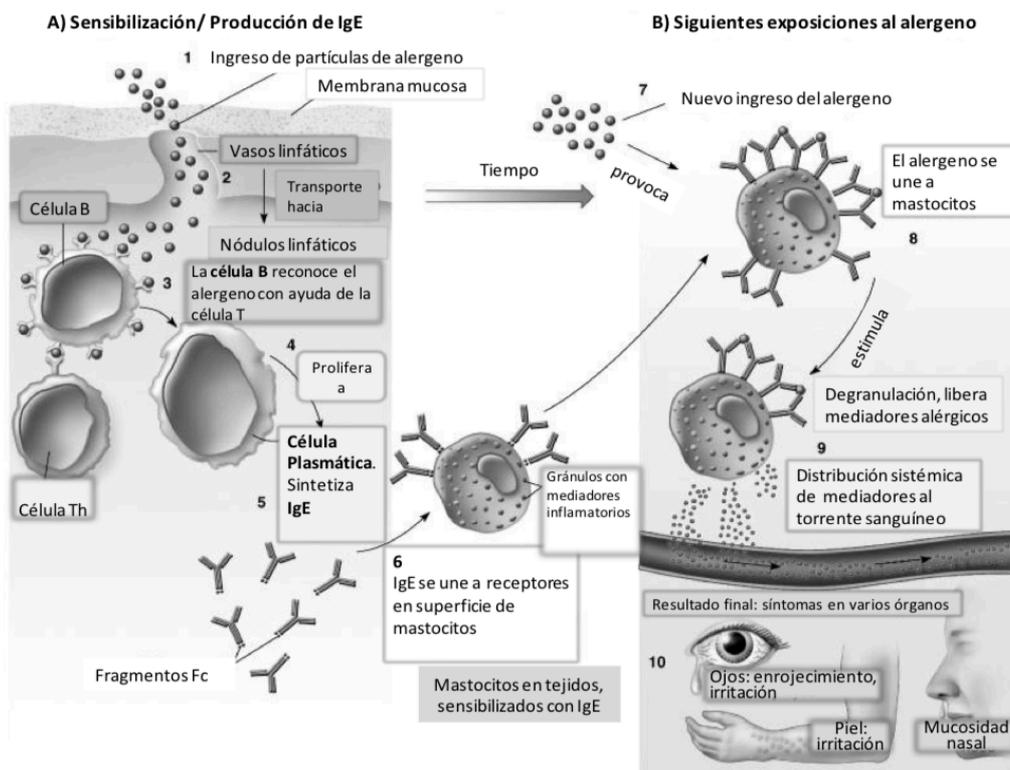


Figura 1. Mecanismo de la alergia alimentaria mediada por IgE (Curciarello, 2010).

La etapa de sensibilización tiene lugar tras el primer contacto con el alérgeno y es asintomática. El alérgeno es captado por unas células denominadas “presentadoras de antígeno” y tras ser procesado, lo presentan para que sea reconocido por los linfocitos T.

Estos liberan factores solubles, como las interleucinas que inducen la proliferación y diferenciación de las células B especializadas en la producción de IgE específicas frente al alérgeno. Esas IgE se unen a la superficie de los mastocitos de los tejidos y de los basófilos de la sangre, que contienen receptores para las IgE en su superficie. La segunda fase, denominada reacción alérgica, se produce cuando el alérgeno vuelve a entrar en contacto con el sistema inmune, y se une a las IgE fijadas en los mastocitos lo que induce su degranulación, con la consiguiente liberación de histamina, leucotrienos, prostaglandinas y otras sustancias con potente actividad inflamatoria causantes de la sintomatología alérgica (Garrote y Bonet, 2004).

Las reacciones alérgicas debidas a alimentos deben distinguirse de otros tipos de reacciones adversas como son las intolerancias alimentarias y las reacciones tóxicas por alimentos. La intolerancia alimentaria es una reacción adversa a un alimento en cuya patogenia no existe un mecanismo de base inmunológica, y suele estar causada por un déficit de algún enzima que metaboliza algún componente de los alimentos (p.e. intolerancia a la lactosa por déficit de lactasa). La intoxicación alimentaria es una reacción adversa producida por agentes químicos o biológicos contenidos en los alimentos, pudiendo ser susceptible cualquier persona (p.e. salmonelosis). Las reacciones de intolerancia y las reacciones tóxicas son dependientes de la dosis, a diferencia de las reacciones alérgicas, en las que dosis muy pequeñas pueden desencadenar una respuesta clínica grave según la sensibilidad del individuo (AESAN, 2007).

La clínica de la alergia alimentaria en ocasiones puede limitarse al lugar de contacto con el alimento, sin embargo, es más frecuente la aparición de reacciones generales. En las alergias alimentarias mediadas por IgE, los órganos principalmente involucrados son: la piel (urticaria, angioedema, dermatitis atópica, etc.), el tracto gastrointestinal (vómitos, diarrea, etc.) y el tracto respiratorio (asma bronquial, rinitis, etc.). Se considera, que en el 1-2% de los casos de hipersensibilidad inmediata se puede producir una anafilaxia generalizada que afecta a varios órganos y que puede conducir a la muerte si no se administra el tratamiento adecuado de forma urgente. En el caso de las reacciones alérgicas no mediadas por IgE suelen generar enterocolitis y enteropatías.

El diagnóstico de la alergia alimentaria se debe plantear a dos niveles: un diagnóstico clínico y un diagnóstico patogénico. El diagnóstico clínico se basa en demostrar la existencia de una reacción adversa a un alimento, comprobando la relación ingestión-síntomas y mediante la historia clínica. Una vez realizado el diagnóstico clínico, se

efectúa el diagnóstico patogénico, que implica demostrar la presencia de IgE frente al alimento sospechoso mediante pruebas cutáneas (prick test) o serológicas.

En cuanto al tratamiento de las alergias alimentarias, la forma más eficaz de prevenirla es evitar la ingestión del alimento, mediante una dieta de eliminación estricta. Se ha comprobado que, para ciertos alimentos alergénicos como la leche o el huevo, las dietas de eliminación conducen con el paso del tiempo al desarrollo de una tolerancia clínica (García, 1999). En la actualidad, se están llevando a cabo algunas terapias de desensibilización oral controlada frente a leche y huevo que están teniendo éxito y consisten en suministrar dosis progresivamente crecientes del alérgeno alimentario, pudiendo alcanzar la tolerancia debido a una disminución de las IgE específicas frente a dicho alérgeno (Meglio et al., 2004).

Resulta difícil calcular su prevalencia debido a la falta de datos concretos, a la disparidad conceptual y a los diferentes criterios de diagnóstico empleados. Pese a ello, se estima que entre un 1 y un 3% de los adultos y entre un 4 y un 6% de los niños presentan una alergia alimentaria y las incidencias se han duplicado en los últimos 30 años. (CODEX, 2006). Por todo ello, las alergias alimentarias son consideradas en la actualidad un grave problema de salud pública en los países desarrollados.

1.2 Alérgenos alimentarios

Los alérgenos alimentarios son proteínas o glicoproteínas hidrosolubles con un tamaño comprendido entre 10 y 70 kDa, y la mayoría se caracterizan por ser estables al calor, a los tratamientos ácidos y a la acción de las proteasas digestivas.

Un alimento suele contener varias proteínas alergénicas. De ellas, unas se consideran alérgenos mayores cuando más del 50% de los alérgicos presentan IgE específicas frente a ellos y otros se consideran alérgenos menores cuando ese porcentaje es menor al 50%.

Se han identificado más de 160 alimentos capaces de producir una alergia alimentaria, sin embargo, 8 de ellos son los causantes de más del 95% de las reacciones alérgicas. Estos alimentos son: huevo, cacahuete, leche, frutos secos, soja, pescados, mariscos y trigo (FAO, 2001). Algunas proteínas alergénicas se encuentran solo en un alimento (p.e. ovomucoide del huevo), mientras que otras están presentes en varios alimentos. Estas últimas pueden encontrarse en especies filogenéticamente próximas (p.e. la β -lactoglobulina de la leche de los rumiantes) o lejanas como es el caso de las proteínas de la familia de las tropomiosinas de los crustáceos y moluscos o de las proteínas de transferencia de lípidos de las frutas rosáceas. Estas proteínas alergénicas que se

encuentran en alimentos de especies sin relación taxonómica cercana se denominan panalérgenos.

Los alérgenos de origen vegetal se caracterizan por ser, en muchos casos, proteínas producidas por el sistema de defensa de la planta, como las proteínas de la familia de transferencia de lípidos de las frutas rosáceas. En las legumbres, frutos secos y cereales las proteínas alergénicas son, en su mayoría, proteínas de almacenamiento (vicilinas, leguminas, prolaminas, etc.) que participan en la maduración, germinación y desarrollo de las semillas.

Las proteínas alergénicas de origen animal pertenecen a familias más concretas. Las principales proteínas alergénicas de pescados, crustáceos y moluscos pertenecen a la familia de las parvalbúminas y de las tropomiosinas. En el caso del huevo se han identificado varias proteínas alergénicas entre las que destacan el ovomucoide, la ovoalbúmina y la ovotransferrina y en la leche, la α -lactalbúmina, la β -lactoglobulina y las α y β - caseínas.

1.3 La soja

La soja (*Glycine max*) es una leguminosa perteneciente a la familia *Fabaceae*. La producción y comercialización de soja tiene tradición en los países asiáticos, y no fue hasta el siglo XX cuando se extendió su producción a nivel mundial. En la actualidad, la mayor producción de soja se da en los Estados Unidos, seguido de Brasil y Argentina. El departamento de Agricultura de los Estados Unidos publicó en su último informe que la producción mundial de soja en 2017 fue de 348 millones de toneladas, lo que supone un record histórico a nivel mundial. Este hecho podría deberse a que en los últimos años el consumo de soja como tal y de sus productos derivados se ha incrementado en numerosos países debido, a su precio competitivo, así como a sus propiedades funcionales.

Las semillas de soja son una fuente excelente de nutrientes como se muestra en la Figura 2, ya que su composición nutricional incluye un 35% de proteínas, 31% de glúcidos, 17% de lípidos, 12% de agua y 5% de minerales (L'Hocine y Boye, 2007).

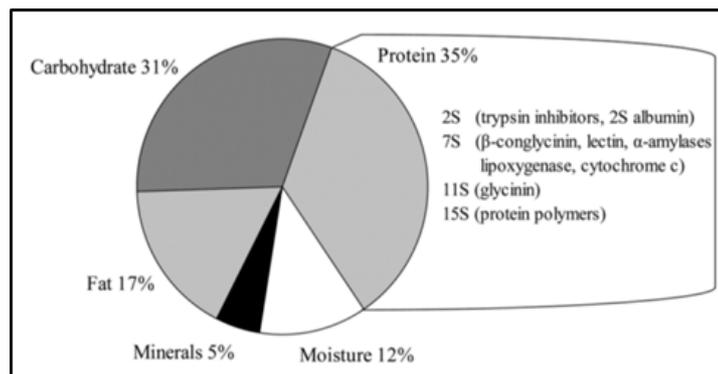


Figura 2. Composición de la soja (L'Hocine y Boye, 2007).

Las proteínas de la soja, han sido consideradas por la FDA como de alto valor nutricional debido a su composición equilibrada en aminoácidos, siendo capaces de sustituir a las proteínas de origen animal.

En cuanto a su composición glucídica, se encuentran componentes solubles e insolubles. Los principales carbohidratos solubles son: sacarosa (2,5-8,2%), rafinosa y estaquirosa (0,1-1%). Los carbohidratos insolubles son la celulosa, hemicelulosa y pectinas. Tanto los oligosacáridos rafinosa y estaquirosa como los carbohidratos insolubles se consideran fibra y proporcionan un efecto prebiótico al organismo. La fracción lipídica contiene grasas saturadas (3%), monoinsaturadas (4%) y poliinsaturadas (93%), siendo el principal ácido graso el ácido linoleico. La soja también contiene fitosteroles y otros antioxidantes naturales a los cuales se les atribuyen propiedades beneficiosas para el organismo. Recientemente se le han atribuido también a la soja propiedades saludables relacionadas con la disminución del nivel de colesterol en sangre, con la prevención de ciertos tipos de cáncer, de la diabetes mellitus y de la obesidad (Carroll y Kurowska, 1995; Friedman y Brandon, 2001; Duranti et al., 2004).

Con respecto a las propiedades tecnológicas de las proteínas de la soja cabe destacar su capacidad para absorber agua, sus propiedades emulsionantes, espumantes y gelificantes. Debido a estas propiedades beneficiosas, se comercializan numerosos productos proteicos derivados de la soja, como harinas, concentrados y aislados de proteína. Estos productos se utilizan como ingredientes en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Centrándose principalmente en su uso alimentario, la soja puede consumirse directamente hervida, en brotes o tras ser sometida a procesos de fermentación y/o texturización. Además, se pueden emplear sus fracciones lipídica y proteica para elaborar diferentes productos. De la fracción grasa se obtiene el aceite, y una parte de este se

emplea también para fabricar sustitutos de mantequilla y mahonesa. De la fracción proteica se obtienen harinas, concentrados y aislados de proteína, los cuales se emplean para la elaboración de leches infantiles, pan, galletas, pastas, cereales para el desayuno, yogures, quesos, salchichas y productos cárnicos, entre otros (L'Hocine y boye, 2007). A continuación se muestra una gráfica de los productos de soja o derivados que se usan en la industria alimentaria (Figura 3).

