



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Química Física Aplicada

**EFEECTO DE LA DESGLICOSILACIÓN
ENZIMÁTICA EN LA ANTIGENICIDAD DEL
ALÉRGENO
 β -CONGLICININA (7S GLOBULINA) DE SOJA**



Memoria para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados

Miryam Amigo Benavent

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)

Madrid, Septiembre 2007



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Química Física Aplicada

**EFFECTO DE LA DESGLICOSILACIÓN
ENZIMÁTICA EN LA ANTIGENICIDAD DEL
ALÉRGENO
 β -CONGLICININA (7S GLOBULINA) DE SOJA**

Memoria para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados

Miryam Amigo Benavent

Madrid, Septiembre 2007

Directoras: Dras. M^a Dolores del Castillo y Mar Villamiel

Tutora de la Universidad: Dra. Elena Ibáñez

M^a DOLORES DEL CASTILLO BILBAO, DRA. EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, CIENTÍFICA TITULAR DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC) Y MAR VILLAMIEL GUERRA, DRA EN FARMACIA, CIENTÍFICA TITULAR DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC), EN CALIDAD DE PROFESORAS RESPONSABLES DE LA ASIGNATURA DE DOCTORADO “Trabajos de investigación en Tecnología de alimentos” de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN: que el presente trabajo titulado: **“Efecto de la desglicosilación enzimática en la antigenicidad del alérgeno β -conglucina (7S globulina) de soja”** y que constituye la Memoria del trabajo Tutelado de Iniciación a la Investigación en el área de Tecnología de Alimentos que presenta **D^a. Miryam Amigo Benavent**, para obtener el correspondiente Diploma de Estudios Avanzados, ha sido realizada bajo nuestra supervisión en el Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC.

Y para que conste, firmamos el presente certificado en Madrid a 14 de Septiembre de 2007.

Dra. M^a Dolores del Castillo

Dra. Mar Villamiel

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a las Dras. M^a Dolores del Castillo y Mar Villamiel su confianza, apoyo, consejos y dedicación en la dirección de este trabajo. Su desarrollo ha sido posible gracias a la concesión de la beca FPI BES-2005-7628, del Ministerio de Educación y Ciencia.

He realizado este trabajo en el Instituto de Fermentaciones Industriales. Su Directora, la Dra. Lourdes Amigo, y su Gerente José Luis Andreu, me han permitido trabajar y aprender en sus instalaciones. También he contado con la plena dedicación de Beatriz Albelda e Inés López de la biblioteca.

Al Dr. Agustín Olano y a la Dra. Nieves Corzo les agradezco haber permitido que me integrara en su grupo de investigación, donde he recibido también el apoyo de los Dres. Antonia Montilla, Francisco Javier Moreno y Vasileios Athanasopoulos.

Por haber recuperado para mí el protocolo de tinción de glicoproteínas que tan buen resultado ha dado, estoy agradecida a la Dra. Encarnación Pueyo; y por darme dos glicoproteínas para poder comparar con la mía, al Dr. Adolfo Martínez y a la futura Dra. Yolanda Núñez. Por ser la tutora de este trabajo por parte de la Universidad Autónoma de Madrid a la Dra. Elena Ibáñez.

A los Dres. Ana Martín González y Juan Carlos Gutiérrez del Departamento de Microbiología III de la Universidad Complutense de Madrid, les debo mi primera oportunidad en un laboratorio, al permitirme solicitar con ellos la beca-colaboración que se me concedió durante mi último curso de Biología.

A la Dra. Ana Salomón de *Eurocatering Food Service* le agradezco haberme seleccionado, apoyado y creer en mí a la hora de montar el laboratorio de calidad microbiológica de la empresa. También le debo su amistad. Y a la Dra. María Fernández Lobato del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa por haberme rescatado de la empresa para la Ciencia.

A los compañeros de laboratorio que durante estos dos años en algún momento me han sufrido y hacen que desconecte cuando vamos a comer o a tomar café, Fernando, Jose, Alejandra, Cristina, Valle, Mari Luz, Marta, Kika, Coral, Diana, Noelia, Lourdes, Anna, Adolfo, Juan y Jürguen.

Agradezco por enviarme artículos relacionados con mis temas de estudio, ayudarme a usar las bases de datos y programas de referencias bibliográficas, además de por la tertulia en el café cuando no nos han separado las distancias al Dr. Carlos Benito Amat del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos.

A Rosi, Abel, Montse, Concha, María y Miguel por estar ahí cuando les he necesitado. A Marta, Esther, Ana, Ángeles y Sergio, por ser tan buenos compañeros de licenciatura. Y, por supuesto, a Gabriel y Cari, por ser mis compañeros de viaje.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: Sero Albúmina Bovina

CZE: Electroforesis capilar en zona libre

Da: Dalton

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSR: Desviación estándar relativa

DTT: Ditiotreitól

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

Fuc: Fucosa

GlcNAc: *N*-acetil-glucosamina

IEF: Isoelectroenfoque

Man: Manosa

Mr: Masa molecular relativa

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

PAS: Ácido peryódico y reactivo de Schiff

pI: Punto isoelectrico

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

TFA: Ácido trifluoroacético

UV: Ultravioleta

Xyl: Xilosa

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tablas	
Tabla 1. Composición nutricional de la soja y productos derivados.....	3
Tabla 2. Principales alérgenos descritos en soja.....	9
Tabla 3. Gradiente empleado para la separación por RP-HPLC de las proteínas.....	23
Tabla 4. Datos de antigenicidad obtenidos para la 7S globulina.....	45
Figuras	
Figura 1. Estructura tridimensional de la 7S globulina de la soja.....	4
Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la 7S globulina de la soja.....	5
Figura 3. Tipos de <i>N</i> - y <i>O</i> -glicanos.....	6
Figura 4. <i>N</i> -glicanos que conforman las proteínas de reserva de la soja.....	7
Figura 5. Mecanismo de reacción alérgica mediado por IgE.....	8
Figura 6. Mecanismo de acción de la PNGasa F.....	15
Figura 7. Estructura de <i>N</i> -glicanos resistentes a la actividad de la PNGasa F.....	15
Figura 8. Condiciones ensayadas para la precipitación isoelectrica selectiva de la fracción 7S globulina de soja.....	17
Figura 9. Esquema del protocolo del immunoblotting.....	24
Figura 10. Esquema del protocolo de optimización de las concentraciones de anticuerpo para el ELISA indirecto.....	25
Figura 11. Perfil electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturalizantes de la 7S globulina obtenida por precipitación isoelectrica.....	27
Figura 12. Perfiles electroforéticos en geles de tris-acetato y poliacrilamida en condiciones nativas.....	29
Figura 13. Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE de los distintos tiempos de incubación...	31
Figura 14. Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE de los distintas concentraciones de incubación ensayadas.....	33
Figura 15. Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE de ribonucleasa B, ovoalbúmina, invertasa, manoproteína y sus formas desglicosiladas.....	34
Figura 16. Estructura de los glicanos descritos para ovoalbúmina y ribonucleasa B.....	35
Figura 17. Perfiles electroforéticos en PAGE del IEF.....	37

Figura 18. Perfiles electroforéticos de la 7S globulina, manoproteína, invertasa y ovoalbúmina obtenidos por CZE.....	39
Figura 19. Cromatogramas de la 7S globulina y ovoalbúmina obtenidos por RP-HPLC.....	42
Figura 20. Immunoblotting de la 7S y sus productos de desglucosilación.....	44

ÍNDICE

1. Objetivos y plan de trabajo.....	1
2. Introducción:	
2.1 La soja y sus proteínas.....	2
2.2 Alergia a la soja.....	7
2.3 Estrategias seguidas para producir soja y productos relacionados hipoalergénicos.....	10
2.4 Papel de la cadena de carbohidratos presente en la estructura de la proteína en su alergenicidad.....	13
2.5 Estrategias para el estudio de glicoproteínas.....	14
3. Materiales y métodos:	
3.1 Aislamiento de la fracción 7S globulina de la soja.....	16
3.2 Caracterización de la fracción 7S.....	18
3.2.1 SDS-PAGE.....	18
3.2.2 Electroforesis en condiciones nativas.....	19
3.3 Ensayos de desglicosilación enzimática.....	20
3.3.1 Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida.....	21
3.3.2 CZE.....	22
3.3.3 RP-HPLC.....	22
3.4 Ensayos de antigenicidad.....	23
3.4.1 Immunoblotting.....	23
3.4.2 ELISA indirecto.....	24

4 Resultados y discusión:	
4.1 Selección del método de purificación de la 7S globulina.....	27
4.2 Efectividad del proceso de desglicosilación enzimática.....	31
4.2.1 Cinética de la reacción de desglicosilación.....	31
4.2.2 Estudio de la concentración de sustrato.....	32
4.2.3 Comparación con otras glicoproteínas.....	33
4.2.4 Isoelectroenfoque-PAGE.....	37
4.2.5 CZE.....	38
4.2.6 RP-HPLC.....	41
4.3 Antigenicidad de la 7S globulina y su forma desglicosilada.....	44
5. Conclusiones.....	46
Referencias bibliográficas.....	47
Páginas Web.....	51

1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Dado el creciente interés por la soja y los productos elaborados a base de soja, debido a sus probados efectos beneficiosos sobre la salud humana, es necesario el estudio de estrategias efectivas encaminadas a la reducción o eliminación de la potencial alergenicidad de estos alimentos. El papel del carbohidrato en la alergenicidad de las proteínas de soja no está suficientemente estudiado. El **objetivo general** de este trabajo ha sido la evaluación del papel de la cadena de carbohidratos presente en la estructura del alérgeno 7S globulina de la soja en su respuesta antigénica. Para la consecución de este objetivo se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

- Optimización de los procesos de purificación y desglicosilación enzimática con PNGasa F de la 7S globulina.
- Optimización de métodos cromatográficos y electroforéticos para la determinación del grado de desglicosilación.
- Puesta a punto de métodos inmunológicos para la determinación del grado de modificación de la respuesta antigénica de la 7S globulina vía desglicosilación.

Para llevar a cabo estos objetivos se desarrolló el siguiente **plan de trabajo**:

- Aislamiento del alérgeno 7S.
- Caracterización electroforética y cromatográfica de la 7S.
- Estudio de la actividad glicolítica de la enzima comercial PNGasa F.
- Desglicosilación enzimática de la 7S.
- Caracterización de los productos de desglicosilación enzimática.
- Determinación de la actividad antigénica de la 7S y sus productos de desglicosilación enzimática.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La soja y sus proteínas

La soja (*Glycine max* L.), también denominada "soya", es una legumbre procedente del sureste asiático, concretamente de China y Corea. La soja es un alimento muy completo y nutritivo, y junto con el altramuz, constituye la legumbre seca de mayor valor energético. Su elevado contenido en proteínas, superior al de la carne, hace de la soja una fuente proteica vegetal de gran interés dietético y nutricional. Su demanda en nuestro país va en aumento, debido a sus propiedades nutritivas y beneficiosas para la salud. La soja se ha convertido en un componente omnipresente en infinidad de alimentos dado que se considera como lo más parecido al alimento completo ideal. Este alimento constituye una alternativa nutricional para personas que presentan alergia a las proteínas lácteas (Golbitz y Jordan, 2006).

La soja, desde el punto de vista tecnológico, destaca por su versatilidad. Las propiedades funcionales tecnológicas más importantes que se atribuyen a las proteínas de la soja en alimentación son: a) capacidad de retención de agua que proporciona viscosidad; b) capacidad de formar geles debido a interacciones proteína-proteína; c) propiedades interfaciales que les confiere capacidad espumante y emulsionante (García y col., 1997). A partir de las proteínas de soja se pueden producir barritas energéticas, productos alternativos a la carne, bebidas nutricionales, pasta enriquecida, productos alternativos al queso, salsas y postres de soja, entre muchos otros (Golbitz y Jordan, 2006).