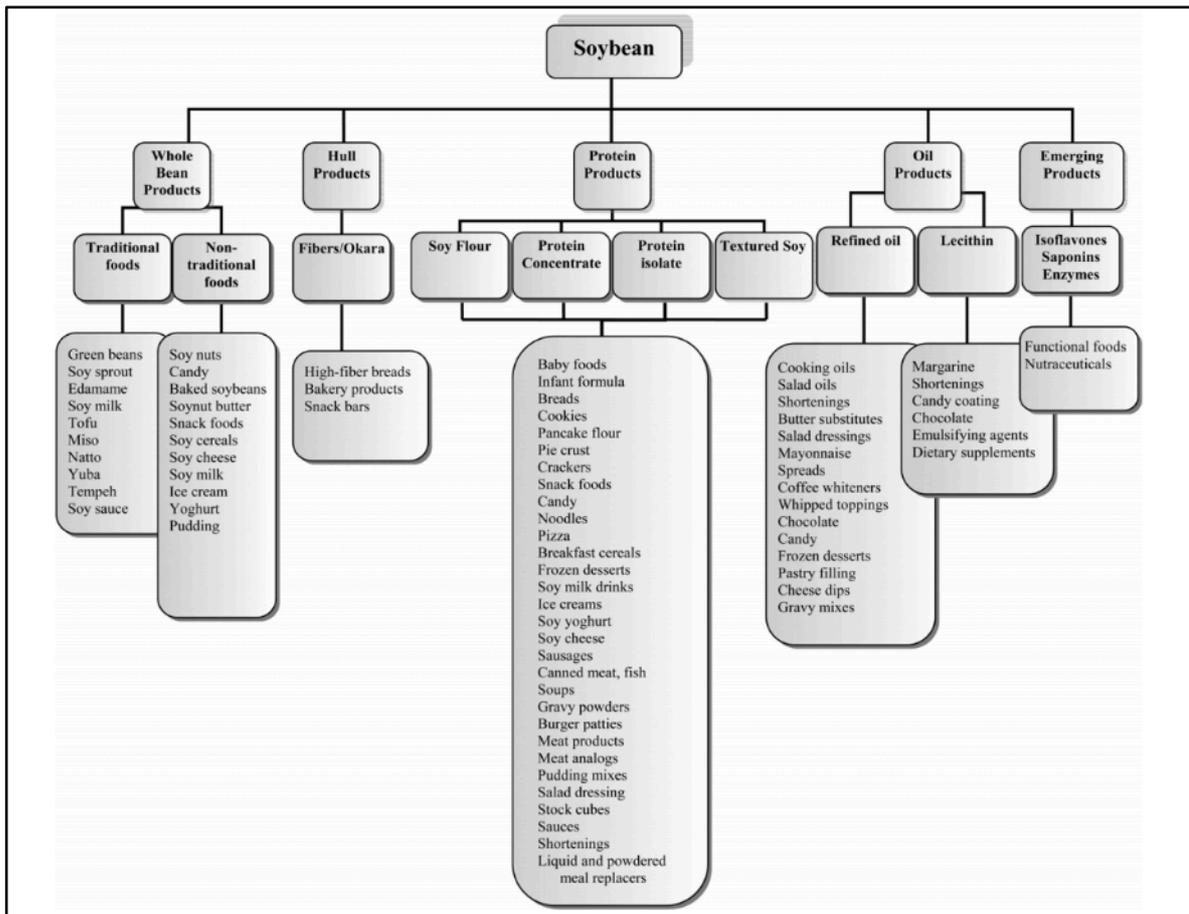


Figura 3. Productos derivados de la soja (L'Hocine y Boye, 2007)

1.3.1 Proteínas de la soja

Aproximadamente el 90% de las proteínas de la soja son globulinas solubles en medios salinos y tienen una función de almacenamiento, mientras que el resto son albúminas solubles en agua. La clasificación más aceptada de las proteínas de la soja se establece en base a su coeficiente de sedimentación determinado mediante ultracentrifugación, habiéndose establecido 4 fracciones que tienen unos coeficientes de sedimentación (Svedberg) de 2S (8-22%), 7S (35%), 11S (31-52%) y 15S (5%) (Thanh y Shibasaki, 1976).

La fracción 2S está formada por numerosas enzimas, y las proteínas más estudiadas de esta fracción son los inhibidores de la tripsina: el inhibidor Bowman-Birk (7,8 kDa) y el inhibidor de Kunitz (21,5 kDa),

La fracción 7S está compuesta fundamentalmente por β -conglucina, la cual representa el 85% de la proteína de esta fracción. También se encuentra en esta fracción el citocromo c (12 kDa), la β -amilasa (62 kDa), las lipooxigenasas (102 kDa) y las lecitinas (120 kDa). La β -conglucina es una glicoproteína (4-5% de carbohidratos) trimérica, con un peso molecular de 140-180 kDa, compuesta por tres subunidades: α (76 kDa), α' (72 kDa) y β (53 kDa) (Figura 4a). En algunas variedades de soja existe también otra subunidad minoritaria denominada β' . Cuando es sometida a cambios en la fuerza iónica y en el pH, la β -conglucina experimenta fenómenos de asociación-disociación. Según indica Thanh y Shibasaki (1976), a baja fuerza iónica, la β -conglucina se dimeriza de manera reversible, generando un superdímero de trímeros que se convierte en un hexámero de peso molecular comprendido entre 280-350 kDa. La β -conglucina nativa es heterogénea y se han demostrado las siguientes combinaciones de subunidades: $\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha'$, $\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha'\beta$, $\alpha\beta\beta$ y $\alpha'\beta\beta$.

La fracción 11S está compuesta en su mayor parte por glicina, aproximadamente un 85%. El modelo aceptado actualmente para la estructura de la glicina nativa es un hexámero con un peso molecular comprendido entre 320-360 kDa. Cada una de sus subunidades puede disociarse en condiciones reductoras en las cadenas polipeptídicas ácidas (A, 31-45 kDa) y básicas (B, 18-20 kDa), que en su forma nativa se encuentran unidas mediante puentes disulfuro intercatenarios. La estructura cuaternaria de la glicina es compleja, constituida por dos capas de trímeros en las que cada trímero tiene las tres cadenas polipeptídicas ácidas y las tres básicas emparejadas, alternadas y unidas mediante puentes disulfuro y puentes de hidrógeno (Figura 4 b). Las 5 subunidades de glicina caracterizadas son: A1aB2 (G1), A1bB1b (G2), A2B1a (G3), A3B4 (G4) y A5A4B3 (G5).

La fracción 15S está poco caracterizada y se cree que son polímeros de otras proteínas de la soja.

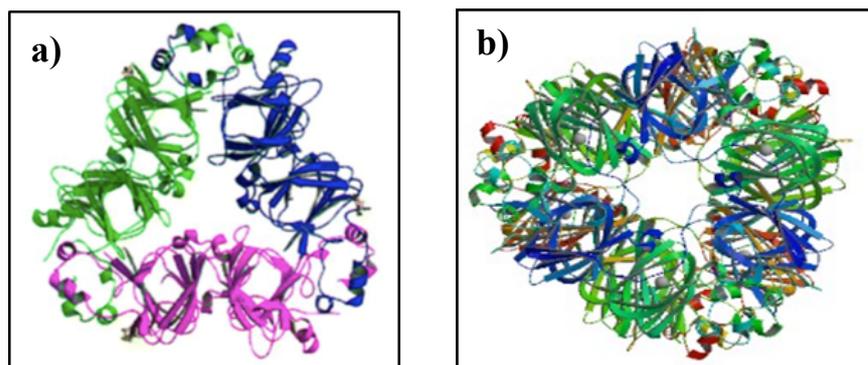


Figura 4. Estructura tridimensional de la β -conglucina (a) y la glicina (b) de soja. (Maruyama et al., 2001; Adachi et al., 2002).

1.3.2 Alérgenos de la soja

La soja está incluida en el grupo de los 8 alimentos más alergénicos reconocido por los organismos internacionales. La alergia a la soja presenta una prevalencia de entre un 0,3-0,4% en la población general, afectando a un 8% de los niños con dermatitis atópica y a un 14% de los niños con alergia a las proteínas leche de vaca (Errahali et al, 2002). Esta alta prevalencia se debe probablemente a que la soja es ampliamente empleada como ingrediente en la elaboración de numerosos alimentos, por lo que es muy frecuente que se encuentre como un alérgeno oculto debido a problemas de contaminación cruzada o a una deficiente limpieza de los equipos de procesado. La legislación sobre el etiquetado de los alérgenos incluye la soja como uno de los principales alérgenos de etiquetado obligatorio. Sin embargo, todavía son numerosas las alertas alimentarias debidas a reacciones alérgicas debidas a contaminaciones cruzadas de soja.

Las manifestaciones clínicas de los pacientes alérgicos a la soja son similares a otras alergias alimentarias: enterocolitis severa, eczema atópico, así como en ocasiones reacciones multisistémicas que cursan con un shock anafiláctico.

La base de datos de la *World Health Organization* (WHO) y de las *International Union of Immunological Societies* (IUIS) incluye actualmente 8 proteínas de la soja que tienen potencial alergénico (Tabla 1). Las proteínas frente a las que reaccionan las IgE del suero de la mayoría de los individuos alérgicos a la soja son la glicina y la β -conglucina. En todas las subunidades de estas proteínas se ha identificado la presencia de varios epítomos, tanto lineales como conformacionales, que están implicados en la interacción con las IgE, aunque los predominantes parecen estar localizados fundamentalmente en las subunidades ácidas de la glicina y en la subunidad α de la β -conglucina.

Tabla 1. Proteínas alergénicas de la soja (EFSA, 2014).

Alérgeno	Proteína	Peso molecular (kDa)
Gly m 1	Proteína hidrofóbica	7
Gly m 2	Defensina	8
Gly m 3	Profilina	14
Gly m 4	Proteína PR-10	17
Gly m 5	β -conglucina (globulina 7S, vicilina, familia de las cupinas)	
	Subunidad α	67
	Subunidad α'	71
	Subunidad β	50
Gly m 6	Glicinina (globulina 11S, legumina, familia de las cupinas)	
	Subunidad Gy1	53,6
	Subunidad Gy2	52,4
	Subunidad Gy3	52,2
	Subunidad Gy4	61,2
	Subunidad Gy5	55,4
Gly m 7	Proteína biotilada de la semilla	76,2
Gly m 8	2S albúmina (familia de las prolaminas)	28

Los epítomos de la glicinina desencadenantes de la respuesta alérgica se encuentran principalmente en las subunidades ácidas (Pedersen y Djurtof, 1989). Tanto la subunidad ácida G1 como la G2 se unen a las IgE, aunque la G1 lo hace con mucha mayor afinidad. Mediante estudios de digestión enzimática y espectrometría de masas se ha identificado el péptido que más comúnmente interacciona con las IgE. Este péptido tiene un peso molecular de 15 kDa, corresponde a los residuos de aminoácidos 192-306 y está localizado en el extremo C-terminal de la subunidad (Helm et al, 2000; Xiang et al, 2002).

Por otra parte, en la β -conglucina hay varios estudios que confirman la capacidad de sus tres subunidades α , α' y β para desencadenar una respuesta alérgica, ya que las tres son capaces de unirse a las IgE de personas alérgicas a la soja (Burks et al., 1988). Otros estudios se han centrado en estudiar los epítomos lineales de la subunidad α , que se encuentran localizados principalmente en la región N-terminal y sugieren que la fracción glucídica de la glicoproteína no es esencial para la unión a las IgE (Ogawa et al., 1991).

1.4 Tratamientos tecnológicos

Los alimentos son sometidos a tratamientos tecnológicos de higienización, con el objetivo de inactivar los microorganismos patógenos y alterantes y alargar su vida útil. De todos ellos, los tratamientos térmicos han sido tradicionalmente los más empleados en la industria alimentaria, sin embargo, la tendencia actual se centra en la búsqueda de nuevas alternativas al calor, que eviten modificaciones en el aroma, sabor y valor nutricional de

los alimentos. Entre estas alternativas, son prometedoras las altas presiones hidrostáticas o los ultrasonidos, entre otras.

Los tratamientos tecnológicos aplicados a los alimentos pueden también afectar a las proteínas induciendo su desnaturalización, hidrólisis, agregación mediante interacciones covalentes o no covalentes, interacción con otros componentes del alimento, etc. Cuando estas modificaciones afectan a las proteínas alergénicas se pueden dar cambios en su alergenicidad, bien aumentándola o bien disminuyéndola. Además, cuando las modificaciones afectan a las proteínas alergénicas utilizadas como diana en las técnicas inmunoquímicas para la detección de alérgenos alimentarios, la inmunodetección se puede ver dificultada al quedar enmascarados los epítomos que son reconocidos por los anticuerpos utilizados en los ensayos.

En los últimos años, se han llevado a cabo varios estudios para determinar el efecto que tienen algunos tratamientos tecnológicos en las proteínas alergénicas de la soja. Estos trabajos han estado dirigidos a estudiar el efecto que tienen en su estructura o en su capacidad alergénica y se han realizado tanto en extractos concentrados de proteínas de soja como en las fracciones proteicas purificadas. En estos trabajos, los cambios estructurales se han determinado por técnicas espectrofotométricas, dicroísmo circular o de calorimetría diferencial, entre otros, y los cambios en la alergenicidad midiendo la inmunorreactividad con las IgE del suero de pacientes alérgicos a la soja mediante inmunoensayos.

1.4.1 Tratamientos térmicos

Tradicionalmente los tratamientos térmicos (pasteurización y esterilización) tienen como objetivo asegurar la calidad higiénica de los alimentos, pero también en ocasiones pueden modificar las propiedades nutritivas y de la textura de los alimentos o modificar sus sabores. Además, se ha observado que el calor, al afectar a la estructura tridimensional de las proteínas, podría disminuir su potencial alergénico.

El efecto del calor depende de las condiciones del tratamiento, tanto de la temperatura y el tiempo de tratamiento como de la composición de la muestra y de la concentración de proteína o tipo de proteínas presentes en la misma.

Se ha indicado que el calor induce la desnaturalización de las proteínas, puesto que es capaz de provocar cambios estructurales, tanto en la estructura terciaria como en la secundaria, afectando a los epítomos, siendo, por lo general, los epítomos lineales más difíciles de alterar que los conformacionales. Otros efectos provocados por el calor como

la agregación por interacciones no covalentes o por generación de nuevos puentes disulfuro, podrían también ocasionar cambios en su alergenicidad. Así, se han indicado tanto casos en los que la alergenicidad de las proteínas de la soja ha disminuido por efecto del calor (Mondoulet et al., 2005), como otros en los que el tratamiento térmico ha generado nuevos epítomos, aumentando su alergenicidad (Pasini et al., 2001).

Burks et al., (1988) utilizando una técnica de inmunoensayo, mostraron que el calentamiento de un extracto de soja cruda, a 80, 100 y 120 °C durante 60 min, disminuía significativamente la unión de las IgE a las fracciones 7S y 11S.

Por el contrario, se ha observado que la proteína alergénica Gly mBd 30K (P34) incrementa significativamente su capacidad de unión a IgE tras ser sometida a una temperatura de 121 °C, debido a una reestructuración de nuevos epítomos (Sampson, 1999)

En un estudio reciente realizado por Cabanillas et al. (2017), se estudió el efecto de tratamientos térmicos a temperaturas de ebullición, a presión atmosférica y en un autoclave, en extractos de proteínas de soja, en los que determinaron tanto la capacidad de las muestras para unirse a IgE de pacientes alérgicos a la soja, como la capacidad para interaccionar con anticuerpos monoclonales en un sistema de western-blotting. Sus resultados mostraron, que los tratamientos de ebullición durante 60 min producen una marcada disminución de la inmunorreactividad de las proteínas de la soja frente a IgE, que fue mayor en las muestras tratadas a presión en autoclave. Además, observaron que la β -conglucina es más resistente al calor que la glicina, puesto que mantenía una buena parte de su reactividad con las IgE tras todos los tratamientos aplicados.

Estos resultados, a veces contradictorios, demuestran que, aunque el tratamiento térmico puede alterar significativamente la estructura de las proteínas, el alcance de dichos cambios en el potencial alergénico depende de la temperatura y la duración del tratamiento térmico, así como de las características propias de cada proteína alergénica (Davis y Williams, 1998).

1.4.2 Altas presiones hidrostáticas

Las altas presiones hidrostáticas son una tecnología no térmica de conservación de los alimentos basada en someter estos a presiones comprendidas entre 100-900 MPa, durante un tiempo que puede variar entre 1 y 30 min. Para transmitir la presión, se utiliza un medio líquido, normalmente agua. Esta tecnología se basa en los principios de Le Chatelier y el principio isostático. El principio de Le Chatelier establece que las

reacciones que resultan en un cambio de volumen son afectadas por la aplicación de altas presiones hidrostática. El principio isostático significa que la transmisión de la presión aplicada es instantánea y uniforme a través de la muestra (Ramaswamy et al., 2005).

Las altas presiones se han empleado como tratamiento de conservación no térmico, alternativo al calor, para la higienización de alimentos. Las altas presiones son capaces de inactivar las formas vegetativas de las bacterias, mohos y levaduras, sin embargo, los esporos bacterianos son muy resistentes a la presión. Los mecanismos de inactivación de los microorganismos por las altas presiones son variados y pueden actuar de forma simultánea en el DNA, ribosomas, RNA, proteínas y enzimas. Se han establecido hipótesis sobre el mecanismo implicado en la muerte celular, pero ninguno es válido de forma generalizada para todas las especies microbianas estudiadas (Mañas y Pagán, 2005).

Las altas presiones son capaces de modificar la estructura de las proteínas, al inducir cambios en las interacciones intra e intermoleculares de los grupos funcionales de los aminoácidos. En general, la aplicación de presiones superiores a 200-300 MPa a temperatura ambiente provoca la disociación de las macroestructuras en subunidades, así como la desnaturalización de las estructuras monoméricas, probablemente debido al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas y a la separación de los puentes salinos inter o intramoleculares. Sin embargo, salvo que las presiones sean muy elevadas, los enlaces por puentes de hidrógeno y los enlaces covalentes no parecen verse afectados por estos tratamientos (Mozhaev et al., 1996).

Los cambios conformacionales producidos en las proteínas por efecto de la presión, podrían alterar los epítopos, disminuyendo la capacidad de unión a IgE específicas, o por el contrario, podrían generar la aparición de nuevos epítopos aumentando la alergenicidad. El hecho de que tenga lugar un efecto u otro depende de muchos factores como son la magnitud de la presión, el pH, la temperatura y la propia estructura de la proteína alergénica (Kajiyama et al., 1995).

Algunos estudios focalizados en determinadas proteínas alergénicas han indicado que las altas presiones disminuyen la alergenicidad de la α -caseína y la β -lactoglobulina, entre otras (Meng et al. 2017). Sin embargo, los tratamientos de altas presiones no son eficaces para disminuir la inmunorreactividad con las IgE de los alérgenos de las nueces o las avellanas (Prieto et al., 2014).

Estudios recientes realizados con proteínas alergénicas de la soja han mostrado que la estructura tanto de la glicinina, como de la β -conglucina se ve afectada por los

tratamientos de altas presiones. Así, se ha indicado mediante estudios de espectrometría de fluorescencia, dicroísmo circular y calorimetría diferencial que presiones entre 200 y 400 MPa modifican la estructura de ambas proteínas. Sin embargo, queda por determinar si estos cambios pueden afectar a la reactividad de estas proteínas con las IgE de los pacientes alérgicos a la soja. No obstante, en base a estos resultados prometedores, se ha propuesto que los tratamientos de altas presiones podrían constituir un método para reducir de la alergenicidad de las proteínas de la soja (Zhang et al., 2003; Xi y He, 2017).

1.4.3 Ultrasonidos

Los ultrasonidos constituyen una nueva tecnología para la higienización de los alimentos. Son ondas mecánicas con frecuencias del orden de 20 a 100 kHz e intensidad entre 10 y 1000 W/cm². Su fundamento se basa en la generación de ciclos alternativos de expansión y compresión al atravesar un fluido y, como consecuencia, aparecen burbujas de gas en la masa del líquido que colapsan violentamente produciendo un fenómeno denominado cavitación. (Mason, 1998).

Los ultrasonidos son capaces de inactivar las formas vegetativas de las bacterias, pero tienen poco efecto sobre las formas esporuladas. Los tratamientos de ultrasonidos presentan una mayor actividad antimicrobiana si se combinan con presión y temperatura, denominándose entonces manotermosonicación. Los ultrasonidos son capaces además de provocar cambios estructurales y funcionales en las proteínas. Estos cambios producidos en las proteínas por efecto de los ultrasonidos pueden modificar sus propiedades gelificantes, emulsionantes y espumantes, entre otras. (Leadley y Williams, 2002).

Recientemente, se han llevado a cabo algunos estudios para determinar el efecto de los ultrasonidos en las proteínas de la soja. Se ha observado que los ultrasonidos son capaces de modificar el espectro de fluorescencia de la glicinina y la β -conglucina aumentando su hidrofobicidad. Además, su estructura determinada por dicroísmo circular aumenta el porcentaje de estructura en hélice α y reduce el de lámina β (Wang et al., 2017). Por otra parte, se ha indicado que el tratamiento con ultrasonidos de la β -conglucina y de aislados de proteínas de soja mejora sus propiedades emulsionantes, obteniéndose gotas de menor tamaño y que presentan una mayor estabilidad (Hu et al., 2015). Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios donde se haya determinado el efecto del tratamiento con ultrasonidos en las propiedades alergénicas de las proteínas de la soja.

2 OBJETIVOS

La alergia a los alimentos constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial dada su prevalencia y al incremento notable experimentado en los últimos años (Sicherer et al., 2010).

Las proteínas de la soja son muy utilizadas en la industria alimentaria debido a sus propiedades nutritivas, funcionales y a su precio competitivo. Sin embargo, constituyen una de las principales causas de alergia alimentaria.

El procesado de los alimentos incluye la aplicación de tratamientos tecnológicos que pueden desnaturalizar las proteínas y así, modificar sus propiedades físico-químicas, su alergenicidad y/o su detección.

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar el efecto de los tratamientos tecnológicos (calor, altas presiones y ultrasonidos) en la desnaturalización de las proteínas más abundantes y alergénicas de la soja, la glicinina y la β -conglucina. Para poder desarrollar dicho objetivo se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Purificación de la glicinina y β -conglucina a partir de semillas de soja cruda mediante técnicas de precipitación isoelectrica y salina, y cromatografía de exclusión molecular.
- Aplicación de tratamientos térmicos, de altas presiones y de ultrasonidos de diferente intensidad tanto en las proteínas purificadas como en un extracto de proteínas de soja.
- Determinación del efecto de los tratamientos tecnológicos aplicados en la estructura de la glicinina y la β -conglucina mediante técnicas inmunoquímicas, de espectroscopía de fluorescencia y electroforéticas.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Las semillas de soja se adquirieron en supermercados locales. Las membranas de diálisis fueron suministradas por Medicell (Londres, Reino Unido) y los discos de ultrafiltración por Amicon (Beverly, Manchester, EEUU). El gel Sepharose CL- 6B fue adquirido de Amersham Biosciences (Piscataway, New Jersey, EEUU). La acrilamida y el 5,5-Dithiobis (Ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) fueron suministrados por Sigma (Poole, Reino Unido) y el marcador de pesos moleculares por Pharmacia Biotech (Upsala, Suecia). El test del ácido bicinonínico procede de Pierce (Rockford, Illinois, EEUU). El sustrato de la peroxidasa con tetrametilbencidina (TMB) se obtuvo de ZEULAB (Zaragoza, España). El resto de reactivos y productos usados no señalados específicamente fueron reactivos de tipo analítico obtenidos de varias fuentes.

3.2 Métodos

3.2.1 Aislamiento de glicinina y β -conglucina

Las proteínas glicinina y β -conglucina se aislaron a partir de semillas crudas de soja blanca ecológica, mediante técnicas de precipitación isoelectrónica, de precipitación salina con sulfato amónico y cromatografía de filtración en gel siguiendo el método de Liu et al.(2007) y de Mo et al.(2011). La caracterización de las proteínas purificadas se llevó a cabo mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes.

3.2.1.1 Extracción de proteínas de la soja

Las semillas de soja se humedecieron en agua destilada para favorecer el descascarillado. Tras eliminar la cáscara manualmente, el agua captada por las semillas se eliminó mediante liofilización. Las semillas secas se trituraron en un molinillo, recogiendo la fracción menor de 400 μ m utilizando un tamiz. La harina obtenida se delipidó con hexano en una proporción 1/4 (p/v) durante 1 h en agitación y el hexano se separó mediante centrifugación a 800 g durante 15 min a 4 °C. El precipitado se trató dos veces más con hexano en las mismas condiciones y finalmente el hexano residual presente en la harina se eliminó mediante evaporación en un rotavapor.

A continuación, las proteínas de la harina delipidada se extrajeron con tampón 0,03 M Tris-HCl pH 8,5 en una proporción 1/15 (p/v), manteniéndose la mezcla en agitación durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 9000 g a 4 °C durante 30 min y con el pellet obtenido se repitió el proceso de extracción en las mismas condiciones.

3.2.1.2 Precipitación isoeléctrica

Los sobrenadantes obtenidos en la etapa anterior se mezclaron, se adicionaron con bisulfito sódico a una concentración final de 0,01 M y el pH se ajustó a 6,4. Tras mantener la mezcla en agitación durante una noche a 4 °C, se centrifugó a 6500 g a 4 °C durante 20 min. El pellet obtenido que contenía la fracción 11S, se resuspendió en tampón 2,6 mM fosfato monopotásico, 32,5 mM fosfato dipotásico, 0,5 M NaCl, 0,01 M bisulfito sódico, pH 7,6.

Al sobrenadante se le adicionó NaCl hasta alcanzar una concentración de 0,25 M y se ajustó el pH a 5,5, manteniéndose 30 min a temperatura ambiente en agitación. Después, se centrifugó a 9000 g y 4 °C durante 30 min y el sobrenadante obtenido se diluyó con agua destilada en una proporción ½ (v/v) y se añadió bisulfito hasta 0,01M. A continuación, el pH se ajustó a 4,8 y, tras permanecer 30 min a temperatura ambiente en agitación, se centrifugó a 6500g a 4 °C durante 20 min. El pellet obtenido en estas condiciones, que contiene la fracción 7S, se resuspendió en el mismo tampón fosfato, pH 7,6.

3.2.1.3 Precipitación salina

La precipitación salina se llevó a cabo en las fracciones 7S y 11S obtenidas en la etapa anterior. A las fracciones 11S y 7S se les añadió sulfato amónico hasta alcanzar una saturación del 51% y del 75%, respectivamente, y las mezclas se mantuvieron en agitación en un baño con hielo durante 1 h. Tras centrifugar a 9000 g a 4 °C durante 15 min, a los sobrenadantes obtenidos, se le adicionó sulfato amónico hasta alcanzar una saturación del 66% y del 100% respectivamente. La mezcla se mantuvo en agitación a 4 °C durante 1 h y se centrifugó a 9000 g y 4 °C durante 15 min, los pellets obtenidos, que contenían mayoritariamente la glicinina y la β-conglicinina, respectivamente, se disolvieron en 5 mL del tampón fosfato pH 7,6 y se determinó la concentración de proteína en cada uno mediante el método del ácido bicinónico (BCA).

3.2.1.4 Cromatografía de exclusión molecular

Un volumen de 1 mL de cada una de las fracciones proteicas (11S y 7S) se sometió a una filtración en gel, empleando una columna de Sepharose CL-6B (85 x 1 cm), previamente equilibrada con el tampón fosfato pH 7,6, recogiendo fracciones de 2 mL. La absorbancia de las fracciones eluidas se midió en un espectrofotómetro Jenway, Barloword Scientific Ltd. (Inglaterra) a una longitud de onda de 280 nm.

La pureza de las fracciones obtenidas se determinó mediante electroforesis. Los tubos que contenían glicinina o β -conglucina purificada se recogieron conjuntamente y se dializaron frente a tampón en tampón fosfato potásico 1,5 mM, fosfato sódico 8 mM, KCl 3 mM, NaCl 0,14 M, pH 7,4 (PBS) y se concentraron mediante ultrafiltración empleando membranas con un punto de corte de 3 kDa.

3.2.2 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteína de los extractos de soja se ha determinado utilizando el método del BCA, empleando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón. Para elaborar la recta patrón se prepararon soluciones de BSA con concentraciones entre 125 y 2000 $\mu\text{g/mL}$ en tampón fosfato sódico pH 7,6. Se añadieron 25 μL de los estándares o diferentes diluciones de las muestras a cuantificar en pocillos de una microplaca y 200 μL de los reactivos A y B en la proporción 50:1 (v/v), como indica el fabricante. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min y se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia). Se preparó una recta patrón con los estándares de BSA representando los valores de la absorbancia frente a su concentración. La concentración de proteína de las muestras se calculó interpolando la absorbancia obtenida en dicha recta patrón.

La concentración de proteína de las muestras de proteína purificadas se ha determinado mediante espectrofotometría a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción de 0,80 y 0,44 para la glicinina y la β -conglucina, respectivamente.

3.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

3.2.3.1 Preparación del gel

Los geles de electroforesis SDS-PAGE están formados por un gel separador (running gel) y un gel concentrador (stacking gel). Primero se preparó el gel separador vertiendo una solución de acrilamida sobre dos vidrios. La solución de acrilamida se preparó al 10% en tampón 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 conteniendo un 10% de SDS (p/v), 5 μL de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) y 50 μL de persulfato amónico (PSA). Después la superficie del gel se cubrió con 300 μL de 2 metil-2 butanol para evitar la deshidratación del gel, y se dejó en reposo durante 1 h para la polimerización de la acrilamida. Después, se eliminó el 2 metil-2 butanol y se vertió el gel concentrador compuesto por una solución de acrilamida al 7% en tampón 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 conteniendo 5 μL de TEMED y

25 μ L de PSA. Seguidamente, se colocó el peine de electroforesis y se dejó polimerizar durante 1 h.

3.2.3.2 Electroforesis SDS-PAGE

Las muestras se diluyeron (1/1, v/v) en tampón Laemmli compuesto de 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 que contenía 2% de SDS, 25% glicerol, y 0,01% azul de bromofenol. Para la electroforesis en condiciones reductoras, a esta mezcla se le añadió β -mercaptoetanol para obtener una concentración final del 5%, y se calentó a 100 °C durante 5 min. La cantidad de proteína de las muestras a cargar en los pocillos fue de aproximadamente 20 μ g para las muestras de extracto de soja y 2 μ g para las muestras de proteína pura.

El equipo de electroforesis se rellenó con tampón 250 mM Tris, 1,92 M glicina, pH 8,3 que contenía 1% SDS.

Las electroforesis se realizaron en un equipo Miniprotean Biorad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.) a un voltaje de 180V. Tras finalizar la electroforesis, los geles se tiñeron con el colorante azul de Coomassie R compuesto de 0,65 g de Coomassie R, 200 mL de metanol, 500 mL de agua destilada, 100 mL de ácido acético y 100 mL de glicerol, manteniéndolos en agitación durante 1 h. Después se retiró el colorante y se añadió una mezcla decolorante compuesta por 250 mL de metanol, 80 mL de ácido acético, 20 mL de glicerina y 650 mL de agua destilada manteniendo el gel sumergido durante varias horas hasta que quedaron incoloras las zonas del gel donde no había bandas de proteína. En el caso de las electroforesis de las muestras de proteína purificadas, el grado de pureza se determinó por densitometría, usando un escáner EPSON EU-88 Image Scanner III (Long Beach, California).

3.2.4 Técnica de ELISA de tipo sándwich

Las placas se tapizaron con 120 μ L/pocillo de una solución de anticuerpos anti-glicinina o anti- β -conglucininina purificados previamente (3 μ g/mL) en tampón 0,05 M carbonato sódico, pH 9,6. Tras la incubación durante toda la noche, se lavaron las placas cinco veces con 300 μ L/pocillo de agua destilada. Para evitar uniones inespecíficas, se saturaron todos los puntos de unión a proteínas de los pocillos con 300 μ L/pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v) en PBS a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, se lavaron las placas tres veces con una solución de PBS que contenía un 0,5% de Tween-20 (PBS-T). Finalmente se dejaron secar durante toda la noche a

temperatura ambiente y se almacenaron a 4 °C en bolsas que contenían sílica gel para evitar la humedad.