A la soja se le atribuyen efectos beneficiosos para la salud tales como la reducción del colesterol y triglicéridos (Takamatsu y col., 2004; Duranti y col., 2004; Torres y col., 2006), actividad antioxidante (Friedman y Brandon, 2001) y anticancerígena y se recomienda para el control de la obesidad porque contiene inhibidor de la α -amilasa que reduce la absorción de carbohidratos (Duranti, 2006). Sin embargo, la soja presenta escasa digestibilidad, causada por los inhibidores de tripsina Bowman-Birk y Kunitz (antinutrientes), y potencial alergenicidad, siendo las proteínas las principales responsables de la misma. Con el tratamiento térmico empleado para alargar la vida útil de los productos de soja, generalmente, los antinutrientes pueden ser destruidos de una manera efectiva. Sin embargo, en la actualidad se siguen buscando estrategias efectivas encaminadas a la reducción o eliminación de su alergenicidad.

La composición global de la soja y algunos de sus derivados puede observarse en la **Tabla 1**. La soja está constituida por entre un 48 y 50% de proteínas, 20% de lípidos y 4-10% de agua, minerales, vitaminas y otros componentes minoritarios entre los que se incluyen inhibidores de proteasas, compuestos fenólicos, lectinas, saponinas y fitato, etc. (García y col., 1997).

Tabla 1. Composición nutricional de la soja y algunos de sus derivados.

Producto	Energía (kcal/100g)	Humedad (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lípidos (g/100g)	Carbohidratos (g/100g)	Minerales (g/100g)
Semillas de soja ¹	327	8,49	37,6	18,3	6,29	4,69
Batido fermentado de soja ²	82,4	85,9	5	5,2	3,9	-
Aislado de proteínas de soja ³	388	5,9	79,1	3,0	7,5	4,50
Harina de soja ¹	370	9,10	37,30	20,60	3,10	4,40
Leche de soja ¹	52	88,7	3,50	1,84	5,76	0,48
Tofu ¹	83	84,6	8,84	4,78	1,88	0,72
Brotos de soja ¹	50	85,6	6,05	1,03	4,68	0,80

Tomado de: (1) Souci y col., 2000; (2) Ortega Anta y col., 2004; y (3) Ogawa, 2006.

Entre el 80 y el 90% del total de las proteínas de soja son proteínas de reserva, siendo las mayoritarias **glicinina** (40%), **β -conglucina** (28%) y **γ -conglucina** (3%). Atendiendo al método de separación de proteínas vegetales por ultracentrifugación a pH 7,6 y fuerza iónica de 0,5 M pueden también clasificarse como fracciones **11S** (glicinina) y **7S** (β -conglucina y γ -conglucina), **2S**, **9S** y **15S**, siendo estas tres últimas componentes minoritarias de la fracción proteica de la soja (Brooks y Morr, 1985).

La globulina 11S o glicinina estructuralmente está formada por dos hexámeros unidos por puentes disulfuro, un total de 12 subunidades con una masa molecular de entre 320-360 kDa y una estructura cuaternaria muy compleja. En cada hexámero, entre un 45 y 50% de las subunidades tienen naturaleza ácida (37-40 kDa) y entre el 50 y 55% naturaleza básica (18-20 kDa). Se sabe que pueden formar al menos siete estructuras distintas combinando unas con otras. Son capaces de agregarse y formar polímeros de mayor masa molecular y disociarse en subunidades más pequeñas (García y col., 1997).

La 7S globulina o β -conglucina es una glicoproteína compuesta por un trímero de masa molecular 150-210 kDa con tres subunidades: α (57-76 kDa), α' (57-83 kDa) y β (42- 53 kDa).

En algunas variedades de soja también se ha descrito una subunidad β' (L'Hocine y Boye, 2007). A diferencia de la globulina 11S no posee puentes disulfuro y posee bajo contenido en aminoácidos azufrados y triptófano (Derbyshire y col., 1976). Es una proteína que puede presentar fenómenos de asociación-disociación y dimerizar a 9S globulina a fuerza iónica de 0,1 M (García y col. 1997). La estructura tridimensional de esta proteína se muestra en la **Figura 1** y la secuencia aminoacídica de las distintas subunidades en la **Figura 2**. Además es muy heterogénea en cuanto a la composición del trímero y se ha visto que es capaz de formar trímeros de: $\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha'$, $\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha'\beta$, $\alpha\beta\beta$ y $\alpha'\beta\beta$ (L'Hocine y Boye, 2007).

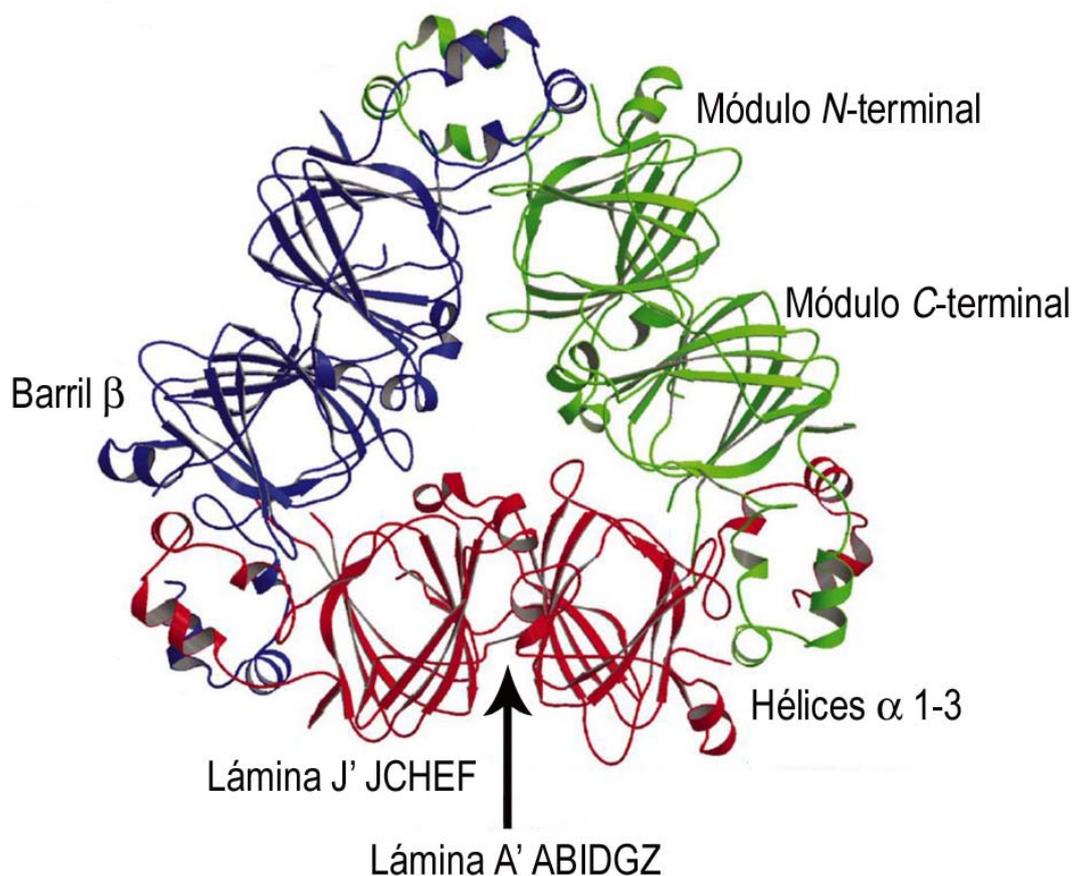


Figura 1. Representación en tres dimensiones de la 7S globulina. En distintos colores se pueden observar los tres monómeros que la constituyen, cada monómero se divide en dos módulos, y cada uno tiene un barril β y se extiende hasta formar distintas hélices α . Cada barril contiene una lámina β mayor formada por los residuos A'ABIDGZ y una lámina β menor constituida por J'JCHEF. Modificado de: Maruyama y col. (2004).

Fragmento del precursor de la subunidad α'

MMRARFPLLL LGVVFLASVS VSFGIAYWEK QNPSHNKCLR SCNSEKDSYR NQACHARCNL
 LKVEEEEECE EGQIPRPRPQ HPERERQQHG EKEEDEGEQP RPFPPRPRPQ PHQEEEHEQK
 EEHEWHRKEE KHGGKGSEEE QDEREHRPH QPHQKEEEKH EWQHKQEKHQ GKESEEEEEED
 QDEDEEQDKE SQESEGESQ REPRRHKNKN PFHFNSKRFQ TLFKNQYGHV RVLQRFNKRS
 QQLQNLRDYR ILEFNSKPNT LLLPHHADAD YLIVILNGTA ILTLVNDDR DSYNLQSGDA
 LRPAGTTFY VVNPNDENL RMIAGTTFYV VNPNDENLR MITLAIPVNK PGRFESFLLS
 STQAQQSYLQ GFSKNILEAS YDTKFEEINK VLFGREEGQQ QGEERLQESV IVEISKKQIR
 ELSKHAKSSS RKTISSEDKP FNLGSRDIY SNKLGKLEI TQRNPQLRDL DVFLSVVDMN
 EGALFLPHFN SKAIVLVIN EGEANIELVG IKEQQQRQQQ EEQPLEVRKY RAELSEQDIF
 VIPAGYPMV NATSDLNFFA FGINAENNQR NFLAGSKDNV ISQIPSQVQE LAFPRSAKDI
 ENLIKSQSES YFVDAQPQQK EEGNKGRKGP LSSILRAFY

Fragmento de la subunidad α'

VEKEECEEGE IPRPRPRPQH PEREPQQPGE KEEDEDEQPR PIPFPRPQR QEEEEHEQREE
 QEWPKEEKR GEKGSEEEDE DEDEEQDERQ PPFPRPPHQK EERKQEEDED EEQQRESEES
 EDSELRRHKN KNPFLFGSNR FETLFKNQYG RIRVLQRFNQ RSPQLQNLRD YRILEFNSKP
 NTLNPNHAD ADYLIVILNG TAILSLVND DRDSYRLQSG DALRVPSGTT YVNPNDNE
 NLRLITLAIP VNKGRFESF FLSSTEAQQS YLQGFNRNIL EASYDTKFEE INKVLFSREE
 GQQQGEQLRQ ESVIVEISKE QIRALSKRAK SSSRKTISSE DKPFNLRSRD PIYSNKLKGF
 FEITPEKNPQ LRDLDIFLSI VDMNEGALLL PHFNKAIVI LVINEGDANI ELVGLKEQQQ
 EQQEEQPLE VRKYRAELSE QDIFVIPAGY PVVNATSNL NFFAIGINAE NNQRNFLAGS
 QDNVISQIPS QVQELAFPGS AQAVEKLLKN QRESYFVDAQ PPKKEEGNKG RKGPLSSILR
 AFY

Fragmento de la subunidad β

LKVREDENNP FYFRSSNSFQ TLFENQNGRI RLLQRFNKRS PQLENLRDYR IVQFQSKPNT
 ILLPHHADAD FLLFVLSGRA ILTLVNDDR DSYNLHPGDA QRIPAGTTYV LVNPHDHQNL
 KIIKLAIPVN KPGRYDDFFL SSTQAQQSYL QGFSHNILET SFHSEFEEIN RVLFGEEEEQ
 RQEGVIVEL SKEQIRQLSR RAKSSSRKTI SSEDEPFNLR SRNPIYSNNF GKFFEITPEK
 NPQLRDLIF LSSVDINEGA LLLPHFNKA IVLVINEGD ANIELVGIKE QQKQKQEEE
 PLEVQRYRAE LSEDDVFVIP AAYPFVFNAT SNLNFLAFGI NAENNQRNFL AGEKDNVVRQ
 IERQVQELAF PGSAQDVERL LKKQRESYFV DAQPQQKEEG SKGRKGPFP ILGALY

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la globulina 7S de soja. En azul se marcan los posibles lugares de glicosilación teniendo en cuenta la región Asn-X_{aa}-Ser/Thr. Tomado de: <http://foodallergens.ifr.ac.uk>.

Las glicoproteínas se forman por glicosilación enzimática post-traduccional de las proteínas, y la parte de carbohidrato, denominada glicano puede clasificarse, según su enlace, en **O-glicosídicos** (unión del carbohidrato con el grupo hidroxilo de una serina o treonina) y **N-glicosídicos** (unión del carbohidrato con el grupo amida de una asparagina) (Kobata, 1992). La estructura básica de N y O-glicanos puede verse en la **Figura 3**; a estas estructuras se les pueden unir enzimáticamente más carbohidratos alargando la cadena.