Para los respectivos ensayos, primero se lavaron los pocillos 3 veces con PBS-T, y a continuación, se incubaron con 100 µL/pocillo de las muestras o de los estándares durante 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar 5 veces con PBS-T, se adicionaron 100 µL/pocillo de una dilución adecuada de los anticuerpos anti-glicinina o anti-β-conglicinina marcados con la enzima peroxidasa y se incubaron los pocillos durante 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar 5 veces con PBS-T se incubaron los pocillos con 100 µL/pocillo de una solución de sustrato comercial que contenía tetrametilbencidina (TMB) durante 30 min de incubación a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL/pocillo de 2 M ácido sulfúrico (H₂SO₄). Finalmente, la absorbancia de los pocillos se determinó a 450 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS Labsystem, Helsinki, Finlandia).

3.2.5 Determinación del espectro de fluorescencia

El espectro de fluorescencia de se ha determinado en un espectrofluorímetro Aminco SLM 4800C (Rochester, USA). La fluorescencia intrínseca del triptófano se registró entre 300 y 400 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 290 nm. La anchura de la banda de excitación fue de 3 nm y la de emisión de 5 nm.

3.2.6 Medida de la fluorescencia mediante “quenching” con acrilamida

La fluorescencia de las muestras debida al triptófano se determinó excitando a 295 nm y midiendo la emisión a 337 nm. Para ello, a un volumen de 2,6 mL de muestra contenida en una cubeta se le añadieron alícuotas de 10 µL de una solución de acrilamida 5 M hasta alcanzar una concentración final de 0,2 M. La fluorescencia de cada muestra se determinó en ausencia de acrilamida (F_0) y tras cada adición de acrilamida (F) y se representó gráficamente el cociente F_0/F frente a la concentración de acrilamida (quencher) para obtener la gráfica de Stern-Volmer. La ecuación de Stern-Volmer relaciona la pérdida de fluorescencia de una solución de proteína, con la concentración de un “quencher” colisional (Q). La pendiente de las gráficas obtenida al representar F_0/F frente a la concentración de acrilamida se define como la constante aparente (K_{ap}), y su valor se emplea como medida de la hidrofobicidad relativa:

$$\frac{F_0}{F} = K_{ap} \times [Q]$$

3.2.7 Tratamientos tecnológicos

Las proteínas glicinina y β -conglucina puras en tampón PBS y el extracto de proteínas de harina de soja cruda en el mismo tampón se sometieron a diferentes tratamientos tecnológicos (térmicos, altas presiones y ultrasonidos) en las condiciones que se indican a continuación. La concentración de proteína en las muestras de proteína pura se determinó mediante espectrofotometría considerando su coeficiente de extinción de 0,8 y 0,44 para la glicinina y la β -conglucina, respectivamente. En las muestras del extracto proteico de la soja, la concentración se determinó mediante la técnica de BCA.

3.2.7.1 Tratamientos térmicos

Un volumen de 3 mL de PBS se precalentó en un tubo de ensayo con tapón de rosca, en un baño termostático a temperaturas de 72, 80 y 90 ($\pm 0,1$ °C), y posteriormente se añadió una solución de proteína purificada o de extracto de harina de soja concentrada para dar una concentración final de 0,2 mg/mL y de 1 mg/mL, respectivamente. Las muestras se trataron durante 15 s o 10 min, y se enfriaron inmediatamente en un baño de agua con hielo.

3.2.7.2 Tratamientos con altas presiones

Las muestras de proteína purificada (0,2 mg/mL) o de harina de soja (1 mg/mL) se introdujeron en *eppendorf* de 1,5 mL de capacidad, sin espacio de cabeza y se sellaron con parafilm.

Las muestras se trataron en un equipo discontinuo de altas presiones, modelo FPG 5740 MICRO FOOD LAB de Stansted Fluid Power (Essex, Reino Unido) a 400, 500 y 600 MPa durante 10 min a 20 y 50 °C. Los tratamientos se realizaron en el Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria de San Adrián (Navarra, España).

3.2.7.3 Ultrasonidos

Los tratamientos se llevaron a cabo en un equipo generador de ultrasonidos modelo DIGITAL SONIFIER 450 ULTRASONIC CELL DISRUPTOR (Branson Ultrasonics, Danbury, Conn) descrito por Raso et al. (1998).

La cámara de tratamiento se llenó (aproximadamente 100 mL) con una solución del extracto crudo (1mg/mL) y se sometió a tratamientos de diferente amplitud (30 y 50%) y presiones manométricas (0, 0,5 y 1 bar) obteniéndose alícuotas a diferentes tiempos de tratamiento.

3.2.8 Estadística

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en este trabajo fin de máster se ha empleado el programa estadístico GraphPad Prism 5.

Para realizar el análisis inferencial, empleamos el test no paramétrico U de Mann-Whitney puesto que no todos los datos obtenidos presentaban una distribución normal ni una homogeneidad de varianzas (homocedasticidad). Dicho test nos permitió comprobar si los diversos tratamientos a los que sometimos a las muestras a estudiar, generaban efectos estadísticamente significativos o no en la estructura de la proteína que afectaba a su inmunorreactividad, con respecto a la muestra control.

Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con un valor $p \leq 0,05$. Se han utilizado asteriscos (*) para expresar las diferencias significativas en las gráficas de los resultados.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de glicinina y β -conglucina

Las proteínas glicinina y β -conglucina se han purificado a partir de semillas de soja cruda, mediante técnicas de precipitación isoelectrica, de precipitación salina con sulfato amónico y de cromatografía de exclusión molecular.

La utilización de técnicas de precipitación isoelectrica es muy utilizada en la purificación de proteínas. El punto isoelectrico de una proteína, que se corresponde con el pH al cual su carga neta es cero, induce su precipitación cuando la proteína se encuentra en un medio acuoso a ese pH consiguiendo así separar y/o eliminar otras proteínas presentes en la muestra que tienen un pI diferente y permanecen en solución. El punto isoelectrico de la glicinina y la β -conglucina es de 6,4 y 4,8 respectivamente, por lo que durante el aislamiento se ajustó el pH del extracto para obtener las fracciones 11S y 7S, respectivamente en la que se encuentran dichas proteínas. Por otra parte, la adición de sulfato amónico al medio provoca que las moléculas de agua, que se encontraban interactuando con la parte cargada de la proteína, sean atraídas por los iones de sal, disminuyendo las moléculas de agua disponibles y como consecuencia disminuye la solubilidad de la proteína y aumenta la tendencia a que se agregue y precipite.

El primer paso para el aislamiento de la glicinina fue ajustar el pH del medio a su pI. En la Figura 5 se muestra el perfil electroforético de las fracciones obtenidas durante la purificación de dicha proteína. Como se puede observar, la fracción 11S obtenida en el precipitado obtenido a pH 6,4 contiene principalmente glicinina, en la que se visualizan las cadenas ácidas, que tienen un peso molecular comprendido entre 31-45 kDa, y las cadenas básicas, que tienen un peso molecular entre 18 y 20 kDa. La posterior adición de sulfato amónico, primero a una saturación entre 0 y 51% para precipitar otras proteínas minoritarias contaminantes y después entre 51 y 66% para precipitar la glicinina da lugar a un enriquecimiento considerable de su pureza.

En el caso de la β -conglucina, que queda en el sobrenadante cuando el extracto se ajusta a un pH de 6,4, se ajusta a pH 5,5 para eliminar algunas proteínas minoritarias y después a pH 4.8 en el que se induce su precipitación, con las subunidades α , α' y β de pesos moleculares 76, 72 y 53 kDa, respectivamente (Figura 5). Sin embargo, esta fracción todavía contiene también una alta proporción de glicinina, que se elimina al añadir sulfato amónico a una saturación desde el 0 al 75% y posteriormente se enriquece la β -conglucina al precipitar con la sal entre 75 y 100% de saturación (Mo et al., 2011).

Posteriormente, las fracciones enriquecidas en glicinina y β -conglucina procedentes de las etapas anteriores se aplicaron a una columna de filtración en gel Sepharose CL-6B, cuyos perfiles de elución se muestran en la Figura 6. La cromatografía de filtración en gel es un método de separación de moléculas en función de su tamaño. El gel contiene micropartículas con poros y canales internos de un tamaño determinado. Las partículas mayores al tamaño de los poros atraviesan el gel sin penetrar en ellos por lo que eluyen las primeras. Las partículas menores al tamaño de los poros entran en las partículas y se retardan, por lo que eluyen más tarde.

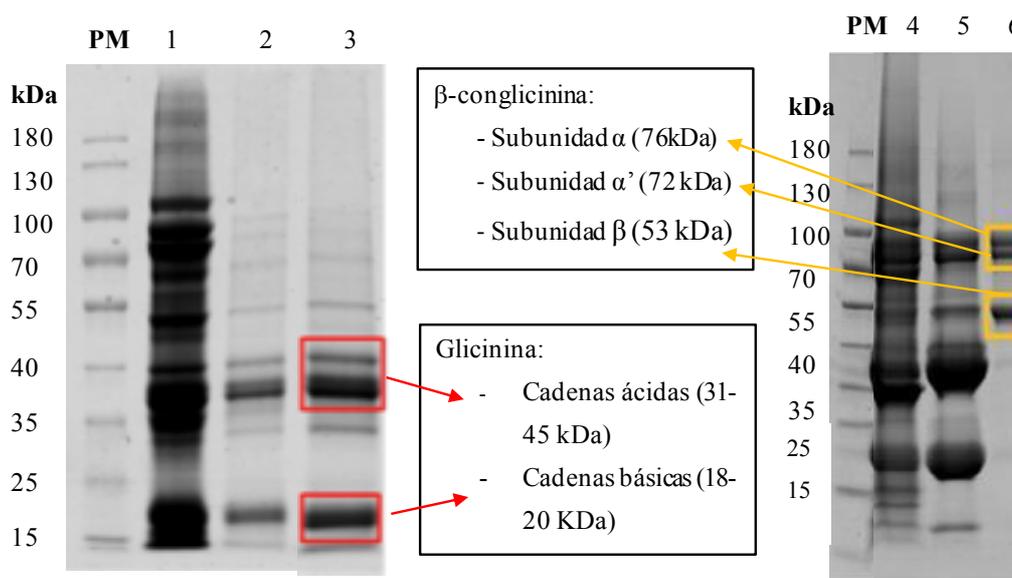


Figura 5. SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones obtenidas en las etapas de purificación de la glicinina y la β -conglucina. (PM, Marcador de pesos moleculares).

- 1) Extracto de soja obtenido con el tampón Tris pH 8,5
- 2) Fracción 11S precipitada a pH 6,4
- 3) Fracción 11S precipitada con sulfato amónico 51-66%
- 4) Fracción 7S precipitada a pH 4,8
- 5) Fracción 7S precipitada con sulfato amónico 0-75%
- 6) Fracción 7S precipitada con sulfato amónico 75-100 %

El perfil de la filtración en gel de la glicinina presenta tres picos (Figura 6). El primero y el tercero, minoritarios, contienen probablemente una pequeña proporción de agregados proteicos y de péptidos de bajo peso molecular, respectivamente. En el segundo pico, que es el mayoritario eluye la glicinina. El perfil de elución de la fracción 7S contiene un único pico mayoritario, que presenta una cola, encontrándose la β -conglucina entre las fracciones 14 y 24. Las fracciones enriquecidas en glicinina o β -conglucina se recogieron conjuntamente y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El grado de pureza de las proteínas obtenidas, determinada mediante densitometría utilizando un escáner EPSON EU-88 Image Scanner fue superior al 95%.

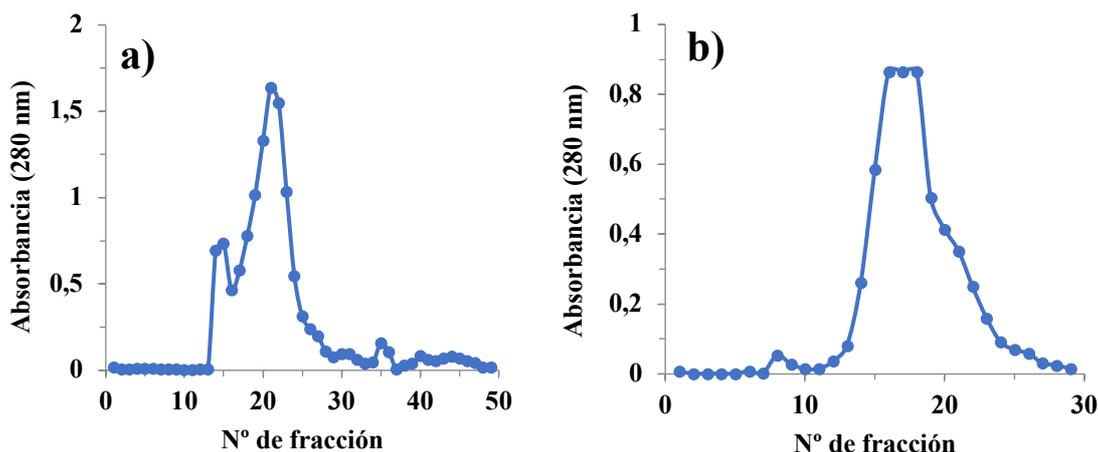


Figura 6. Perfil de la cromatografía en Sepharose CL-6B de las fracciones enriquecidas en glicinina (a) y β -conglycinina (b), obtenidas tras la precipitación con sulfato amónico. Las fracciones recogidas fueron de 2 mL.

4.2 Determinación de la concentración de glicinina y β -conglycinina mediante técnicas de ELISA de tipo sándwich

La concentración de glicinina y β -conglycinina inmunorreactivas se ha determinado mediante técnicas de ELISA de tipo sándwich, previamente desarrolladas por el grupo. En la Figura 7 a y b se muestran las curvas de calibración obtenidas para cada proteína utilizando estándares de proteína pura en PBS. El mejor ajuste en ambos casos se obtuvo al representar la absorbancia de los estándares frente a la concentración de proteína mediante una curva polinómica de segundo grado, que en todos los ensayos mostró un $r^2 > 0,99$. Las curvas de calibración obtenidas son lineales en un rango de concentraciones entre 2,5 y 100 ng/mL para la glicinina y entre 2 y 25 ng/mL para la β -conglycinina.

La concentración de glicinina y de β -conglycinina de las muestras problema se determinó por interpolación de los valores de la absorbancia en las correspondientes curvas de calibración.