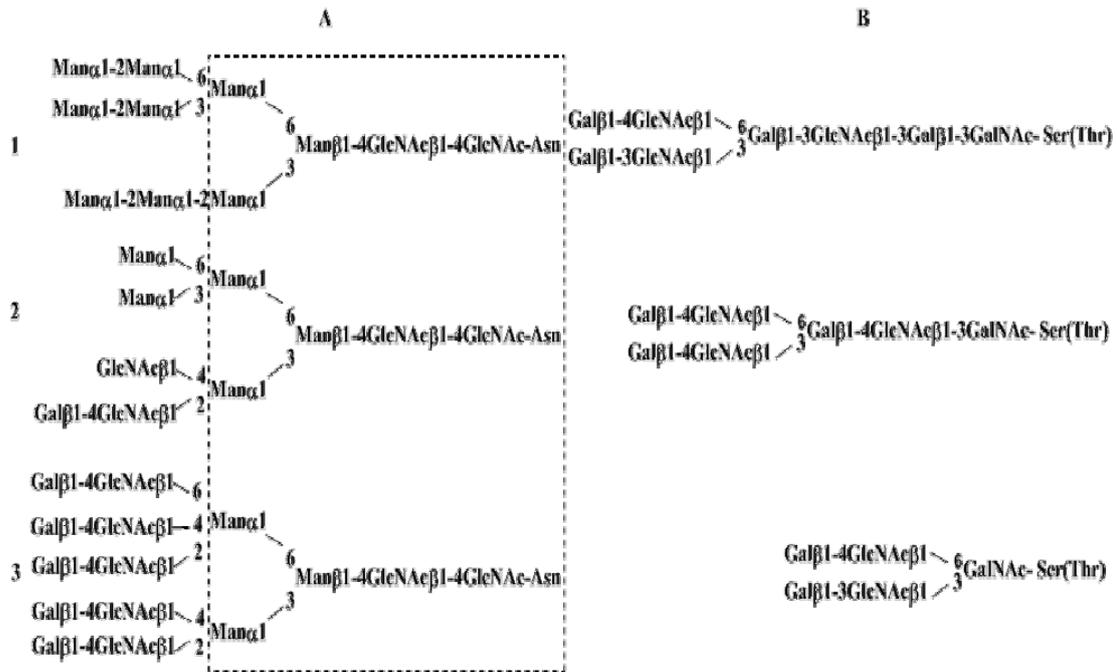


Figura 3. Tipos de N-glicanos (A): de alto contenido en manosa (1), híbrido (2) y complejo (3) y O-glicanos (B).

La **Figura 4** muestra la estructura de los glicanos descritos hasta la fecha como constituyentes de las glicoproteína de la soja según Kimura y col. (1997). Todos ellos son de tipo N-glicano mayoritariamente, con alto contenido en manosa (A-F) y una minoría que contiene xilosa y fucosa (G y H). Las subunidades de la globulina 7S se sintetizan en el retículo endoplásmico como α , α' y β y son cotraduccionalmente glicosiladas en el residuo de asparagina contenido en la secuencia Asn- X_{aa} -Ser/Thr, donde X_{aa} puede ser cualquier aa menos prolina, dando lugar a las subunidades maduras. Las subunidades α y α' tienen dos secuencias consenso de N-glicosilación, mientras que la subunidad β sólo posee uno (Maruyama y col., 1998).

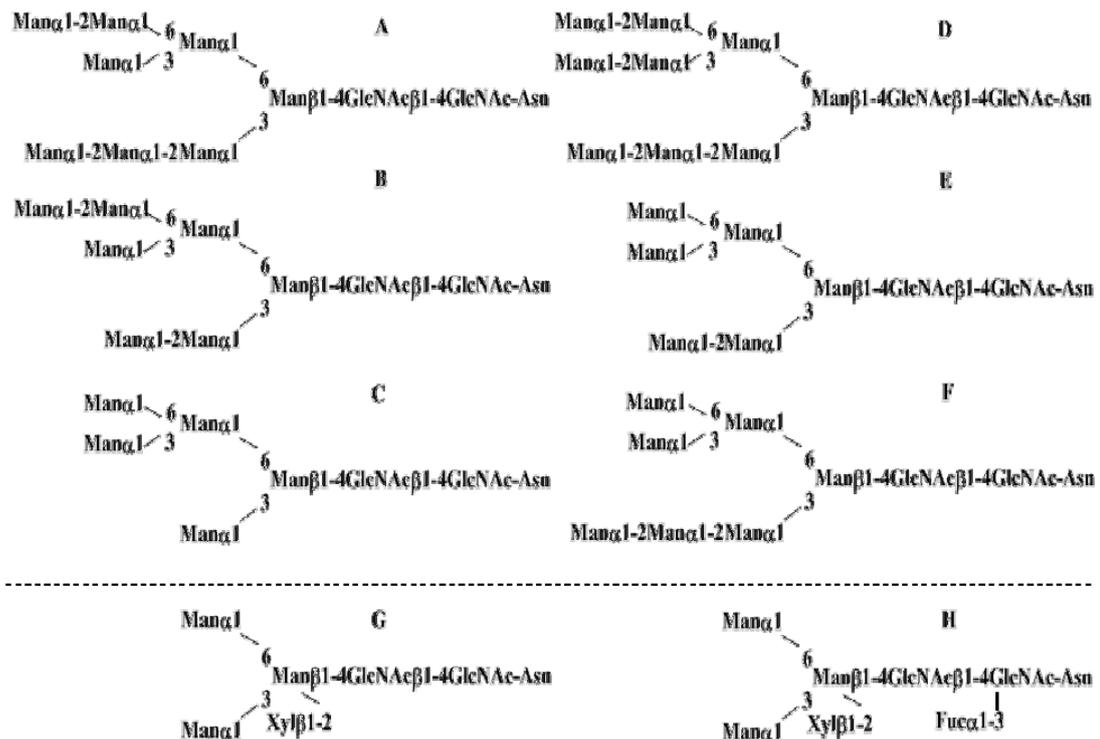


Figura 4. *N*-glicanos descritos para las proteínas de reserva de la soja (Kimura y col., 1997).

2.2 Alergia a la soja

Una alergia es una respuesta anormal y exagerada por parte del sistema inmunológico, que identifica una sustancia inicialmente inocua; generalmente, una proteína o glicoproteína, como una amenaza para el organismo. La alergia alimentaria implica la reacción del antígeno (proteína o glicoproteína) con los anticuerpos producidos frente a él por el sistema inmunológico; generalmente, las inmunoglobulinas E (IgE) (**Figura 5**). La región por la que las IgE reconocen al antígeno se denomina epítipo. El resultado de esta respuesta inmunológica es la unión de las IgE con los mastocitos (células del sistema inmunológico) provocando la liberación de sustancias como la histamina y la aparición de los síntomas de la alergia, que pueden ser gastrointestinales, respiratorios, dermatológicos y otros más graves como la anafilaxis pudiendo en algunos casos llegar a producir la muerte (Lessof, 1998).

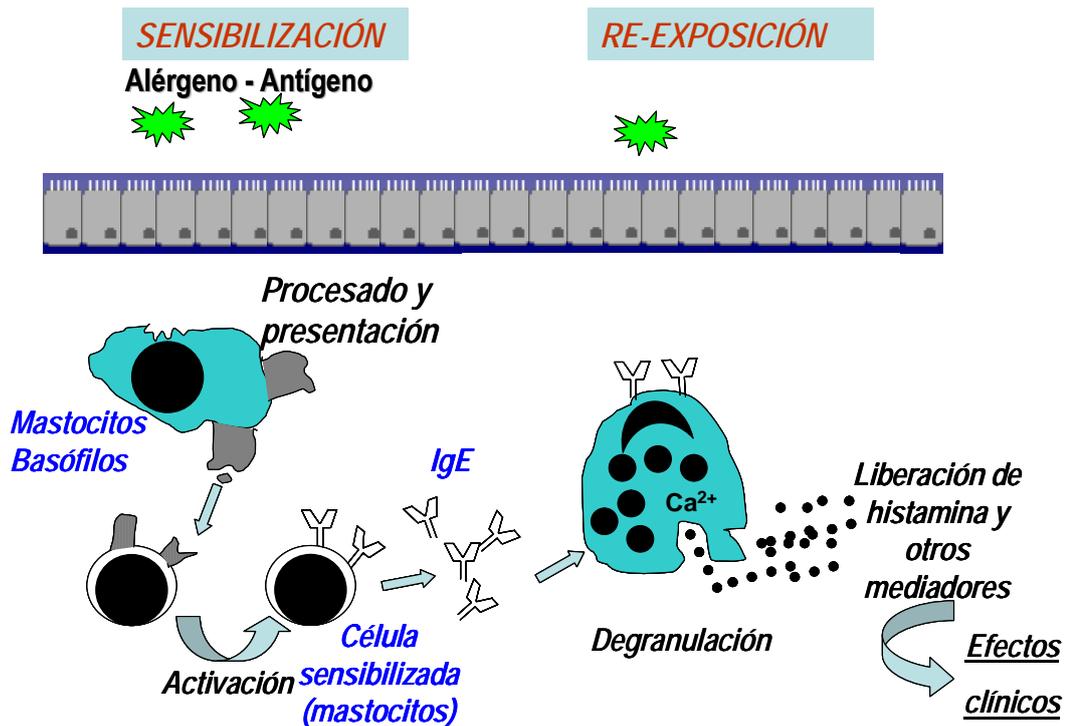


Figura 5. Mecanismo de reacción alérgica mediado por IgE.

La soja es considerada uno de los ocho alimentos más alergénicos por la FAO (1995), junto con huevos, leche, pescado, marisco, trigo, cacahuetes y arroz. Se sabe que la sensibilización a este alimento se produce mayoritariamente por el tracto gastrointestinal, y en menor grado, por las vías respiratorias y contacto con la piel (Ogawa, 2006). Aunque puede parecer que su consumo es minoritario, las proteínas de soja se emplean como ingredientes en la elaboración de alimentos tradicionales como embutidos, hamburguesas, salchichas, alimentos infantiles, harina para pasta, yogures y salsas. De hecho en un estudio realizado en Suiza por Foucard e Yman (1999) se describe a la soja contenida en hamburguesas, como alérgeno de reacción cruzada, es decir agente causante de alergia por su estrecha relación filogenética con otro alérgeno. En este caso se pensó en algún epítipo en común con el cacahuete, que podría desencadenar los síntomas de la alergia sin que haya habido proceso previo de sensibilización.

La **Tabla 2** resume las proteínas que han sido descritas como alérgenos fundamentales de la soja. Tal como puede observarse, algunos aspectos aún son desconocidos y deben seguir siendo estudiados.

Tabla 2. Principales alérgenos descritos en soja (Wilson y col., 2005; L'Hocine y Boyle, 2007; y <http://foodallergens.ifr.ac.uk/>).

Alérgeno	Designación	Familia de alérgenos	Epítomos descritos	Estabilidad
2S albúmina	Menor	Prolaminas	NC ^{a)}	Termoestable y resistente a la proteólisis por puentes disulfuro
β -conglucina o 7S globulina	ND ^{b)}	Cupinas	Subunidad α péptido YVVN en la región 232-383	Termoestable, requiere temperaturas por encima de 75°C para desnaturalizarla y sólo pierde parcialmente la estructura secundaria y terciaria. Resistente a la proteólisis.
Gly m 1a	ND ^{b)}	ND ^{b)}	aeroalérgeno	Destruído por tratamiento térmico
Gly m 1 b	ND ^{b)}	ND ^{b)}	aeroalérgeno	Destruído por tratamiento térmico
Gly m 2	ND ^{b)}	ND ^{b)}	ND ^{b)}	Destruído por tratamiento térmico
Gly m 3	ND ^{b)}	Profilinas	Conformacionales cuando se encuentra toda la secuencia	NC ^{a)}
Gly m 4	ND ^{b)}	Bet v 1	NC ^{a)}	Tras cocinado de 30 minutos se reduce y en 4 h no es detectable. Tampoco se detecta en soja tostada ni en productos altamente fermentados como salsa de soja o miso.
Gly m Bd 28 K	Mayor	Cupinas	Anticuerpo Ig E de alérgicos reconocen los N-glicanos unidos a la Asn ²⁰ Epítomo lineal entre los residuos S256 y A270.	NC ^{a)}
Gly m Bd 30 K o P34	Mayor	Cistein-proteasa	5 epítomos descritos: 3-12 FLVLLLFSL, 100-110 PQEFSKITYQ, 229-238 RCKANKIQDK, 299-308 INHFVLLVGY y 331-340 GYIWIQRNTG	NC ^{a)}
Glicina u 11S globulina	Mayor	11S supinas	En las subunidades ácidas de la proteína	Termoestable, requiere temperaturas por encima de 95°C para desnaturalizarla y forma agregados quedando mucha estructura secundaria intacta. Proteólisis con tripsina y quimotripsina forma agregados muy estables.
Inhibidor de la tripsina Kunitz	Menor	Inhibidores de proteasas	NC ^{a)}	Destruído por tratamiento térmico
Aglutinina (lectina)	ND ^{b)}	ND ^{b)}	ND ^{b)}	Destruído por tratamiento térmico

a) No conocido.

b) No descrito

Entre los alérgenos de soja descritos cabe destacar Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28 K, Gly m Bd 60K, ya que forman parte o están asociadas a la 7S globulina y son reconocidas por las IgE de plasma de pacientes alérgicos a la soja (Ogawa, 2006). A continuación se describen sus características más importantes:

Gly m Bd 30K fue aislada y caracterizada como proteína asociada al cuerpo graso en semillas de soja. Tiene una masa molecular de 34 kDa, por lo que también se conoce como P34, es una glicoproteína y en su Asn¹⁷⁰ posee un *N*-glicano que contiene manosa, *N*-acetilglucosamina, xilosa y fucosa en una proporción molecular de 3:2:1:1. Esta proteína se encuentra asociada a la 7S globulina a través de un puente disulfuro (Ogawa, 2006). Los 5 epítomos hasta ahora descritos se cree que son conformacionales y se desconoce si posee también epítomos lineales (L'Hocine y Boye, 2007).

Gly m Bd 28K fue aislada y caracterizada a partir de la fracción 7S globulina (Tsuji y col., 1997). El alérgeno purificado es una glicoproteína con una masa molecular de 26 kDa y un punto isoeléctrico de 6,1. Un *N*-glicano con la misma composición que Gly m Bd 30 unido a la Asn²⁰. Hiemori y col. (2000) observaron que los anticuerpos de pacientes alérgicos a la soja se unían a este glicano lo que podría indicar que el carbohidrato está relacionado con su alergenicidad.

Gly m Bd 60K (Subunidad α de la 7S globulina) es reconocido por el suero del 25% de los pacientes alérgicos a la soja (Ogawa y col., 1995). Las características estructurales han sido ya descritas en el apartado soja y sus proteínas, también se sabe que tiene un punto isoeléctrico de 4,9 (Thanh y Shibasaki, 1977).

2.3 Estrategias seguidas para reducir la alergenicidad de la soja

Las estrategias seguidas hasta ahora para reducir la alergenicidad de las proteínas de soja y obtener alimentos hipoalergénicos a base de soja son las siguientes:

- **Mutación y Selección molecular.** Con estas técnicas se persigue eliminar los tres principales alérgenos (Gly m Bd 60K, 30K y 28K). Mediante este procedimiento se consiguió una variedad de soja, denominada *Glycine max* Tohoku 124, carente de las subunidades α y α' de la β -conglucina por mutación con irradiación con rayos γ (Takahashi y col., 1994) que resultó

hipoalergénica para el 80% de los pacientes alérgicos a soja natural; sin embargo, estas proteínas carecen de capacidad formadora de geles.

- **Tratamiento térmico.** Shibasaki y col. (1980) sometieron distintas fracciones de soja cruda a tratamientos térmicos de entre 80 y 120°C durante un tiempo de 60 min, y observaron que la fracción 2S aumentaba la antigenicidad, mientras que en otras fracciones reducían su antigenicidad entre un 40 y 75% con respecto al producto sin tratar. Burks y col. (1992) sin embargo, no encontraron cambios en cuanto a la antigenicidad con el método de inhibición de ensayo inmunoenzimático *in vitro* (EAST) con tratamientos similares. Los resultados contradictorios pueden explicarse por la naturaleza y estructura de las proteínas que pueden verse afectadas por las variables tiempo y temperatura de los tratamientos aplicados (L'Hocine y Boye, 2007). El calentamiento produce la desnaturalización proteica y es responsable de la reducción de los antinutrientes (inhibidores de proteasas) de la soja. Es una estrategia de fácil aplicación en la industria alimentaria que aumenta la digestibilidad de la soja, pero si el epítipo es lineal puede no observarse disminución de la alergenicidad o incluso mostrar epítopos lineales que estaban enmascarados con las estructuras terciarias o cuaternarias.

- **Fermentación.** Productos tradicionalmente obtenidos por fermentación de soja tales como salsa, miso, tempeh y brotes de soja son productos potencialmente hipoalergénicos, ya que las proteínas están parcialmente hidrolizadas. La fermentación ha sido descrita como una de las técnicas más efectivas para reducir la alergenicidad de la soja. Sin embargo, paralelamente ocurren cambios en las propiedades tecnológicas y sensoriales de este alimento. Yamanishi y col. (1995) sometieron a soja tratada bajo condiciones de esterilización en autoclave a fermentación con *Bacillus natto* durante 24 h. Tras este tratamiento se obtuvieron péptidos con un tamaño molecular inferior a 10 kDa no identificables por anticuerpos de alérgicos a soja.

- **Proteólisis enzimática.** Como consecuencia de la proteólisis se consigue eliminar epítopos de los alérgenos y reducción de la alergenicidad. Yamanishi y col. (1995) trataron soja con proteasas de *Bacillus* sp. a 37°C durante 20 h y analizaron por inmunoblotting y ELISA las proteínas, no obteniendo detección del antígeno Gly m Bd 30K por parte de anticuerpos de pacientes alérgicos a la soja. Basándose en la diferencia de temperatura de desnaturalización entre los dos principales alérgenos 7S y 11S globulinas, Tsumura y col. (2004) ensayaron condiciones de hidrólisis selectivas efectivas para Gly m Bd 28K, Gly m Bd 30K y 7S globulina, permaneciendo la propiedad de formar gel de la 11S globulina. Peñas y col. (2006a)

combinaron hidrólisis con las enzimas Alcalasa y Corolasa 7089, entre otras, con tratamientos con altas presiones obteniendo una reducción en la antigenicidad del alérgeno Gly m 1, resultados que más tarde se comprobaron con anticuerpos de niños alérgicos a la soja (Peñas y col. 2006b).

- **Conjugación con carbohidratos.** La unión de galactomananos vía reacción de Maillard a proteínas de soja, parece ser una buena alternativa, ya que se ha visto por SDS-PAGE seguido de immunoblotting, la no detección de bandas indicando que las IgE no los reconoce, además los productos así formados mejoran su solubilidad, estabilidad térmica y propiedades emulsificantes (Babiker y col., 1998). También se ha visto una reducción de la antigenicidad al conjugarlas con quitosanos (Usui y col., 2004) y fructooligosacáridos (van de Lagemmaat y col., 2007).

- **Modificación de la expresión genética:** Se ha realizado en distintos cultivos de soja mediante silenciamiento de la expresión de los genes que codifican para el alérgeno Gly m Bd 30K (Herman y col, 2003).

- **Extrusión:** Calentamiento, presión mecánica y tratamiento a pH ácidos (4,5) de las proteínas de soja, se han llevado a cabo con éxito eliminando el alérgeno Gly m Bd 30K, aunque no han eliminado otros alérgenos como la 11S globulina (Frank y col., 2002). Más estudios son necesarios en esta dirección dado que estas proteínas pueden seguir empleándose como emulsionantes en carnes.

De todos estos tratamientos los que han demostrado ser más efectivos en la reducción de la alergenicidad de las proteínas de soja son fermentación, proteólisis enzimática y extrusión; sin embargo, paralelamente podría también modificarse propiedades tecnológicas y sensoriales de estas proteínas (Wilson y col, 2005). La conjugación con carbohidratos podría simultáneamente disminuir la alergenicidad y mejorar las propiedades funcionales.

2.4 Implicación de la cadena de carbohidratos presente en la estructura de las glicoproteínas en su alergenicidad

Los glicanos presentes en las glicoproteínas pueden tener varias funciones físico-químicas como son: modificar la solubilidad, carga eléctrica, masa, tamaño, viscosidad, ayudar al plegamiento de la cadena polipeptídica, estabilizar la conformación de la proteína, proporcionar estabilización térmica y protección frente a proteólisis, entre otras (Lis y Sharon, 1993). Uno de los papeles que muchos autores también atribuyen a los glicanos es la de contribuir a la antigenicidad, en concreto la presencia en la cadena de carbohidrato de una manosa con enlace α (1,3)-fucosa o β (1,2)-xilosa en glicoproteínas de plantas o invertebrados (García-Cansado y col. 1996). Esto es debido a que los mamíferos no presentan en sus glicoproteínas glicanos con estas estructuras.

Aalberse y col. (1981) mostraron que la oxidación con periodato hacía que las IgE de varios pacientes alérgicos no reconocieran a distintos alérgenos alimentarios y de insectos, pero esta oxidación también puede eliminar epítomos en las parte proteica. Más tarde, y por otros métodos de desglicosilación química y enzimática que no destruyen las proteína, se demostró el reconocimiento de la cadena de carbohidratos por parte de anticuerpos. El primero fue con la glicoproteína fosfolipasa A de abeja (Weber y col., 1987). Posteriormente, muchos otros han establecido esta relación con las glicoproteínas: Ole e 1 del olivo (Batanero y col., 1999), bromelina de piña, β -fructosidasa de zanahoria, peroxidasa BP1 de malta (Fötisch y Vieths, 2001); "t-Germin" de trigo y "t-GLP" de *Arabidopsis thaliana* (Jensen-Jarolim y col., 2002); nLyc e 2 de tomate (Foetisch y col., 2003) y Cit s 1 de la naranja (Ahrazem y col., 2006).

Babiker y col. (2000) clonaron en *Escherichia coli* el alérgeno Gly m Bd 30K de la soja, cuya expresión resulta la forma no glicosilada de esta proteína, la purificaron y realizaron immunoblotting frente a anticuerpos procedentes de conejo, ratón y humanos alérgicos a la soja observando que no había diferencias significativas entre la proteína sin glicosilar y glicosilada, concluyendo que el carbohidrato no estaba implicado en la alergenicidad. Hiemori y col. (2000) estudiaron la alergenicidad del alérgeno Gly m Bd 28K de soja y su forma desglicosilada enzimáticamente con la enzima PNGasa A con anticuerpos procedentes de pacientes alérgicos a la soja, vieron que al desglicosilarla la proteína no era reconocida por los anticuerpos, sugiriendo que el glicano con estructura β 1-2 xilosa y α 1-3 fucosa unido a la proteína en su Asn²⁰ era el responsable de la alergenicidad. Muy recientemente, Fu y col. (2007) aislaron y purificaron la 7S

globulina de la soja y asignaron por immunoblotting la subunidad α como principal alérgeno en cerdos jóvenes. Desglicosilaron dicha subunidad y los resultados obtenidos indicaron que el carbohidrato en el caso de este alérgeno no tienen relación con la alergenicidad en esta especie animal.

2.5 Estrategias para el estudio de las glicoproteínas

Las técnicas que se emplean para el estudio de las glicoproteínas van encaminadas al estudio de la parte de carbohidrato por un lado y del péptido o la proteína por otro, se basan en la desglicosilación, ya sea química o enzimática.

Los métodos de **desglicosilación química** más utilizados son: hidrólisis con trifluorometanosulfónico (TFMS), que rompe el enlace entre el carbohidrato y la cadena polipeptídica; y oxidación de los carbohidratos con ácido periódico. Ambos tratamientos pueden dañar a la cadena peptídica modificando el antígeno, lo que debe tenerse en cuenta a la hora de realizar estudios de antigenicidad con estas técnicas.