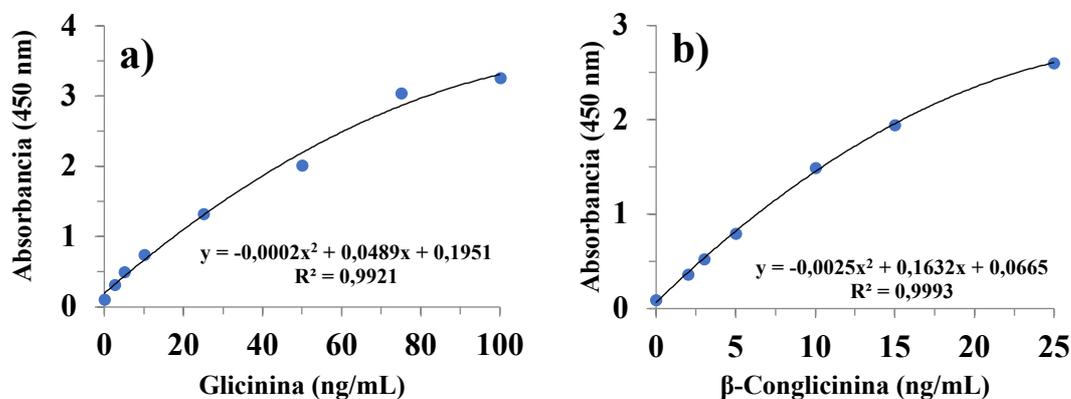


Figura 7. Curvas de calibración obtenidas mediante la técnica de ELISA tipo sándwich para la determinación de glicinina (a) y β -conglycinina (b).

4.3 Efecto de los tratamientos tecnológicos en la glicinina y la β -conglucina

En este estudio, se ha determinado el efecto que tienen diferentes tratamientos tecnológicos (térmicos, altas presiones y ultrasonidos) en las proteínas glicinina y β -conglucina. Se ha determinado la concentración de proteína inmunorreactiva mediante técnicas de ELISA de tipo sándwich previamente desarrollada en el grupo (Segura-Gil et al., 2018), tras el tratamiento de las proteínas tanto purificadas como contenidas presentes en el extracto proteico de la harina de soja cruda del que se aislaron.

Además, en las muestras de proteína purificada se ha determinado también el espectro de fluorescencia y la hidrofobicidad tras ser sometidas a los diferentes tratamientos. En el caso de los ultrasonidos, solo se han aplicado a extractos de soja debido a la elevada cantidad de muestra necesaria para el tratamiento de las mismas.

4.3.1 Efecto de los tratamientos térmicos

Se sometió al extracto de harina de soja y a las proteínas puras glicinina y β -conglucina a tratamientos de 72, 80 y 90 °C durante 15 s o 10 min.

4.3.1.1 Determinación de la inmunorreactividad

Las técnicas inmunoquímicas han sido ampliamente utilizadas para estudiar el efecto del procesado en numerosas proteínas alimentarias (de Luis et al., 2007; Montserrat et al., 2013; wehbi et al., 2005). Ello es debido a que los cambios que se producen en la estructura de una proteína inducida por los tratamientos aplicados, producen en la mayoría de los casos una disminución de la inmunorreactividad debido a la pérdida de epítomos conformacionales de la proteína que reaccionan con los anticuerpos específicos y/o a fenómenos de agregación intermoleculares que enmascaran esos epítomos. En algunas ocasiones, el cambio de conformación de una proteína puede dar lugar a un aumento de su inmunorreactividad debido a la exposición al medio de epítomos que se encontraban enmascarados en la zona interna de la proteína en su estado nativo.

En la Figura 8a se muestra el porcentaje de glicinina inmunorreactiva tras el tratamiento térmico de la proteína pura en tampón. A tiempos cortos, de 15 s, los tratamientos a 72 y 80 °C no afectaron a su inmunorreactividad, mientras que a 90 °C se observa una disminución del 60%. Los tratamientos a tiempos de 10 min causaron una disminución del porcentaje de glicinina estadísticamente significativo en todos los casos, que aumentó con el incremento de la temperatura, llegando a disminuir más del 95% tras

el tratamiento más severo. Cuando se trató el extracto de soja, se observaron las mayores diferencias significativas en las muestras tratadas a 80 y 90 °C durante 10 min, siendo la pérdida de inmunorreactividad del tratamiento más intenso de aproximadamente un 70% (Figura 8b).

Si se comparan los resultados obtenidos en los dos medios de tratamiento se observa una mayor termorresistencia de la glicinina al ser tratada en el extracto que en tampón, con diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos de 90 °C.

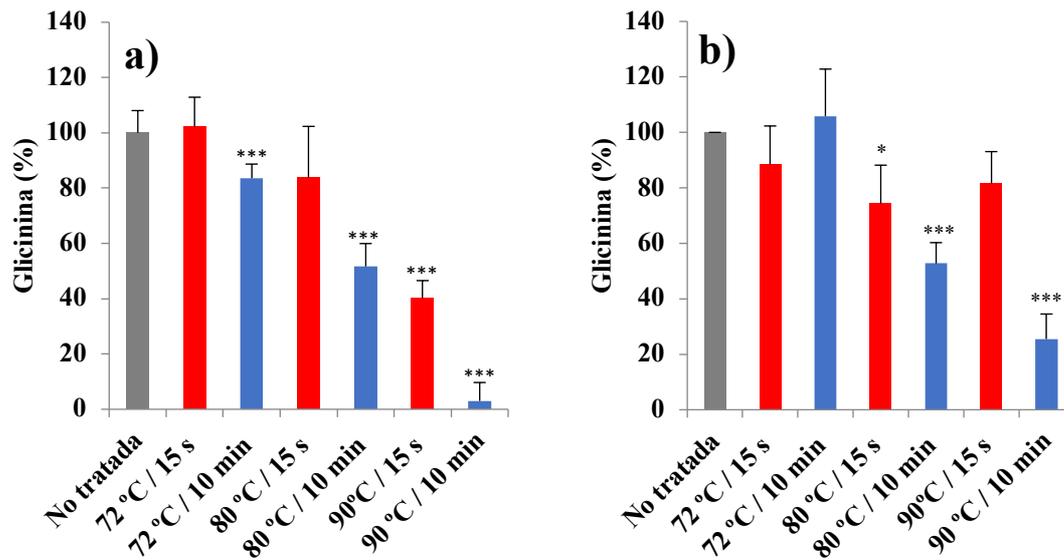


Figura 8. Efecto de los tratamientos térmicos de la proteína pura (a) o del extracto proteico de soja (b) en la inmunorreactividad de la glicinina a diferentes temperaturas (72, 80 y 90 °C) y tiempos de tratamiento (15 s, ■ y 10 min, ■). La concentración de proteína inmunorreactiva se expresa como porcentaje con respecto a la concentración de proteína de la muestra sin tratar (100%). Las barras corresponden a la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes analizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto el control (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

En el caso de la β -conglucininina tratada en tampón, el tratamiento térmico indujo también una disminución de la concentración de proteína inmunorreactiva, que fue estadísticamente significativa a todas las temperaturas y tiempos de tratamiento, exceptuando a 72 °C 15 s (Figura 9a). El tratamiento a 72 °C 10 min mostró una marcada desnaturalización de la proteína, siendo mayor del 56%. Sin embargo, con los tratamientos de mayor intensidad, la desnaturalización fue solo ligeramente mayor al compararla con este tratamiento y varió en un rango pequeño. Este hecho podría deberse a que una parte importante de los anticuerpos utilizados en el ensayo reconocen epítopos lineales de la proteína, y éstos no se ven alterados por el calor.

En el tratamiento del extracto de soja, la desnaturalización de la β -conglucina siguió una tendencia similar a cuando se trató purificada (Figura 9b), aunque la diferencia entre los porcentajes de desnaturalización entre las muestras del extracto tratadas y la sin tratar fueron en la mayoría de los casos menores comparados con los de la proteína pura. Por otra parte, si se comparan los porcentajes de desnaturalización entre las muestras de proteína pura y del extracto, las diferencias son estadísticamente significativas solo en el tratamiento a 72 °C 10 min.

Se ha indicado que la temperatura máxima de desnaturalización del pico endotérmico obtenido mediante calorimetría diferencial de barrido de la glicinina es de 90 °C y el de la β -conglucina de 70-80 °C (Montserrat et al., 20013). Nuestros resultados indican que el grado de desnaturalización por efecto del calor determinado mediante la medida de la inmunorreactividad es menor en la glicinina que en la β -conglucina en los tratamientos menos intensos pero mayor en los tratamientos más severos.

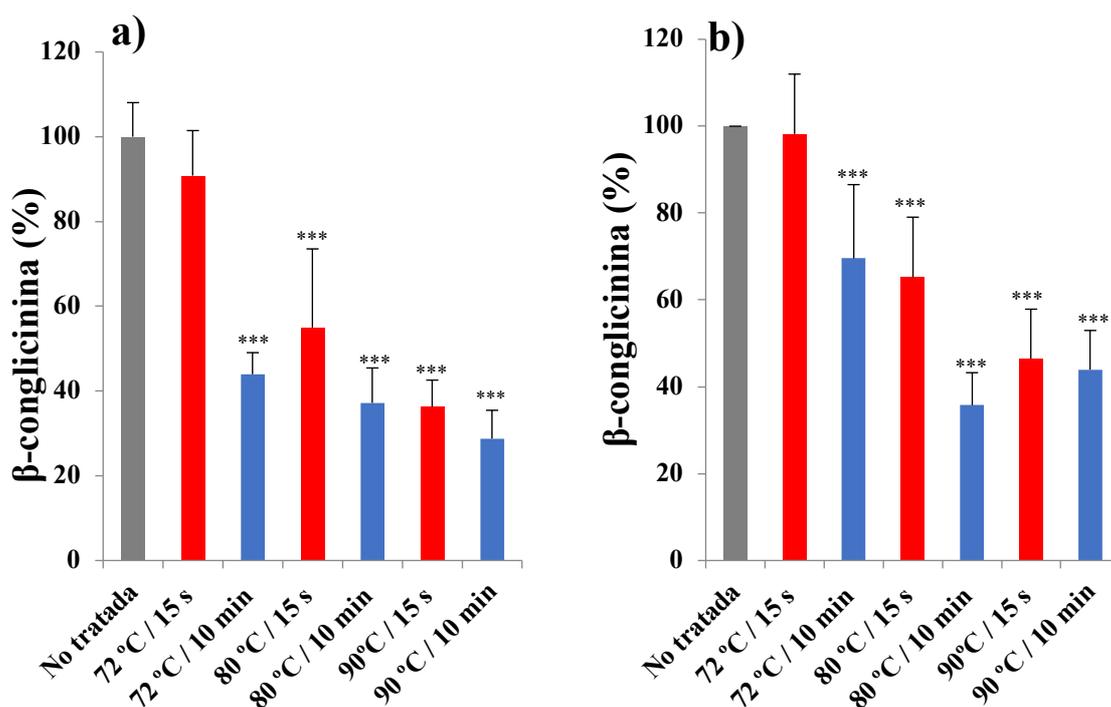


Figura 9. Efecto de los tratamientos térmicos de la proteína pura (a) o del extracto proteico de soja (b) en la inmunorreactividad de la β -conglucina a diferentes temperaturas (72, 80 y 90 °C) y tiempos de tratamiento (15 s, ■ y 10 min, ■). La concentración de proteína inmunorreactiva se expresa como porcentaje con respecto a la concentración de proteína de la muestra sin tratar (100%). Las barras corresponden a la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes analizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto el control (***) $p < 0,001$).

Los componentes presentes en la muestra ejercen un efecto protector en ambas proteínas, siendo más notable en la glicinina. Resultados similares se han observado en

el tratamiento térmico de otras proteínas como la β -lactoglobulina que presenta una mayor termorresistencia cuando es tratada en leche que en forma pura (De Luis et al., 2007). Sin embargo, otras proteínas muestran una estabilidad mayor cuando son calentadas en forma pura que en el alimento en que se encuentran, como es el caso de la α -lactalbúmina (Wehbi et al., 2005).

4.3.1.2 Determinación del espectro de fluorescencia e hidrofobicidad

Se han estudiado también los cambios conformacionales de la glicinina y la β -conglucina debidos al efecto de los tratamientos térmicos determinando la longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia y la intensidad a dicha longitud de onda.

La espectrofotometría de fluorescencia es una herramienta muy útil para estudiar cambios conformacionales de las proteínas. El espectro de fluorescencia de una proteína viene determinado fundamentalmente por el entorno químico en el que se encuentran los aminoácidos aromáticos, principalmente el triptófano. Por lo tanto, los cambios en el espectro de emisión del triptófano se deben fundamentalmente a cambios en la estructura, a la disociación de las subunidades o a fenómenos de agregación.

Así, se producen cambios en el máximo de emisión hacia una longitud de onda mayor cuando los triptófanos pasan de estar en un entorno apolar (hidrofóbico), es decir, situados en la zona interna de la proteína, a un entorno más polar (hidrofilico), es decir, situados en una zona más externa de la proteína (Bonomi et al, 2004).

La glicinina sin tratar tiene una longitud máxima de emisión de fluorescencia de 335 nm. Este valor es similar al máximo de emisión del triptófano en un medio apolar (330-335 nm), lo que indica que los residuos de triptófano en la glicinina se encuentran en una zona relativamente interna en su estructura. Todos los tratamientos térmicos de la glicinina inducen un ligero aumento (3-4 nm) de la longitud máxima de emisión, lo que indica que el triptófano pasa de encontrarse en un medio más polar, más expuesto al medio acuoso. Por otra parte, la intensidad de fluorescencia de la glicinina tratada no mostró cambios apreciables salvo tras el calentamiento a 90 °C durante 10 min, en el que se produjo un considerable aumento de la misma. Estos resultados están de acuerdo a los obtenidos por Miriani et al. (2011) quienes observaron diferencias similares en la glicinina tras aplicar tratamientos de 75 y 95 °C durante 15 min.

En el caso de la β -conglucina, no se pudo realizar este estudio debido a la baja intensidad de fluorescencia obtenida con las muestras, hecho que se debe probablemente a la baja concentración de proteína usada en los experimentos y a la presencia de solo dos

residuos de triptófano en la proteína (frente a cuatro que tiene la glicinina). El haber utilizado una baja concentración de proteína en los experimentos se debe a que en esas condiciones se minimizan los fenómenos de agregación durante el proceso de desnaturalización térmica. Así, si se desea llevar a cabo un estudio similar habría que trabajar con concentraciones de proteína de al menos 1 mg/mL.

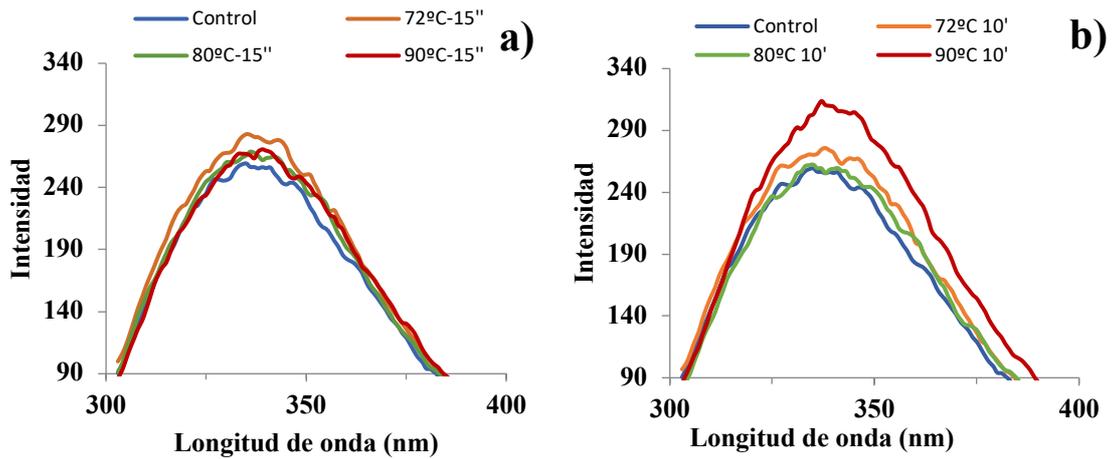


Figura 10. Espectro de fluorescencia de la glicinina sometida a diferentes tratamientos térmicos durante un tiempo de 15 s (a) y 10 min (b).