Los métodos de **desglicosilación enzimática** son más convenientes porque apenas producen alteración en la cadena polipeptídica y son más adecuados desde el punto de vista alimentario, ya que el empleo de reactivos químicos puede requerir la eliminación de los mismos antes de la utilización de estas proteínas como ingredientes. Se dispone de: endoglicosidasas, que reconocen distintos sustratos en función de la composición de carbohidratos y los libera; PNGasa A que hidroliza el enlace *N*-glicosídico del glicano con la proteína, pero es muy inestable y, aunque en principio libera todos, en la práctica hay glicoproteínas que se resisten a su hidrólisis; y PNGasa F (Rodríguez y Villalba, 1997), enzima que se seleccionó para llevar a cabo este estudio.

La enzima péptido-N-(acetil- β -glucosaminil)-asparagina amidasa F (E. C. 3.5.1.52) también conocida como PNGasa F, *N*-glicanasa o *N*-glicosidasa F, rompe los enlaces formados por el nitrógeno de la cadena lateral de la asparagina y oligosacáridos complejos, híbridos o ricos en manosa mediante el mecanismo de acción que puede observarse en la **Figura 6**.

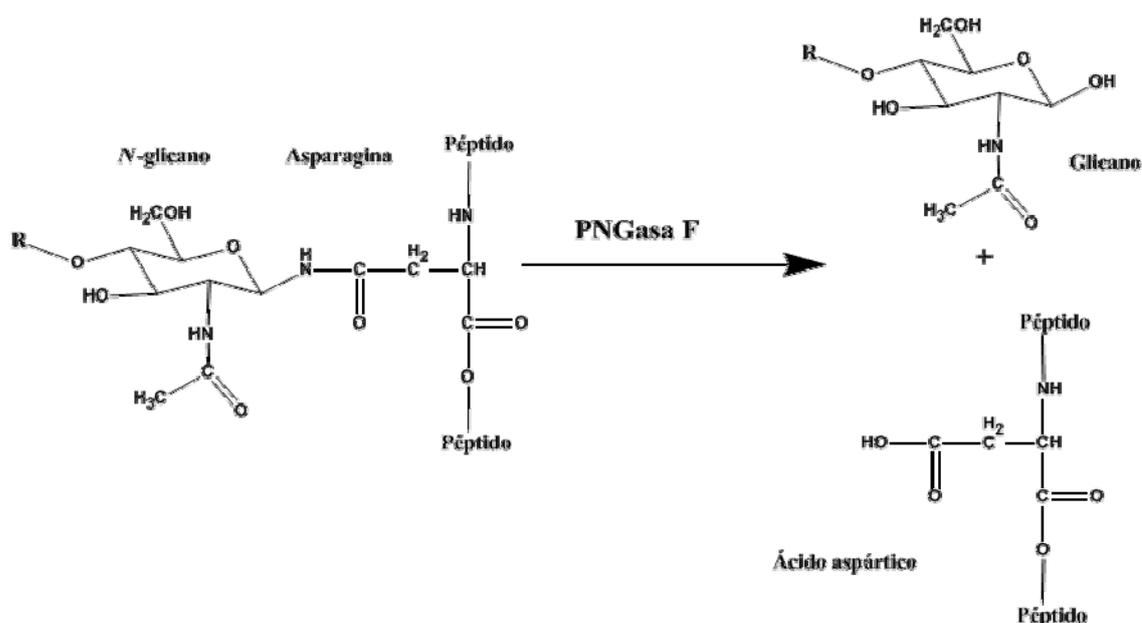


Figura 6. Reacción de desglicosilación de la PNGasa F.

Esta enzima hidroliza los enlaces formados por el nitrógeno de la cadena lateral de la asparagina y oligosacáridos complejos, híbridos o ricos en manosa exceptuando aquéllos que están constituidos por glicanos $\alpha(1\rightarrow3)$ fucosilado (Tarentino y Plumier, 1994; Fan y Lee, 1997) (**Figura 7**). La enzima es inactiva en residuos de asparagina glicosilados localizados en el extremo terminal de la cadena peptídica. Por actividad de la PNGasa F produce la liberación del glicano y la desaminación de asparagina a ácido aspártico.

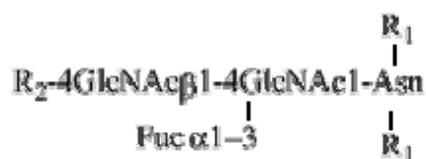


Figura 7. Estructura de glicoproteína resistente a la actividad de la PNGasa F. Donde R₁ son otros aminoácidos de la cadena polipeptídica y R₂ es un hidrógeno o distintos carbohidratos.

La enzima PNGasa F (Mr~36 kDa) presenta pH óptimo de 8,6; siendo activa en un rango de pH de 6-10. La temperatura óptima de esta desglicosidasa es de 37°C.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento de la fracción 7S globulina de la soja

La fracción 7S globulina se obtuvo por precipitación isoeléctrica selectiva (Nagano y col., 1992; Deak y col., 2007) a partir de un aislado de proteínas de soja comercial de 90% de pureza (Manuel Riesgo S. A.). Las condiciones ensayadas se resumen esquemáticamente en la **Figura 8**. Las variaciones de pH requeridas se realizaron empleando disoluciones de NaOH y HCl 2M, respectivamente. El precipitado de proteínas resultante se lavó dos veces con agua bidestilada y seguidamente se liofilizó. El procedimiento se llevó a cabo por triplicado. El rendimiento de las fracciones obtenidas se calculó por pesada, de las fracciones liofilizadas.

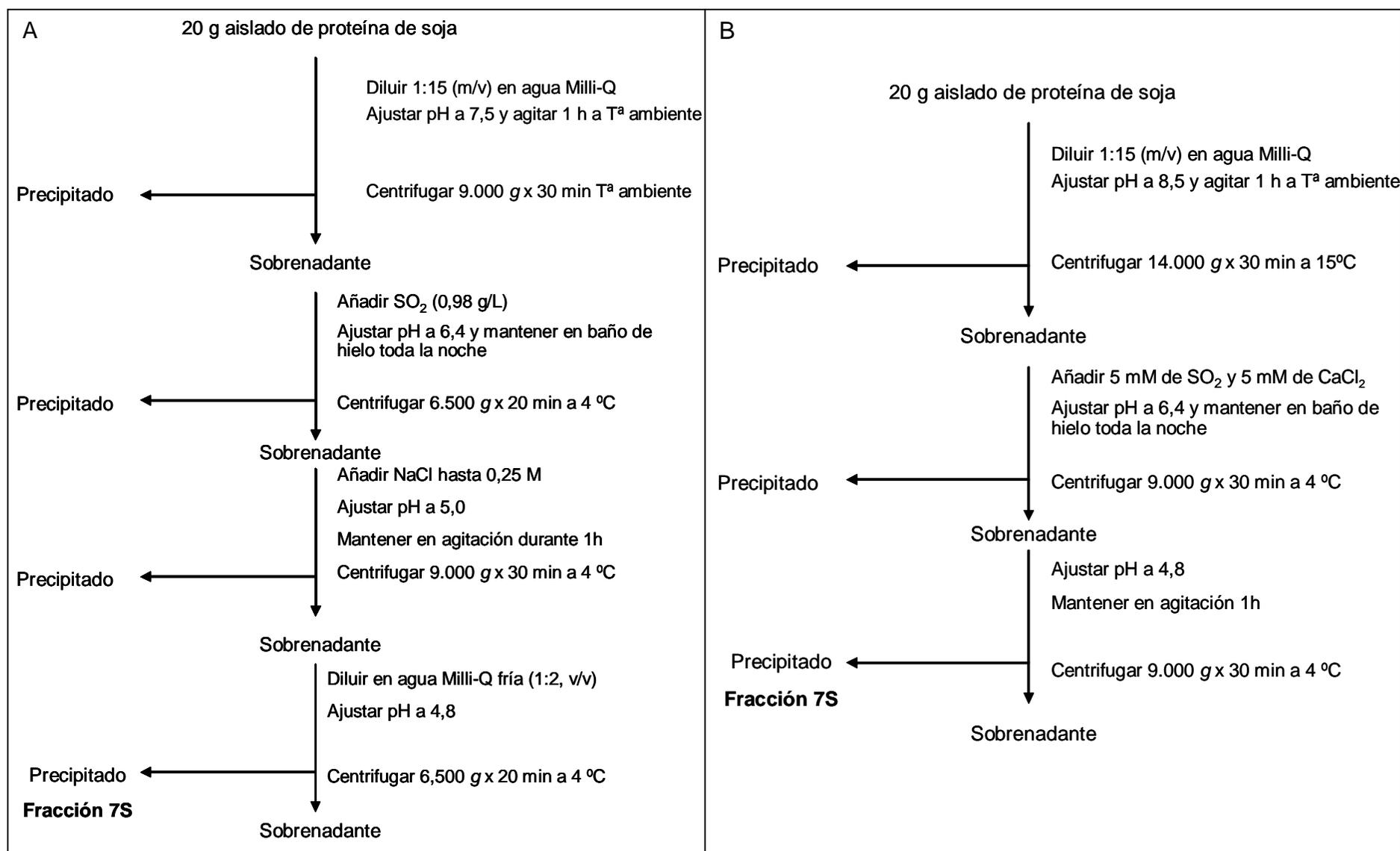


Figura 8. Condiciones empleadas para la precipitación isoelectrica selectiva de la fracción 7S globulina de soja: (A) método de Nagano y col. (1992) y (B) de Deak y col. (2007).

3.2 Caracterización de la fracción 7S

3.2.1 SDS-PAGE

El análisis electroforético se realizó siguiendo instrucciones dadas por el fabricante (IM-8042F061002, Invitrogen, España). Antes del análisis electroforético las muestras (32,5 μ L) de proteínas de concentración 1 mg/mL se desnaturalizaron por adición de 5 μ L de DTT 0,5 M y 12,5 μ L de tampón de preparación de muestra, “NuPAGE® LDS sample buffer” (Invitrogen), y calentamiento a 100°C durante 10 minutos. La separación electroforética se realizó en geles comerciales de poliacrilamida del 12% empleando como tampón de separación “NuPAGE® MES SDS running buffer” (Invitrogen), corriente inicial de 120 mA/gel y 200 V de voltaje constante durante 50 min. Como marcadores de peso molecular se emplearon: cadena A de la insulina (Mr 2.500 Da), cadena B de la insulina (Mr 3.500 Da), aprotinina (Mr 6.000 Da), lisozima (Mr 14.400 Da), inhibidor de la tripsina (Mr 21.500 Da), anhidrasa carbónica (Mr 31.000 Da), lactato deshidrogenada (Mr 36.500 Da), glutámico deshidrogenada (Mr 55.400 Da), BSA (Mr 66.300 Da) y fosforilasa B (Mr 97.400 Da). La detección de la diferentes cadenas de proteínas se llevó a cabo por medio de tinción con Azul de Coomassie, plata y PAS.

La **tinción de azul de Coomassie** se realizó del siguiente modo: tras fijar y teñir las proteínas con una solución de metanol 45% (v/v), ácido acético 9% (v/v) y azul brillante de Coomassie R250 0,1 % (p/v) (Fluka, Steinheim, Alemania) en agua durante, aproximadamente, media hora; se eliminó el exceso de colorante con una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) (García-Segura y col., 1996).

En los casos en que se requirió una mayor sensibilidad para la detección de las bandas de proteínas el revelado de los geles se realizó mediante **tinción con plata**. La fijación de proteínas se llevó a cabo empleando una solución acuosa conteniendo 50 mL de acetona al 50% (v/v), 1,5 mL de TCA al 50% (p/v) y 25 μ L de formaldehído; se aclaró el gel con agua destilada; se lavó con 30 mL de acetona al 50% (v/v) durante 5 minutos y se añadieron 30 mL de agua destilada a la que se había adicionado previamente 100 μ L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 1% (p/v) y se dejó durante 2 minutos más. Seguidamente, el gel se aclaró tres veces con agua; se sumergió en 48 mL de una solución acuosa conteniendo 0,8 mL de AgNO_3 al 10% (p/v) y 0,6 mL de formaldehído al 37 % (p/p); se aclaró tres veces con agua destilada para eliminar los iones que no se encontraban unidos a las proteínas; se reveló con 50 mL de Na_2CO_3 al 1% (p/v), 7 μ L de

formaldehído al 37% (p/p) y 10 μ L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10% (p/p). El desarrollo de color se detuvo añadiendo ácido acético al 1% (v/v).