Los resultados correspondientes a los cambios en la hidrofobicidad de la glicinina producidos por los diferentes tratamientos térmicos, se obtuvieron mediante la medida de la fluorescencia por el método de Stern-Volmer (Figura 11).

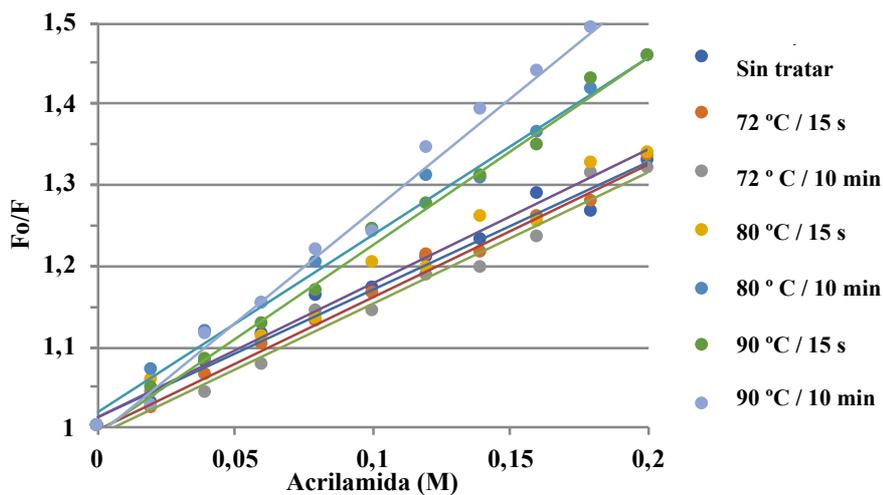


Figura 11. Gráfica de Stern-Volmer para la determinación de la hidrofobicidad de la glicinina sometida a diferentes tratamientos térmicos. F_0 : fluorescencia inicial de la glicinina; F : fluorescencia de la glicinina obtenida para las diferentes concentraciones de acrilamida.

En el estado desplegado, el triptófano más expuesto al medio acuoso es extinguido por la acrilamida con una eficiencia mayor que en el estado nativo de la proteína (Speroni et al., 2010), lo que se refleja en un cambio en la pendiente. Así, la hidrofobicidad de cada muestra de glicinina sometida a los diferentes tratamientos térmicos está determinada por el valor de la constante aparente (K_{ap}), que se corresponde con el valor de la pendiente de cada recta (Tabla 2).

Tabla 2. Constante de hidrofobicidad (K_{ap}) de la glicinina sometida a diferentes tratamientos térmicos. La K_{ap} de la muestra sin tratar es de 1,58.

Temperatura (°C)	15 s	10 min
72	1,63	1,61
80	1,65	2,19
90	2,31	2,83

Los resultados obtenidos indican que la hidrofobicidad de la glicinina aumenta tras los tratamientos de 80 °C durante 10 min y de 90 °C durante 15 s o 10 min, no viéndose modificada apenas con tratamientos de menor intensidad. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en la determinación de la inmunorreactividad y son similares a los obtenidos en el estudio de Miriani et al. (2011) en el tratamiento térmico de la glicinina.

4.3.1.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

En este trabajo, hemos utilizado electroforesis en presencia de SDS en condiciones reductoras y no reductoras. En condiciones no reductoras, en las muestras de glicinina tratadas a 90 °C durante 10 min se observa una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a las subunidades de la proteína, que no se visualiza en condiciones reductoras lo que sugiere que durante ese tratamiento se forman agregados covalentes (Figura 12). Sin embargo, en la β -conglucina, la muestra tratada y sin tratar presenta un similar perfil en ambas condiciones. Estos resultados están de acuerdo a los obtenidos por Keerati-u-rai et al. (2010). Estos autores analizaron por electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras la glicinina y β -conglucina antes y después de la centrifugación, tras haber sometido las muestras a un tratamiento a 95 °C durante 15 min y observaron que dicho tratamiento induce la formación de agregados solubles en el caso β -conglucina y de agregados insolubles en el de la glicinina.

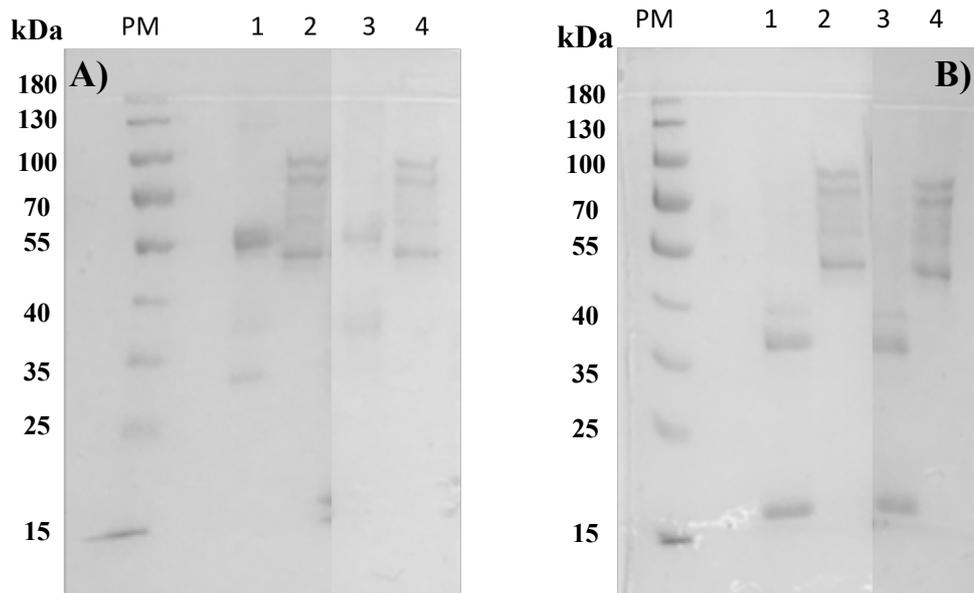


Figura 12. SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B) de:

PM: Marcador de pesos moleculares

1: Glicinina nativa

2: β -conglycinina nativa

3: Glicinina 90 °C, 10 min

4: β -conglycinina 90 °C, 10 min

4.3.2 Efecto de los tratamientos de altas presiones

En este estudio, las muestras de glicinina y β -conglucina en tampón y el extracto proteico de soja se sometieron a tratamientos de altas presiones a 400, 500 y 600 MPa durante 10 min a 20 y 50 °C.

4.3.2.1 Determinación de la inmunorreactividad

La inmunorreactividad de la glicinina pura tratada a 400 MPa durante 10 min a 20 y 50°C mostró una marcada disminución en la inmunorreactividad (valor $p < 0,01$), aproximadamente del 50% y del 30%, respectivamente (Figura 13). A presiones mayores el grado de desnaturalización disminuyó comparativamente mucho menos. Así, la cantidad de proteína inmunorreactiva tras tratamientos a 500 y 600 MPa fue similar a las dos temperaturas estudiadas, con un valor de aproximadamente el 40% respecto a la proteína sin tratar en ambos tratamientos.

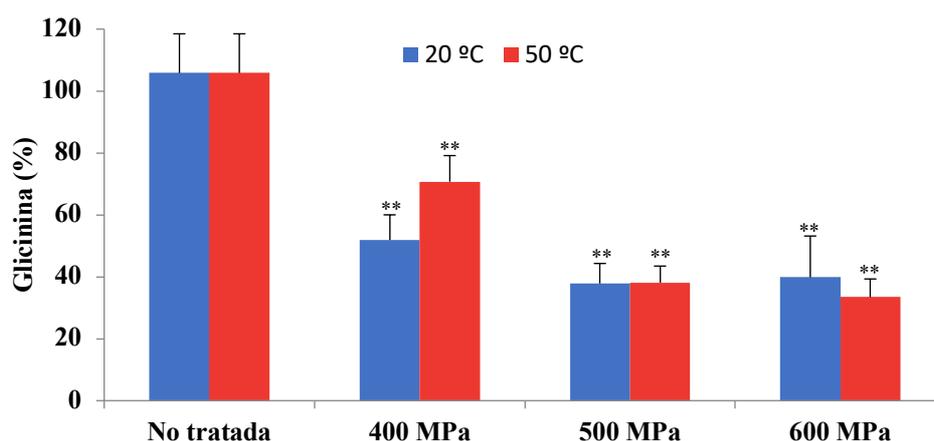


Figura 13. Efecto de los tratamientos de altas presiones de la glicinina purificada en su inmunorreactividad. La concentración de proteína inmunorreactiva tratada a diferentes presiones (400, 500 y 600 MPa) y temperaturas (20 y 50 °C) durante 10 min se expresa como porcentaje con respecto a la concentración de proteína de la muestra sin tratar (100%). Las barras corresponden a la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes analizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (** $p < 0,01$).

En el tratamiento del extracto proteico de soja a 400 MPa durante 5 y 10 min a las dos temperaturas (20 y 50 °C) y tiempos estudiados (5 y 10 min), la cantidad de glicinina inmunorreactiva disminuyó muy poco. Al aumentar la presión y el tiempo de tratamiento, la desnaturalización aumentó de forma gradual en las muestras tratadas a 20 °C, quedando un 40% de la proteína inicial tras el tratamiento a 600 MPa durante 10 min. Sin embargo,

en las muestras tratadas a 50 °C, la desnaturalización a 500 y 600 MPa fue muy marcada, entre un 80 y un 95%.

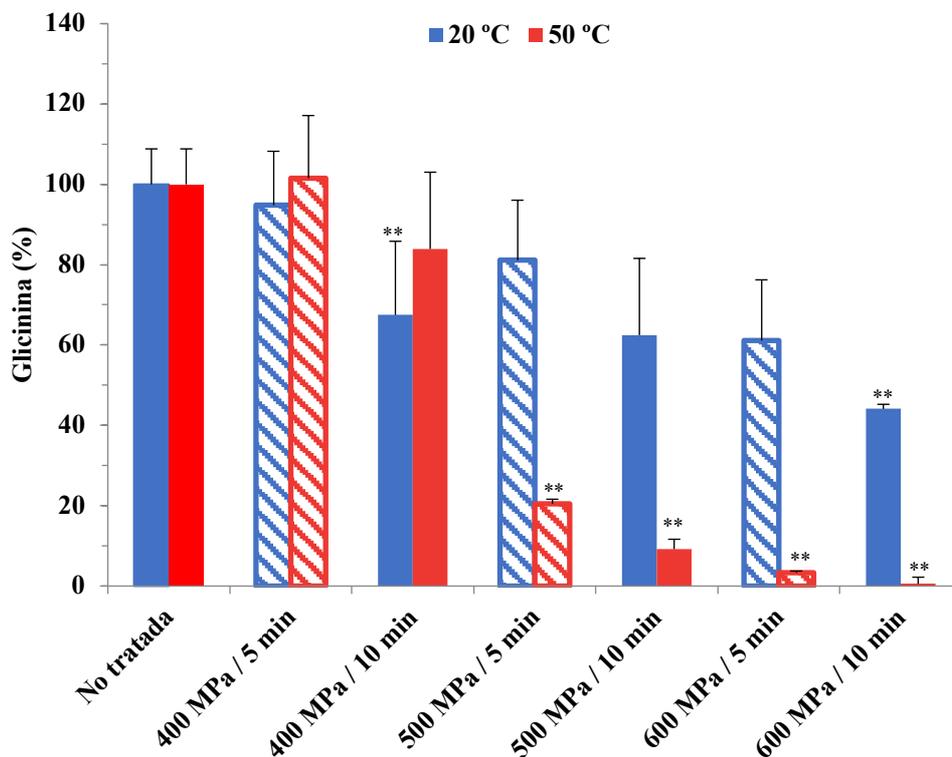


Figura 14. Efecto de los tratamientos de altas presiones del extracto proteico de soja en la inmunorreactividad de la glicinina. La concentración de proteína inmunorreactiva tratada a diferentes presiones (400, 500 y 600 MPa), temperaturas (20 y 50 °C) y tiempos (5 min, patrón rayado y 10 min, patrón liso) se expresa como porcentaje con respecto a la concentración de proteína de la muestra sin tratar (100%). Las barras corresponden a la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes analizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (** $p < 0,01$).

En el caso de la β -conglycinina pura, se observa un comportamiento similar al de la glicinina. El grado de desnaturalización es muy marcado tras el tratamiento a 400 MPa a las dos temperaturas estudiadas, del 60% y del 80%, a 20 y 50 °C, respectivamente y disminuye ligeramente a presiones mayores quedando menos de un 20% de la proteína inmunorreactiva inicial (Figura 15). Estos resultados están de acuerdo a los indicados por Xi y He (2018) quienes observaron una disminución mayor del 50% tras el tratamiento de la glicinina a 400 MPa durante 15 min a 20 °C.

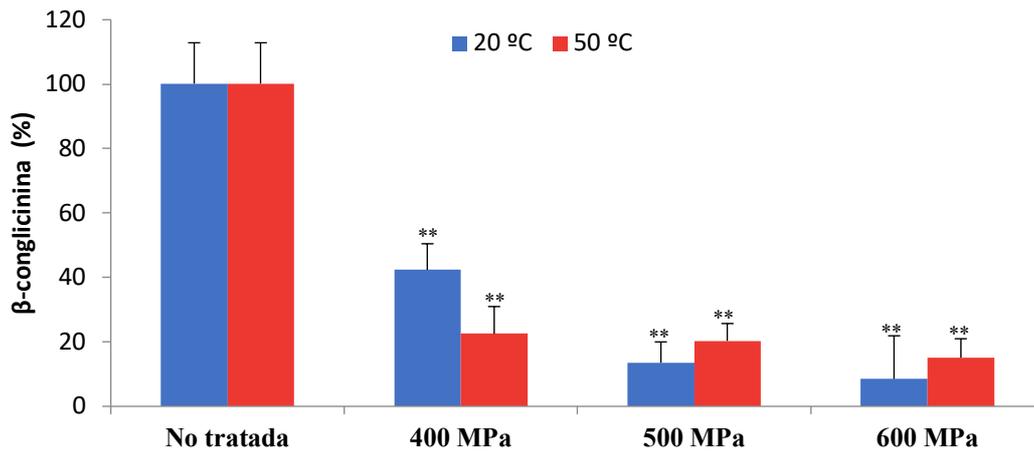


Figura 15. Efecto de los tratamientos de altas presiones de la β -conglucina purificada en su inmunorreactividad. La concentración de proteína inmunorreactiva tratada a diferentes presiones (400, 500 y 600 MPa) y temperaturas (20 y 50 °C) durante 10 min se expresa como porcentaje con respecto a la concentración de proteína de la muestra sin tratar (100%). Las barras corresponden a la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes analizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (** $p < 0,01$).