Para la **tinción de PAS** (ácido periódico y reactivo de Schiff), tinción específica para carbohidratos, se realizaron ensayos empleando concentraciones de glicoproteínas de entre 1 a 6 mg/ml. Los estudios llevados a cabo indicaron que, para obtener resultados óptimos, debían emplearse para el análisis electroforético seguido de tinción PAS concentraciones de proteínas de 6 mg/mL para la 7S globulina y ovoalbúmina mientras que para la manoproteína, invertasa y ribonucleasa B pueden utilizarse disoluciones de 1 mg/ml. La tinción PAS de las bandas de glicoproteínas separadas por SDS-PAGE se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Zacharius y col. (1969). Las bandas de proteínas se fijaron al gel de poliacrilamida con ácido tricloroacético al 12,5% (p/v) durante 30 minutos, el exceso de ácido se eliminó por lavado con agua y a continuación los glicanos unidos a la estructura de las glicoproteínas se hicieron reaccionar con ácido periódico al 1% (p/v) en ácido acético al 3% (v/v). El exceso de los iones periodato y iodato se eliminaron lavando con agua (6 veces durante 10 minutos) y a continuación se desarrolló el color por inmersión del gel en el reactivo de Schiff durante 1 h en oscuridad. El gel se decoloró con una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ al 0,5% (p/v) y lavado con agua bidestilada.

3.2.2 Electroforesis en condiciones nativas

La separación de la 7S globulina en estado nativo, empleando gel de poliacrilamida-Tris-Acetato en gradiente de 3-8%, se realizó de acuerdo con las indicaciones descritas por el fabricante (IM-1025F061002, Invitrogen, España). Previo a la separación 25 μ L de 7S globulina 1 mg/mL se disolvió en 25 μ L de tampón para la preparación de muestra, "Native sample buffer" (Invitrogen). La separación electroforética se realizó con tampón para electroforesis en condiciones nativas, "Tris-glycine native running buffer". La separación electroforética se realizó a voltaje constante de 150 V, con una corriente inicial de 7 mA por gel durante 2 h. Se cargaron 15 μ L por pocillo. Los resultados obtenidos, siguiendo este procedimiento estándar, fueron negativos debido a la facilidad de la proteína para agregarse provocando una deficiente separación en gel. Por lo tanto, se estudiaron varios procedimientos de preparación de muestra incluyendo tratamiento con ultrasonidos por 5, 15 y 30 minutos, dilución de la muestra en 5 mM de 2- β -mercaptoetanol combinado o no con tratamiento térmico de 100°C 1h, adición de urea en concentraciones de 0,5 y 6 M combinado o no con tratamiento térmico de 100°C durante 1h, empleo de detergentes no iónicos tales como Tween-20 en concentración de 5 y 10 mM y Triton

X-100 a 25 y 50 mM y dilución en tampón fosfato sódico 50 mM con 2 M de NaCl calentamiento a 100°C durante 10 min ó 1 h. Como marcador molecular se empleó BSA ($M_r \sim 66.000$) 7,5 mg/mL en tampón de preparación de muestra ("native sample buffer", Invitrogen). Los geles se revelaron con la tinción de plata descrita en el apartado 3.2.1.

3.3 Ensayos de desglicosilación enzimática

La fracción 7S globulina obtenida según se describe en el apartado 3.1 se desglicosiló enzimáticamente con la PNGasa F (descrita en el apartado 2.5). Los ensayos de desglicosilación se realizaron empleando PNGasa F de grado proteómico (P 7367, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), la cual es sometida a un riguroso proceso de purificación y control de la calidad para descartar otras actividades inespecíficas tales como la proteolítica. El empleo de detergentes en la mezcla de reacción enzimática y la desnaturalización térmica de la proteína a desglicosidar pueden favorecer la actividad de la PNGasa F hasta en un orden de 100 veces. Disoluciones de proteínas en condiciones nativas pueden también ser efectivamente desglicosiladas incrementando los tiempos de incubación de la mezcla de reacción. Habida cuenta que, en la literatura, según nuestro conocimiento, no existen referencias que indiquen el empleo de esta enzima para lograr la desglicosilación efectiva de la totalidad de las subunidades de la 7S globulina de soja, fue necesario optimizar el proceso de desglicosilación enzimático. Inicialmente, se empleó el procedimiento recomendado por Sigma (boletín técnico producto R1153) y se estudiaron las variables **tiempo de incubación** (1-24 h) y **concentración de 7S globulina** (1-6 mg/mL). Por otra parte, se comprobó la **efectividad** y **selectividad** de la actividad de la preparación comercial de **PNGasa F**, empleando otras glicoproteínas de distinta naturaleza incluyendo **ribonucleasa B** (R1153, Sigma-Aldrich), **ovoalbúmina** (17044201C, Agilent), **invertasa** de *Saccharomyces cerevisiae* (I-4504, Sigma-Aldrich); y **manoproteína** (Mannostab™, Laffort).

La fracción de 7S globulina se disolvió en tampón de reacción con una composición de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 20 mM pH= 7,9. Previo a la desglicosilación, la fracción de 7S globulina de soja (90 μL) se desnaturalizó por adición de 5 μL de una mezcla constituida por octil- β -D-glucopiranosido al 2% (p/v) y 2- β -mercaptoetanol 0,1 M y calentamiento a 100 °C durante 10 minutos. Se optó por la desnaturalización frente a la desglicosilación de la proteína en estado nativo dada la complejidad estructural de esta fracción de proteínas y con objeto de garantizar una desglicosilación óptima. Las glicoproteínas desnaturalizadas se atemperaron y se añadieron 5 μL más del tampón de reacción, para obtener unas concentraciones finales de 7S

globulina de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg/mL. La mezcla de reacción se homogeneizó por agitación y el residuo de proteína adherida a las paredes del tubo de reacción se recuperó por centrifugación a 5.000 *g* durante 5 segundos. La mezcla de reacción de desglicosilación enzimática consistió en 50 μ L de esas concentraciones de glicoproteínas y 2 unidades enzimáticas (4 μ L). Se realizó un primer control en el que la enzima se inactivó a $t=0$ por calentamiento a 100°C durante 10 minutos y se incubó el mismo tiempo que las desglicosiladas, al no observar cambios, el resto de los controles se realizaron poniendo el volumen equivalente de agua bidestilada en lugar de enzima. La mezcla de reacción se incubó a 37°C con agitación constante a 300 rpm y por diferentes tiempos según se indica a continuación. La reacción de desglicosilación se detuvo por calentamiento a 100°C durante 10 min. La reacción de desglicosilación se llevó a cabo en tubos mini-Eppendorf de 0,25 ml en un agitador orbital (Thermomixer, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) provisto con un control de temperatura de 1-99°C. Los distintos tiempos de incubación estudiados se realizaron sólo para la concentración de 1 mg/mL de 7S globulina y fueron: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 h.

El seguimiento del estudio del proceso de desglicosilación enzimática para la fracción 7S globulina y las otras glicoproteínas estudiadas se realizó por medio del análisis de la modificación del peso molecular por SDS-PAGE (apartado 3.2.1) y empleando los métodos analíticos que se describen a continuación.

3.3.1 Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida (IEF-PAGE)

Las muestras de proteínas a analizar se prepararon según indicaciones del fabricante (boletín nº IM-6005B, Invitrogen, España). La separación de las proteínas por punto isoeléctrico se realizó en gel de poliacrilamida al 5% en un intervalo de pH de 3-10. Las muestras a analizar en concentración de proteínas de 1 mg/ml se diluyeron a la mitad en tampón para la preparación de muestra, "IEF 3-10 sample buffer" (Invitrogen). La separación electroforética se realizó como sigue: "Novex IEF catode buffer" y "Novex IEF anode buffer" se emplearon como tampones de migración; a voltaje de 100 V 1h, 200 V 1 h y 500 V 30 min; la corriente al inicio fue de 5 mA/gel. Se cargaron 15 μ L/pocillo. Las bandas focalizadas características de cada una de las proteínas se revelaron con tinción de plata siguiendo el procedimiento que se describe en el apartado 3.3.2. Se emplearon como marcadores de punto isoeléctrico: citocromo C de corazón de caballo (10,7), ribonucleasa A de páncreas bovino (9,6), lectina de lenteja (8,3, 8,0 y 7,8), mioglobina de músculo de caballo (7,4 y 6,9), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (6), β -lactoglobulina de

leche bovina (5,3 y 5,2), inhibidor de la tripsina de la soja (4,5), glucosido oxidasa de *Aspergillus niger* (4,2) y amiloglicosidasa de *Aspergillus niger* (3,5).

3.3.2 CZE

El procedimiento se realizó siguiendo las condiciones descritas por Wong y col. (1994), para la separación de proteínas de soja.

Se utilizó un equipo de electroforesis capilar Agilent G16000A (Madrid, España) con sistema de detección UV-visible. El control instrumental se llevó a cabo por medio del programa informático HPChem Station. La separación electroforética se realizó en capilares de sílice fundida (Agilent) de 50 μm de diámetro interno con una longitud hasta el punto de detección de 56 cm y total de 64,5 cm. La separación se efectuó a 30°C y a voltaje constante de 20 kV. La detección se realizó a una longitud de onda de 220 nm.

Antes de su utilización los capilares se acondicionaron mediante un lavado a presión de 5 bares con agua durante 5 minutos, disolución de NaOH 0,1 M durante 5 minutos y repetición del lavado con agua. El capilar se preacondicionó antes de cada inyección haciendo pasar agua (1 min), 0,1 M de NaOH 1 min; agua 1 min y tampón borato sodio 20 mM a pH 8,5 2 min. Las muestras de proteínas a inyectar se prepararon a una concentración de 1 mg/ml de proteína en tampón de reacción del apartado 3.3. Como tampón de separación se empleó borato sódico 20 mM a pH 8,5. Los tampones se filtraron a través de un filtro nylon de 0,45 μm de tamaño de poro antes de ser utilizados. Al final del análisis el capilar se lavó a 5 bares de presión con NaOH 1M 0,2 min; NaOH 0,1M 5 min; agua 2 min y nitrógeno 1 min.

Las inyecciones se realizaron en el ánodo por inyección hidrodinámica mediante presión con nitrógeno durante 5 segundos a una presión de 50 mbar.

3.3.3 RP-HPLC

El análisis se realizó en un cromatógrafo (Beckman, USA) provisto con una bomba binaria, sistema de detección ultravioleta de longitud de onda variable (Beckman 166) e inyector automático modelo Metrohm-Spark Triatlón (Herisau, Suiza). El sistema de adquisición de datos fue System Gold versión 711.

Se empleó una columna C₄, Júpiter 300 A de 5 µm de tamaño de partícula, longitud 250 mm y diámetro interno de 460 mm. Las proteínas se eluyeron en condiciones de gradiente (**Tabla 3**), a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Las fases móviles fueron: fase A, solución acuosa de SDS al 0,025% (p/v) y TFA al 0,1% (v/v); fase B, SDS al 0,025% (p/v) y TFA al 0,085% (v/v) en acetonitrilo-agua 90-10% (v/v), teniendo en cuenta las condiciones descritas por Buehler y col. (1989), Peterson y Wolf (1992) y Oomah y col (1994). Los picos cromatográficos obtenidos por inyección de 100 µL de muestra conteniendo 1 mg/mL de proteína se detectaron a 214 nm.

Tabla 3. Gradiente empleado para la separación por RP-HPLC de las proteínas.

Etapa	t (min)	% Fase A	% Fase B
1	45	65	35
2	1	0	100
3	10	0	100
4	1	65	35
5	12	65	35

3.4 Ensayos de antigenicidad

3.4.1 Immunoblotting

Las fracciones de 7S globulina y sus productos de desglicosilación se sometieron a análisis inmunológico con objeto de evaluar si la cadena de carbohidrato que forma parte de esta glicoproteína está implicada en su respuesta antigénica. Previo al immunoblotting, las muestras de glicoproteínas se separaron en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras desnaturizantes, como se ha descrito en el apartado 3.2.1, seguidamente las bandas de proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF (de 0,45 µm de diámetro de poro) (Invitrolon™) mediante el sistema XCell II Blot module (Invitrogen), por electrotransferencia a 30 V durante 2 h, siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente, las membranas se bloquearon con TBST (0,05% (v/v) Tween-20 en tampón salino Tris (TBS)) con leche en polvo desnatada (10% (p/v)) a temperatura ambiente durante 1 h. Después de lavar tres veces con TBST, la membrana se incubó con anticuerpo policlonal de conejo anti-proteína total de soja (anticuerpo primario) (S2519, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) diluido 1:1.000 en TBST a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se lavó con TBST durante 10 minutos cada vez, y se

incubó con anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano (anticuerpo secundario) (A6154, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) diluido 1:1.000 en TBST con 10% de leche en polvo desnatada durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación las membranas se lavaron con TBST y revelaron con 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) como se indica en la **Figura 9**.

Membrana de transferencia

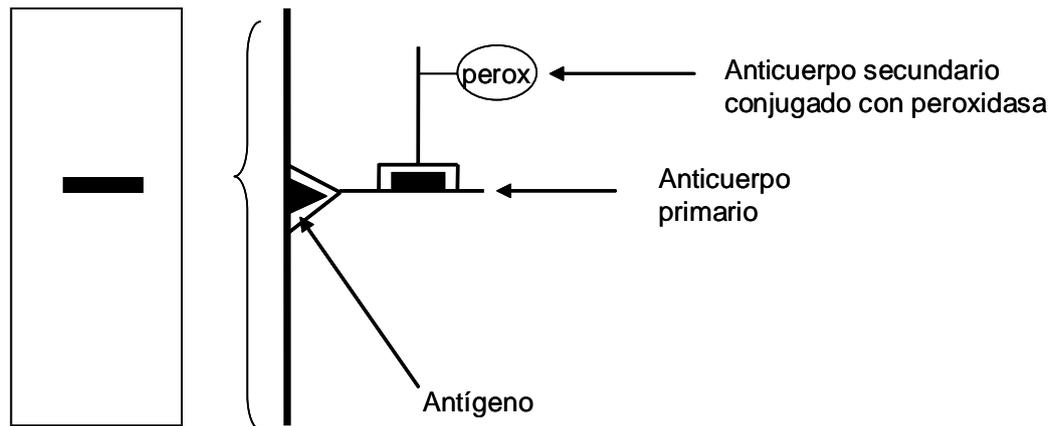


Figura 9. Esquema del protocolo de inmunoblotting.

3.4.2 ELISA indirecto

El grado de modificación de la respuesta antigénica de la fracción 7S globulina de soja se realizó mediante ELISA indirecto. Una vez optimizados todos los parámetros (concentración de anticuerpo primario, secundario y tiempo de incubación de la reacción con el sustrato) se pasó a analizar las glicoproteínas y sus formas desglicosiladas como se describe a continuación. La técnica se llevó a cabo en soporte sólido, placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar 3590 High Binding, Corning). Para establecer las diluciones de anticuerpos adecuadas se realizaron diluciones seriadas de ambos anticuerpos tal y como se indica en la **Figura 10**, siguiendo el protocolo que se muestra a continuación:

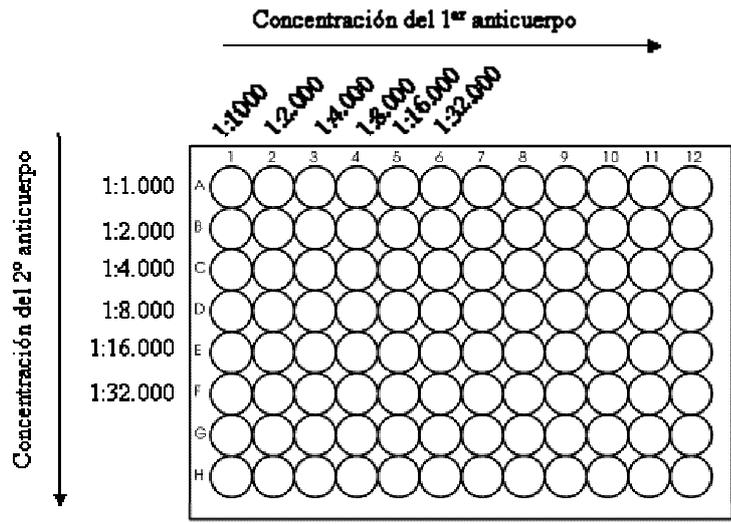


Figura 10. Esquema del protocolo de optimización de las concentraciones de anticuerpo de ELISA.

- Fijación del antígeno a la placa: se pusieron 50 y 100 ng/pocillo de la globulina 7S aislada y su forma desglucosilada disueltas en tampón carbonato 50 mM pH 9,6 y se dejaron a 4 °C toda la noche.
- Bloqueo de sitios inespecíficos: se incubaron con 300 µL de BSA al 1% en tampón carbonato 50 mM pH 9,6 a 37 °C durante 1h; y se lavaron 3 veces con 300 µL/pocillo de PBS-T (tampón fosfato salino con 0,05 % (p/v) Tween-20: 50 mmoles NaCl, 0,15 mmoles KPO₄H₂K, 0,2 mmoles Na₂HPO₄ y 0,3 mmoles KCl; pH = 7,2).
- Incubación con el primer anticuerpo: se realizó con 100 µL anticuerpo policlonal de conejo anti-proteína total de soja (S2519, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) a las distintas diluciones seriadas en PBS (tampón fosfato salino descrito en el punto anterior sin Tween-20) tal y como se indica en la horizontal de la Figura 10 incubando a 37 °C durante 2 h, tras las cuales se realizaron 3 lavados de la placa con 150 µL/pocillo de PBS-T.
- Incubación con el segundo anticuerpo: se realizó con 100 µL de anticuerpo de cabra policlonal anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (A6154, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) diluido en PBS, tal y como se indica en la vertical de la Figura 10 y se incubó a 37 °C durante 2 h, tras las cuales se realizaron 3 lavados de la placa con 150 µL/ pocillo de PBS-T.
- Revelado de la placa: para poder cuantificar se pusieron 100 µL del reactivo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) para ELISA. Este sustrato sensible a la luz desarrolla un color azul. Para poder establecer el tiempo óptimo de lectura se estudió la cinética

de la reacción tomando medidas a una longitud de onda de 370 nm cada 3 minutos hasta saturación, con un lector de placas Biotek Power Wave XS (Izasa, Madrid, España).

- Lectura de la placa: establecido el tiempo de incubación óptimo de la reacción, ésta se detuvo añadiendo 100 μ L de HCl 2 M y se realizó la lectura en el lector de placas a una longitud de onda de 450 nm.

De este modo se estableció que las concentraciones más adecuadas de los anticuerpos primario y secundario correspondían a las diluciones 1:1.000 y 1:4000, respectivamente. Para estudiar el intervalo de linealidad en cuanto a la respuesta de la reacción colorimétrica-concentración de proteína, se construyó una curva de calibrado con la 7S globulina (10-80 ng/pocillo). Las medidas de absorbancia se realizaron por triplicado.

En la fijación del antígeno se pusieron 40 ng/pocillo de la 7S globulina y su forma desglicosilada. El resto de pasos fueron los mismos que ya se han descrito.

Para comparar las diferencias entre la glicoproteína 7S y su desglicosilada se calculó el intervalo de confianza mediante la distribución t de Student, empleando el programa Microsoft Excel 2000.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección del método de purificación de la 7S globulina de soja

Dada la complejidad de la fracción proteica de la soja, fue preciso en primer lugar, llevar a cabo el aislamiento de la 7S globulina, objeto de estudio en la presente memoria, para lo cual se emplearon dos procedimientos distintos. A pesar de la similitud de ambos protocolos de purificación los resultados obtenidos fueron distintos. Siguiendo el protocolo 1, propuesto por Nagano y col. (1992), se obtuvieron $1 \pm 0,02$ g de proteína a partir de 100 g de aislado comercial de proteínas de soja, cantidad muy inferior a la obtenida ($12 \pm 0,39$ g) según el protocolo 2 (Deak y col., 2007). Ambos procedimientos resultaron reproducibles (DSR=4%, $n=3$). Sin embargo, el protocolo 1 permitió obtener una fracción de 7S globulina pura por SDS-PAGE (Figura 11) y electroforesis en condiciones nativas (Figura 12) con tinción de plata.

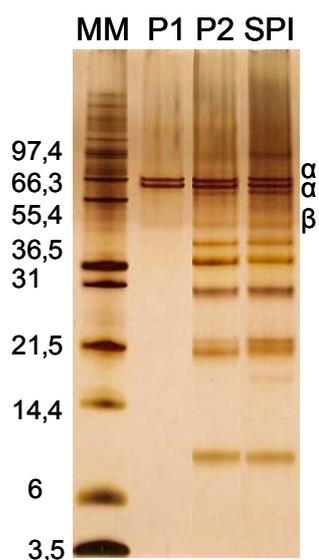


Figura 11. Perfil electroforético de SDS-PAGE teñido con plata de la 7S globulina. MM: marcadores de masa molecular (kDa), P1: método de Nagano y col., 1992 (0,4 ng/pocillo), P2: el método de Deak y col., 2007 (0,4 ng/pocillo), SPI: aislado de proteína de soja comercial (3,25 ng/pocillo).

Las bandas obtenidas para la 7S globulina corresponden a las descritas en la bibliografía (García y col. 1997). Como puede observarse en la Figura 11 las fracciones obtenidas por ambos protocolos contienen 7S detectándose las bandas electroforéticas correspondientes a las subunidades α' , α ($M_r \sim 66.000$ Da) y β ($M_r \sim 49.000$ Da), que

conforman típicamente esta fracción. Por otra parte, puede observarse que según Deak y col. (2007) se obtiene una fracción de 7S de menor pureza que por el procedimiento descrito por Nagano y col. (1992). En la calle P1 del gel que se presenta en la figura puede verse la presencia exclusiva de las cadenas α' , α y más tenue la β correspondientes a la 7S globulina.

Las diferencias en cuanto al grado de pureza obtenida por ambos protocolos probablemente se deban al empleo de un mayor número de etapas de purificación y ligeras diferencias de pH entre ambos. El método descrito por Deak y col. (2007) implica un paso menos de precipitación por ajuste de pH a 5, respecto al propuesto por Nagano y col. (1992), de tal modo que permanecen, junto con la fracción de 7S globulina, otras proteínas contaminantes. Dado que para el estudio del impacto de la desglucosilación de la 7S en su antigenicidad es relevante la pureza de la preparación de la proteína a emplear, se seleccionó la muestra pura por análisis SDS-PAGE para su estudio (Figura 11, calle P1).

Mayor información acerca de la fracción 7S purificada se obtuvo por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas. En la Figura 12 se pueden observar las distintas bandas obtenidas. El tratamiento de la muestra con ultrasonidos mostró una banda proteica muy difusa debido probablemente a la ineficacia de los ultrasonidos para desagregar la proteína por los cortos tiempos de tratamiento ensayados. Iguales bandas se obtuvieron para los tratamientos con urea a temperatura ambiente y los detergentes no iónicos Tween-20 y Triton X-100. En el caso de los tratamientos con urea acompañados de calentamiento no se observaron diferencias a las dos concentraciones ensayadas, 0,5 M y 6 M, respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos para la BSA (marcador de peso molecular) la masa molecular de la 7S tratada con mercaptoetanol sería del orden de 132.000 -198.000Da. Resultado que coincide con el Mr descrito para esta proteína por otros autores (García y col., 1997).