Quando se realizó el tratamiento del extracto proteico de soja, el efecto en la desnaturalización de la β -conglucina fue muy diferente al mostrado en el tratamiento de la proteína pura. A 400 MPa, se observó incluso un aumento en la inmunorreactividad de la proteína a las dos temperaturas estudiadas. A presiones superiores, a 50 °C la cantidad de proteína inmunorreactiva fue mayor a la de la muestra sin tratar. A 20 °C, la reactividad de la β -conglucina fue similar a la de la muestra sin tratar salvo a 600 MPa durante 10 min, en la que la desnaturalización fue aproximadamente del 60%.

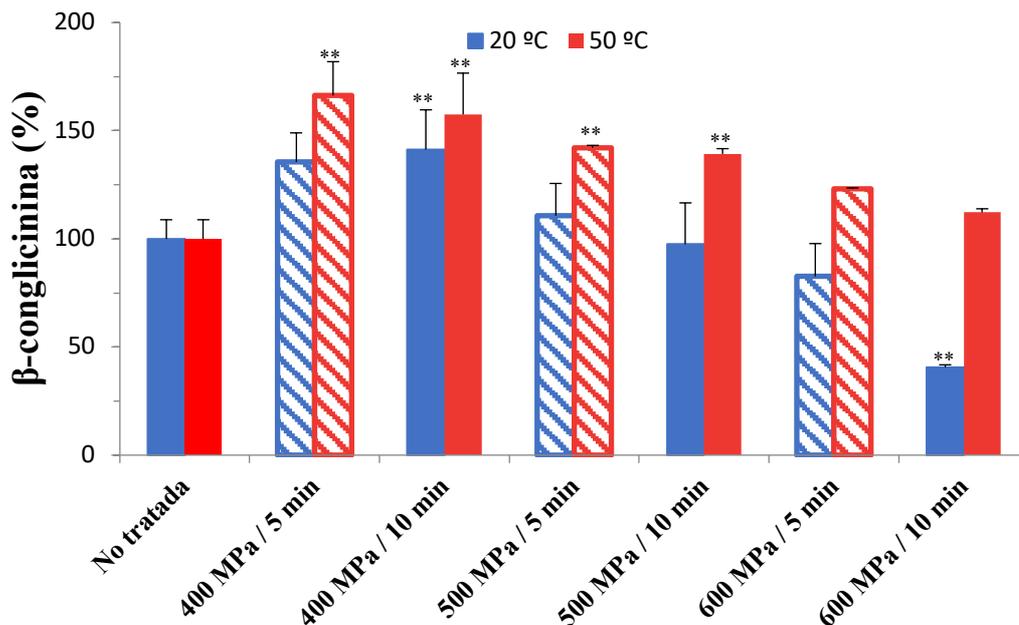


Figura 16. Efecto de los tratamientos de altas presiones del extracto proteico de soja en la inmunorreactividad de la β -conglucina. La concentración de proteína inmunorreactiva tratada

a diferentes presiones (400, 500 y 600 MPa), temperaturas (20 y 50 °C) y tiempos (5 min, patrón rayado y 10 min, patrón liso) se expresa como porcentaje con respecto a la concentración de proteína de la muestra sin tratar (100%). Las barras corresponden a la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes analizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (**p<0,01).

4.3.2.2 Determinación del espectro de fluorescencia e hidrofobicidad

En la Figura 17 se muestra el espectro de fluorescencia de la glicinina pura sometida a los tratamientos de altas presiones durante 10 min a 20 y 50°C. En los tratamientos de altas presiones no se observaron cambios apreciables de la longitud de onda máxima de emisión. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de la muestra tratada a 20 °C fue mayor a todas las presiones que la de la proteína sin tratar. A 50°C, la intensidad de fluorescencia de la proteína tratada a 400 MPa fue mayor que a presiones superiores y a la muestra sin tratar.

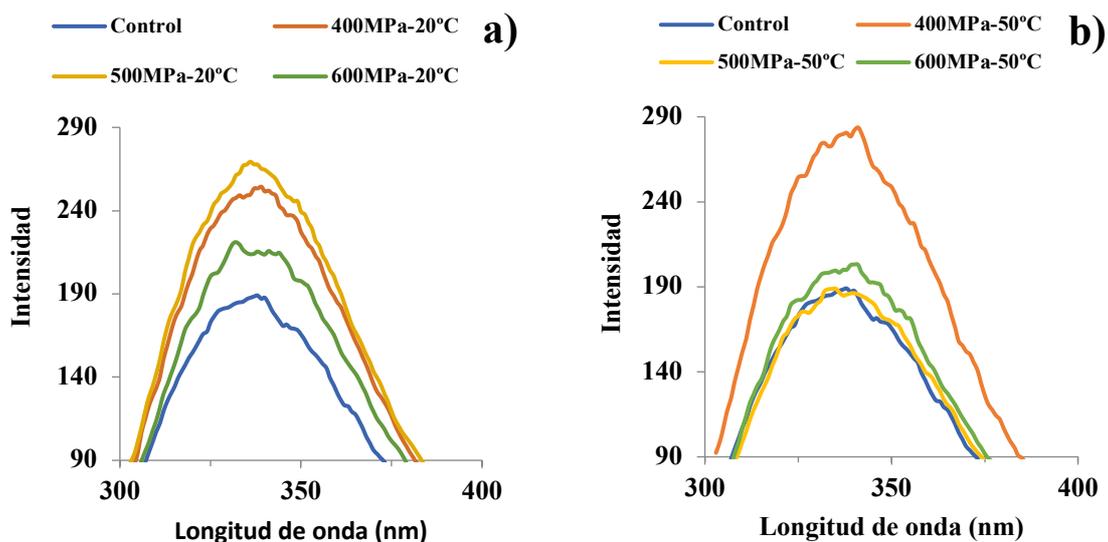


Figura 17. Espectro de fluorescencia de la glicinina pura sometida a tratamientos de altas presiones durante un tiempo de 10 min a temperatura de 20°C (a) y 50°C (b).

Las gráficas de Stern-Volmer y los valores de la constante de hidrofobicidad obtenidas en el estudio de la hidrofobicidad de la glicinina tratada con altas presiones se muestran en la Figura 18 y en la Tabla 3, respectivamente.

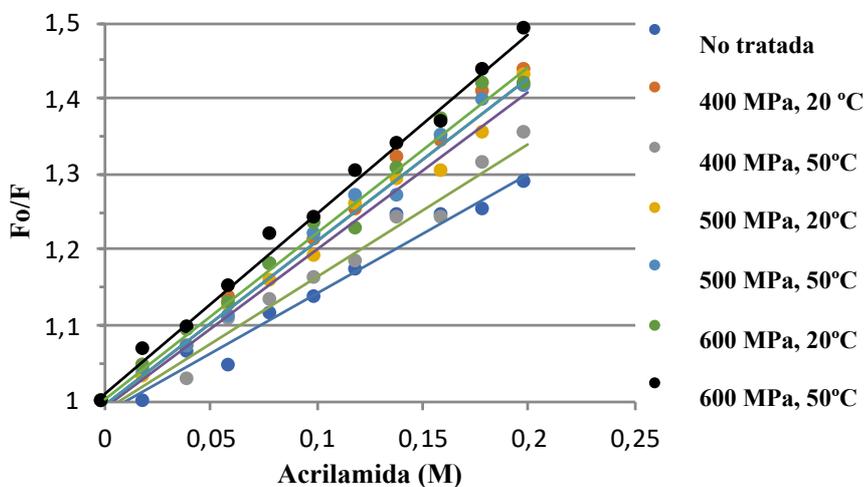


Figura 18. Gráfica de Stern-Volmer para la determinación de la hidrofobicidad de la proteína glicinina sometida a diferentes tratamientos de altas presiones. F_0 : fluorescencia inicial de la glicinina sin acrilamida, F : fluorescencia de la glicinina para las diferentes concentraciones de acrilamida.

Tabla 3. Constante de hidrofobicidad (K_{ap}) de la glicinina sometida a tratamientos de altas presiones durante 10 min. La K_{ap} de la muestra sin tratar es de 1,57.

Presión (MPa)	20°C	50°C
400	2,19	1,75
500	2,07	2,16
600	2,19	2,37

Los resultados obtenidos indican, que todos los tratamientos de altas presiones producen un aumento en la hidrofobicidad de la glicinina, siendo el tratamiento a 600 MPa a 50 °C el que resultó en el mayor incremento.

Los resultados obtenidos son similares a los indicados por Zhang et al. (2003) quienes observaron también un incremento en la hidrofobicidad de la glicinina al incrementar la presión de 200 a 500 MPa a 50°C, y atribuyeron este efecto a la disociación de la glicinina en sus subunidades, lo que da lugar a la exposición de las regiones más hidrofóbicas de la proteína.

4.3.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

En el análisis mediante electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras de las muestras de glicinina y β -conglucina tratadas a 600 MPa durante 10 min a 50 °C no se observaron diferencias en el perfil lo que indica que dicho tratamiento no ha sido capaz de formar agregados covalentes. En este estudio no se puede determinar si se podrían haber formado agregados mediante interacciones no covalentes, iónicas o hidrofóbicas, al haberse usado SDS en la preparación de las muestras. En el caso de querer conocer si el tratamiento ha sido capaz de agregar la proteína por interacciones no covalentes habría que realizar un análisis de las muestras mediante una electroforesis en condiciones nativas.

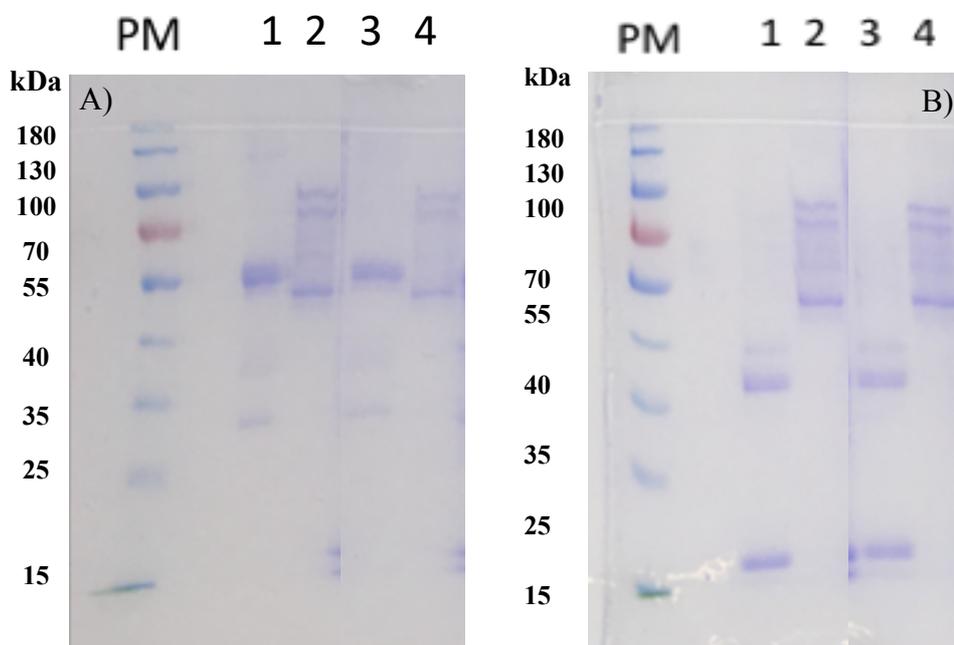


Figura 19. SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B) de:

PM: Marcador de pesos moleculares

1. Glicinina sin tratar

2. β -conglucina sin tratar

3. Glicinina tratada a 600 MPa, 10 min, 50 °C

4. β -conglucina 600 MPa, 10 min, 50 °C

4.3.3 Efecto de los tratamientos de ultrasonidos

El extracto proteico de la harina de soja se sometió a tratamientos de ultrasonidos de diferente amplitud (30 y 50%) y presiones manométricas (0, 0,5 y 1 bar) obteniéndose alícuotas a diferentes tiempos de tratamiento (0, 0,5, 2, 6 y 10 min).

4.3.3.1 Determinación de la inmunorreactividad y electroforesis en gel de poliacrilamida

Los resultados obtenidos en los tratamientos de ultrasonidos del extracto proteico de soja muestran que la inmunorreactividad de la glicinina y la β -conglucina varía en un rango entre el 68% y 112% y entre 67% y 131% con respecto a la de la correspondiente proteína sin tratar, respectivamente (Figuras 20 y 21). Como se observa en las gráficas, no existe una tendencia clara y en la mayoría de las muestras analizadas existe una considerable variabilidad en los resultados, lo que hace que las desviaciones estándar sean altas y las diferencias entre los valores comparados con la muestra sin tratar no tengan una significación estadística en la mayoría de las muestras.

Por otra parte, la electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras de las muestras tratadas a una amplitud del 30 y del 50% a una presión relativa de 1 bar durante 10 min no mostró diferencias con respecto a la muestra sin tratar, al igual que han indicado Hu et al. (2015).

A pesar de que en algunos trabajos se ha indicado que los tratamientos de ultrasonidos de alta intensidad (20 kHz a 400 w) inducen cambios en la fluorescencia y aumentan la hidrofobicidad de la glicinina y la β -conglucina (Hu et al., 2015; Wang et al., 2017), nuestros resultados sugieren que los ultrasonidos no inducen cambios sustanciales en su inmunorreactividad ni favorecen la formación de agregados. Este hecho podría deberse a la menor intensidad aplicada, así como a la menor concentración proteica de las muestras utilizada en nuestro trabajo (1 mg/mL frente a 30 mg/mL).

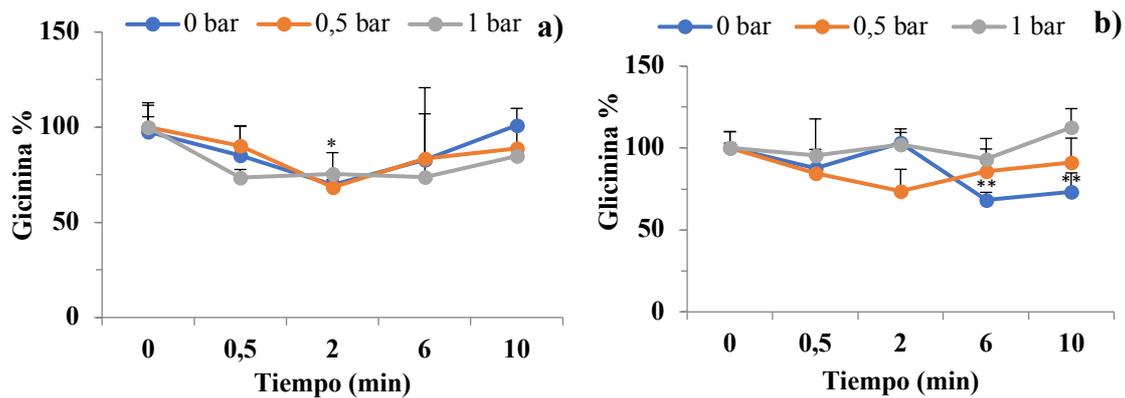


Figura 20. Efecto del tratamiento de ultrasonidos en la desnaturalización de la glicinina tratada en un extracto proteico de harina de soja a amplitudes del 30% (a) y del 50% (b) y a diferentes presiones relativas de 0, 0,5 y 1 bar. Los valores corresponden a la cantidad de proteína inmunorreactiva respecto a la muestra sin tratar (100%). Las barras corresponden a la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes analizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

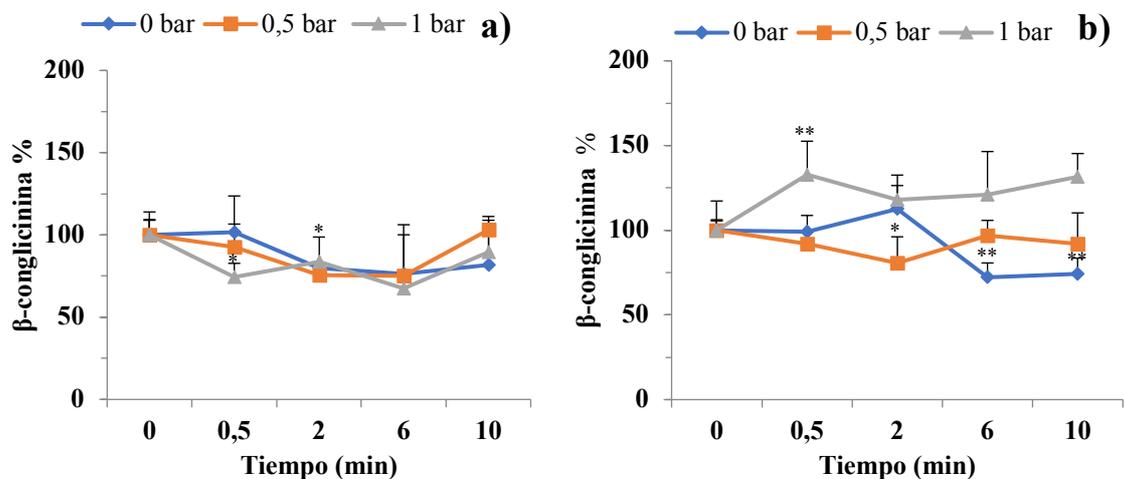


Figura 21. Efecto del tratamiento de ultrasonidos en la desnaturalización de la β -conglucina tratada en un extracto proteico de harina de soja a amplitudes del 30% (a) y del 50% (b) y a diferentes presiones relativas de 0, 0,5 y 1 bar. Los valores corresponden a la cantidad de proteína inmunorreactiva respecto a la muestra sin tratar (100%). Las barras corresponden a la media más la desviación estándar de dos experimentos independientes analizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

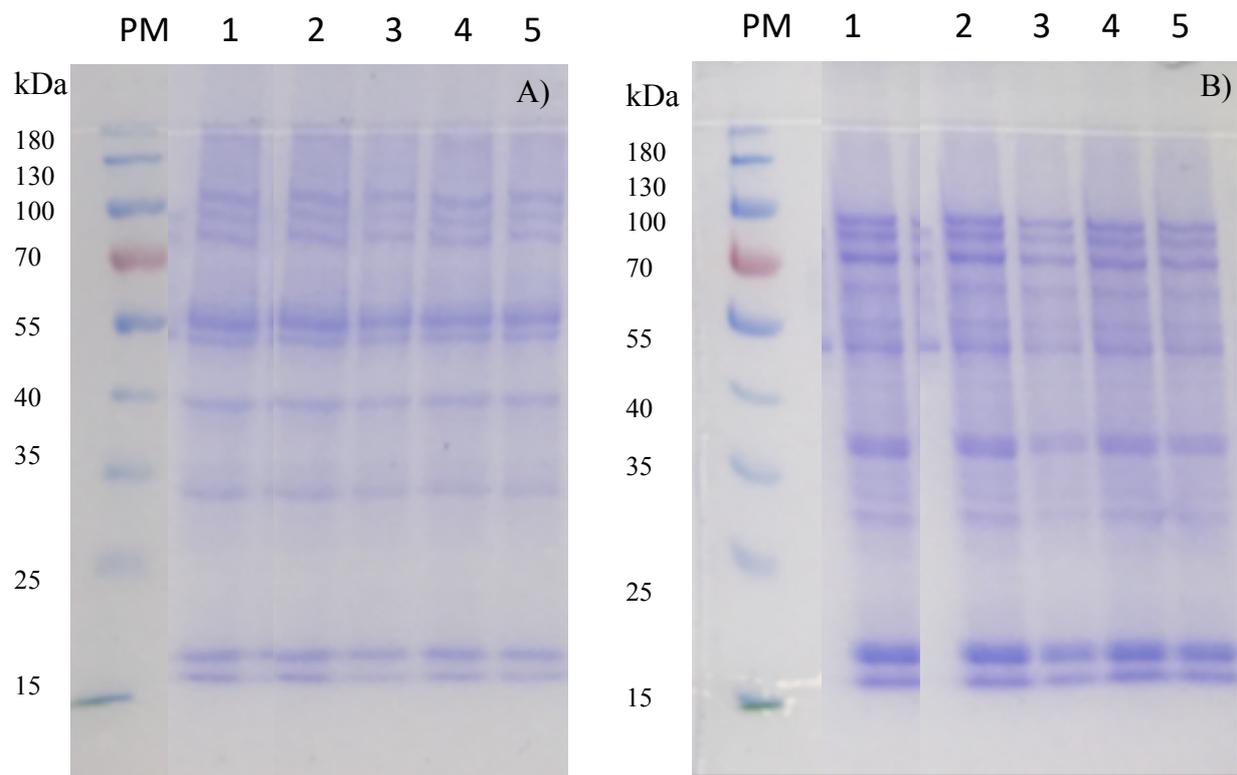


Figura 22. SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B) de las muestras tratadas con ultrasonidos durante 10 min:

PM: Marcador de pesos moleculares

1: Extracto de harina de soja (EC)

2. EC 0,5 bar 30% amplitud

3. EC 1 bar 30% amplitud

4. EC 0,5 bar 50% amplitud

5. EC 1 bar 50% amplitud

5. CONCLUSIONES

1. La combinación de técnicas de precipitación isoelectrica y salina y de filtración en gel permiten obtener glicinina y β -conglucina con un alto grado de pureza.
2. Los tratamientos térmicos aplicados a la glicinina y la β -conglucina puras producen cambios en su estructura que disminuyen considerablemente su inmunoreactividad y aumentan su hidrofobicidad. La desnaturalización por el calor de la glicinina en comparación con el de la β -conglucina es menor en los tratamientos menos intensos pero mayor en los tratamientos más severos.
3. El tratamiento de altas presiones a 400 MPa a 20 °C durante 10 min de la glicinina y la β -conglucina purificadas induce un profundo cambio en la inmunoreactividad de ambas proteínas, resultando en un grado de desnaturalización mayor del 50% y del 60%, respectivamente. El incremento de la presión hasta 600 MPa o de la temperatura a 50 °C tiene un efecto mucho menos marcado, obteniéndose una desnaturalización tras el tratamiento más severo del 60% y del 75%, respectivamente.
4. El medio de tratamiento influye considerablemente en la estabilidad de la β -conglucina y en menor medida de la glicinina frente a los tratamientos térmicos y de altas presiones, aumentando su resistencia frente a la desnaturalización cuando las proteínas son tratadas en un extracto proteico, lo que podría deberse a un efecto protector de otros componentes presentes en la muestra.
5. Los tratamientos de ultrasonidos no producen cambios significativos en la inmunoreactividad ni inducen la agregación de la glicinina y la β -conglucina.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, M., Takenaka, Y., Gidamis, A.B., Mikami, B., and Utsumi, S. (2001). Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *Journal of Molecular Biology*, 305(2):291–305.
- AESAN. (2005). Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. La alergia por anisakis y medidas de prevención. No 1.
- Bonomi, F., Mora, G., Pagani, M. A., & Iametti, S. (2004). Probing structural features of water-insoluble proteins by front-face fluorescence. *Analytical Biochemistry*, 329.
- Burks, A.W., Butler, H.L., Brooks, J.R., Hardin, J., and Connaughton, C. (1988). Identification and comparison of differences in antigens in two commercially available soybean protein isolates. *Journal of Food Science*, 53 (5): 1456–1459.
- Cabanillas, B., Cuadrado, C., Rodriguez, J., Dieguez, M.C., Novak, N. (2017). Boiling and Pressure Cooking Impact on IgE Reactivity of Soybean Allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 157: 41-50.
- Carroll, K.K., Kurowska, E.M. (1995). Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *Journal of Nutrition*, 125 (3): 594S-597S.
- Codex Alimentarius. (2006), Anteproyecto de Norma Revisada para Alimentos Exentos de Gluten. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/Codex/ccnfsdu28/cl06_05s.pdf. [acceso: 16/02/2007]
- De Luis, R., Pérez, M.D., Sánchez, L., Lavilla, M. y Calvo, M. (2007). Development of two immunoassay formats to detect beta-lactoglobulin: influence of heat treatment on its immunoreactivity and applicability in processed food. *Journal of Food Protection*, 70, 1691-1697.
- Duranti, M., Lovati, M.R., Dani, V., Barbiroli, A., Scarafoni, A., Castiglioni, S., Ponzzone, C., Morazzoni, P. (2004). The α ' subunit from soybean glycinin globulin lowers plasma lipids and upregulates liver -VLDL receptors in rats fed a hypercholesteremic diet. *Journal of Nutrition*, 134:1334-1339.
- EFSA Panel on Dietetic Products. (2014). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal*, 1:1– 277.
- EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies. (2014). Scientific opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients. *EFSA Journal*, 12(11): 3894–4180.
- Errahali, Y., Morisset, M., Moneret-Vautrin, D.A., Kanny, G., Metche, M., Nicolas, J.P., and Fremont, S. (2002). Allergen in soy oils. *Allergy*, 57(7):648–649.
- FAO-WHO. (2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations- World Health Organization. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. Disponible en:

http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_jan2001.pdf. [acceso: 14/02/2007].

Friedman, M. y Brandon, D.L. (2001). Nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (3), 1069-1086.

García Ara, M. C., Boyano, T., Martín Esteban, M., Martín Muñoz, F., Díaz Pena, J. M. y Ojeda, J. A. (1996). Actitud terapéutica y pronóstico en la alergia a alimentos. *Allergologia et Immunopathologia*, 24 (1), 31-35.

Helm, R.M., Cockrell, G., West, C.M., Herman, E.M., Sampson, H.A., Bannon, G.A., and Burks, A.W. (2000). Mutational analysis of the IgE- binding epitopes of P34/*Gly m* 1. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 105:378– 384.

Hu, H., Cheung, I., Pan, S., Li-chan, E. (2015). Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of aggregated soybean β -conglycinin and glicinin. *Food hydrocolloids*. 45, 102-110.

Kajiyama N, Isobe S, Uemura K, Noguchi A. (1995). Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure. *International Journal of Food Science and Technology*, 30(2):147–158.

Keerati-u-rai, M., Corredig, M., (2010), Heat-Induced changes occurring in oil/water emulsions stabilized by soy glycinin and β -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9171-9180.

L'Hocine, L. y Boye, J. I. (2007). Allergenicity of soybean: new developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(2), 127–143.

Liu, C., Wang, H., Cui, Z., He, X., Wang, X., Zeng, X., Ma, H., (2007). Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. *Food chemistry*, 102, 1310-1316.

Mañas, P. y Pagán, R., (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 1387-1399.

Maruyama, N., Adachi, M., Takahashi, K., Yakasaki, K., Kohno, M., Takenaka, Y., Okuda, E., Nakagawa, S., Mikami, B., and Utsumi, S. (2001). Crystal structures of recombinant and native soybean beta-conglycinin beta homotrimers. *European Journal of Biochemistry*, 268 (12): 3595–3604.

Meglio, P., Bartone, E., Plantamura, M., Arabito, E. y Giampietro, P.G. (2004). A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy*, 59, 980-987.

Meng, X., Bai, Y., Gao, J., Xin, L., Chen, H. (2017). Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine b-lactoglobulin. *Food Chemistry*, 219: 290–296.

- Miriani, M., Keerati-u-rai, M., Corredig, M., Iametti, S., Bonomi, F., (2011). Denaturation of soy proteins in solution and at the oil-water interface: A fluorescence study. *Food Hydrocolloids*, 25, 620-626.
- Mo, X., Wang, D., Sun, X., (2011). Physicochemical Properties of β and α' α subunits isolated from soybean β -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1217-1222.
- Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, M.F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., et al. (2005). Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 53: 4547-4553.
- Montserrat, M., Mayayo, C., Sánchez, L., Calvo, M. y Pérez, M.D. (2013). Study of the Thermoresistance of the Allergenic Ara h1 Protein from Peanut (*Arachis hypogaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3335-3340.
- Ogawa, T., Bando, N., Tsuji, H., Okajima, K., Nishikawa, K., Sasaoka, K. 1991. Investigation of the Ig binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 37 (6): 555–565.
- Pasini, G., Curioni, A., Vegro, M., Pagani, M., Masi, A. et al. (2010). Extraction and mass spectrometry identification of a major peach allergen Pru p 1. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 570-576 38
- Pedersen, H.S., and Djurtoft, R. 1989. Antigenic and allergenic properties of acidic and basic peptide chains from glycinin. *Food and Agricultural Immunology*, 1 (2): 101–109.
- Prieto N, Burbano C, Iniesto E, Rodríguez J, Cabanillas B, Crespo JF, Cuadrado C (2014) A novel proteomic analysis of the modifications induced by high hydrostatic pressure on hazelnut water soluble proteins. *Foods*, 3(2):279–289
- Ramaswamy, H.S., Chen, C. & Marcotte, M. (2005). Novel processing technologies for food preservation, in Barrett, D. M., Somogyi, L. P. & Ramaswamy, H (ed.), Processing fruits: science and technology, Boca Raton, FL, USA, CRC Press, 211-214.
- Sampson, H.A. Food allergy. (1999). Part 2: Diagnosis and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103, 981–989.
- Sicherer, S. H., y Sampson, H. A. (2015). Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 291– 307.
- Speroni, F., Añón, M.C., y Lamballerie, M. (2010). Effects of calcium and high pressure on soybean proteins: A calorimetric study. *Food Research International*, 43: 1347- 1355.
- Thanh, V.H., and Shibasaki, K. (1976). Major proteins of soybean seeds: A straight forward fraction and their characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24 (6): 1117–1121.

Wang, Y., Wang, Z., Handa, C., Xu, J. (2017). Effects of ultrasound pre-treatment on the structure of b-conglycinin and glycinin and the antioxidant activity of their hydrolysates. *Food chemistry*, 218, 165-172.

Wehbi, Z., Pérez, M.D., Sánchez, L. y Calvo, M. (2005). Effect of heat treatment on denaturation of bovine alfa-lactalbumin: determination of kinetic and thermodynamic parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9730-9736.

Xiang, P., Beardslee, T.A., Zeece, M.G., Markwell, J., and Sarath, G. (2002). Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope in soybean G1a and G2a and peanut *Ara h 3* glycinins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*., 408(1):51–57.

Xi, J., He, M., (2018). High hydrostatic pressure (HHP) effects on antigenicity and structural properties of soybean b-conglycinin. *Journal of Food Science and Technology*, 55(2):630–637

Zhang H, Li L, Tatsumi E, Kotwal S (2003) Influence of high pressure on Conformational changes of soybean glycinin. *Innovative Food and Science Emerging Technologies*, 4(3):269–275