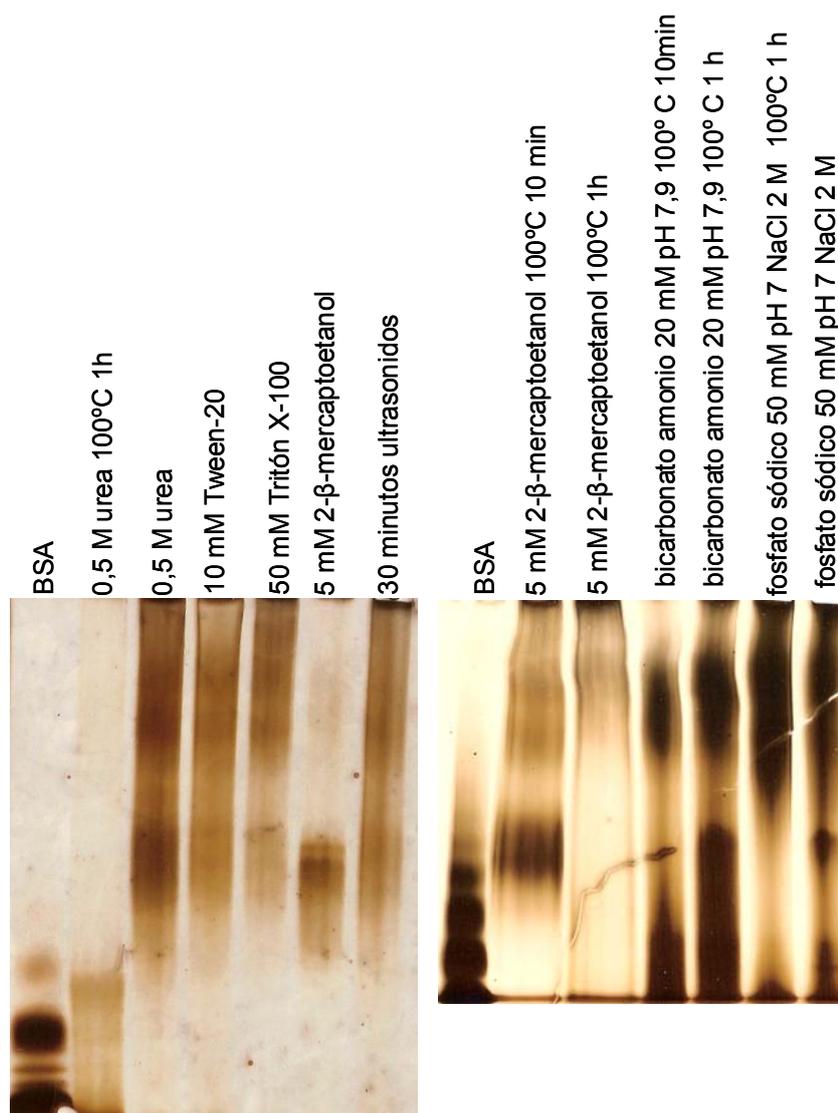


Figura 12. Perfiles electroforéticos en geles de tris-acetato-poliacrilamida en condiciones nativas de la 7S globulina y BSA (marcador molecular).

El 2-β-mercaptoetanol reduce los puentes disulfuro de las proteínas. La estructura cuaternaria de la 7S globulina, como en el resto de legumbres, no está formada por puentes disulfuro (Mills y col., 2003). El tratamiento permitió obtener una banda ancha y definida con la M_r esperada para la 7S. Por lo que, este agente reductor podría ayudar a impedir fenómenos de agregación sin que haya modificación de la estructura nativa de 7S. No se observan para este tratamiento proteínas en el punto de aplicación, lo que sugiere la migración de toda la muestra aplicada y la ruptura de agregados.

La urea, agente desnaturante, ha sido empleada en estudios de cinética de desnaturación a distintas concentraciones. A bajas concentraciones pueden lograrse

desagregación sin que se desnaturalicen las proteínas (García-Segura y col. 1996), por eso se eligió como otra posible opción para realizar la electroforesis en condiciones nativas. Al comparar la banda obtenida presenta una Mr más pequeña que la descrita en la bibliografía para la 7S globulina (García y col., 1997), lo que indica que la proteína se ha desnaturalizado.

Los detergentes no iónicos Tween-20 y Tritón X-100, podrían romper las interacciones hidrofóbicas que sustentan la estructura cuaternaria de la 7S globulina. Sin embargo, no se obtuvo la banda esperada por lo que se planteó la posibilidad de que el pH pudiera hacer que la proteína estuviera cargada de modo que facilitase su agregación sin permitir su correcta resolución en el gel. El pH en las disoluciones de estos detergentes, fue cercano a 4,5 y 4 para Tween-20 y Tritón X-100, respectivamente. Esto descartó su utilización en la preparación de la muestra, ya que estos pH están muy cercanos al punto isoelectrico de la proteína, pH al cual pueden agregarse y precipitar (Paulsen y col., 2006). De hecho para las muestras preparadas en detergentes no iónicos se observan colas indicativas de una elevada retención debido a la agregación.

En conclusión, los mejores resultados se obtuvieron con 2-β-mercaptoetanol, ya que el peso molecular estimado se corresponde con el esperado. El empleo de este agente reductor con calentamiento conduce a la obtención de una banda correspondiente a la masa molecular esperada cuando se mantiene durante 10 minutos y la pérdida total de banda cuando se realiza durante 1h, indicativo de nuevos fenómenos de agregación. La proteína 7S no es estable a temperaturas superiores a 75°C (Mills y col., 2003), tratamientos más intensos provocan su desnaturalización y agregación.

Los perfiles electroforéticos descritos de la 7S globulina en la presente memoria son similares a los publicados recientemente por Lakshmanan y col. (2006) y L'Hocine y col. (2006) en los que se observan bandas difusas y de poca intensidad por tinción con azul de Coomassie como consecuencia de fenómenos de agregación no deseados. Estos autores realizaron electroforesis en condiciones nativas por el método tradicional, sin la inclusión de ningún otro agente. Nuestros resultados sugieren que el empleo de β-mercaptoetanol puede evitar fenómenos de agregación no deseados y, por tanto, una correcta caracterización de la 7S por electroforesis en condiciones nativas. Es de destacar que los resultados obtenidos coinciden con los de SDS-PAGE en cuanto a la pureza de la fracción de 7S obtenida. La banda es ancha debido a la complejidad estructural cuaternaria de la 7S, pero se observa una

única banda indicando el alto grado de pureza de la fracción de 7S obtenida según Nagano y col. (1992).

4.2 Proceso de desglucosilación enzimática de la 7S globulina de soja

4.2.1 Cinética de la reacción de desglucosilación

Una vez obtenida aislada, purificada y caracterizada la 7S globulina, se procedió a su desglucosilación, y con el objeto de encontrar las condiciones óptimas de desglucosilación de esta glicoproteína se estudiaron distintos tiempos de incubación. La Figura 13 muestra el grado de desglucosilación obtenido por incubación durante 0 a 24 h. Como puede observarse, se produce un ligero desplazamiento de las bandas correspondientes a las subunidades α' y α a partir de la tercera hora de desglucosilación. Para la desglucosilación tras 24 h de incubación no se observan diferencias con respecto las 3 h de incubación con PNGasa F con tinción azul de Coomassie.

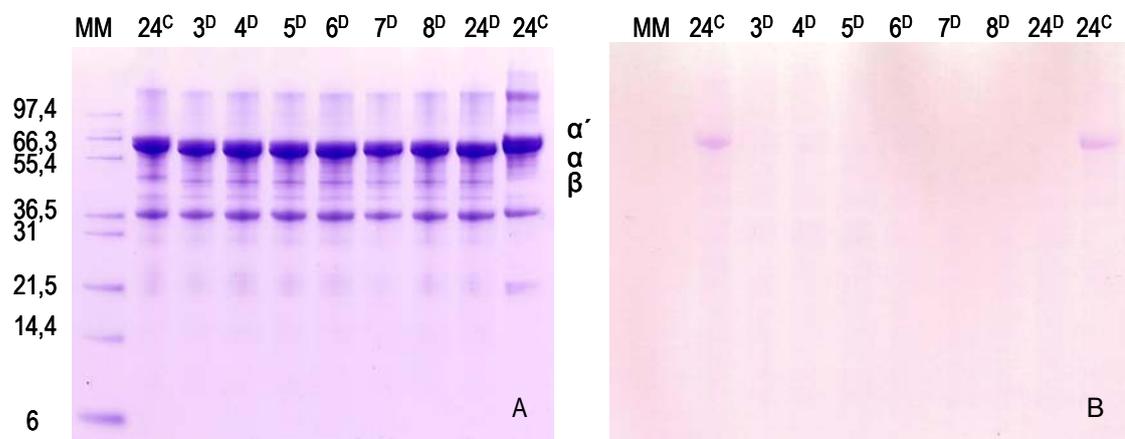


Figura 13. Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE de la 7S globulina teñido con azul de Coomassie (A) y PAS (B). MM: marcadores de masa molecular; 24^C control de 24 h; 3-24^D el número de horas de incubación de la reacción de desglucosilación.

En el caso de 1 y 2 h se observaron bandas tenues correspondientes al carbohidrato por la tinción PAS (datos no mostrados). Los cambios en la movilidad electroforética de las subunidades α' , α y β , así como la desaparición de las bandas correspondientes a los carbohidratos de la muestra control comparadas con las desglucosiladas, sugieren que la liberación de carbohidrato ha finalizado en 3 h o, al menos, está por debajo del límite de

detección de la tinción de carbohidratos. En cuanto a la posibilidad de establecer el orden de desglicosilación, de las subunidades α' o α , con estos experimentos no se puede dilucidar, porque, aunque parece que es la subunidad α' la banda que está desapareciendo, podría ser que la pérdida de carbohidrato diera una banda de igual peso molecular que α y por eso en las primeras horas de incubación esta banda se mantiene y desaparece en tiempo posterior a la de α' . Con este objeto, se realizarán análisis por espectrometría de masas en el futuro para poder elucidar la cinética de desglicosilación de estas componentes de la fracción 7S, así como los sitios de desglicosilación preferenciales por PNGasa F y la presencia de carbohidrato en los epítomos del alérgeno.

Se estima que la 7S globulina contiene un 5% de carbohidratos en su estructura, equivalente a entre 5 y 6 cadenas de glicanos, con una masa molecular media por glicano de entre 1,558 a 1,882 kDa (Yamahuchi y col., 1974), por lo que la desglicosilación total de esta glicoproteína causaría una disminución de entre 9,348 y 11,292 kDa respecto a la glicoproteína nativa. Los pesos moleculares obtenidos en nuestros ensayos para las bandas de las subunidades α' y α son de 67,6 y 64,57 kDa, respectivamente, lo que equivale a aproximadamente el 95% del peso obtenido para los controles, confirmando que la desglicosilación se ha llevado a cabo.

De los tiempos de desglicosilación ensayados podemos concluir, que 3 h son suficientes para que 2 unidades enzimáticas de PNGasa F desglicosilen totalmente 0,05 mg de la 7S globulina en un volumen de 50 μ L.

4.2.2 Estudio de la concentración de sustrato

Uno de los factores que puede afectar a la desglicosilación es la concentración de sustrato. En la Figura 14 se muestra el perfil electroforético obtenido por desglicosilación con PNGasa F de la 7S en concentraciones comprendidas entre 1 y 6 mg/ml tras 24 h de incubación.

Mediante la tinción con azul de Coomassie se demostró que el aumento en la concentración de la proteína a desglicosilar afecta a la actividad de la enzima, dado que el desplazamiento de las bandas electroforéticas se hace menos marcado. Sin embargo, en este intervalo de concentración no se observa inhibición de la actividad enzimática como

consecuencia del exceso de sustrato detectándose en todos los casos cambio en el peso molecular. Información más detallada se obtuvo por tinción PAS (Fig. 14B). En ninguna de las muestras tratadas con la PNGasa F se observa banda correspondiente a carbohidratos en comparación con las glicoproteínas sin tratar. Sin embargo, en éstas se observó un incremento en la intensidad de la banda (Fig 14, B, calles 2^c, 3^c, 4^c, 5^c y 6^c) en función de la concentración de la glicoproteína.

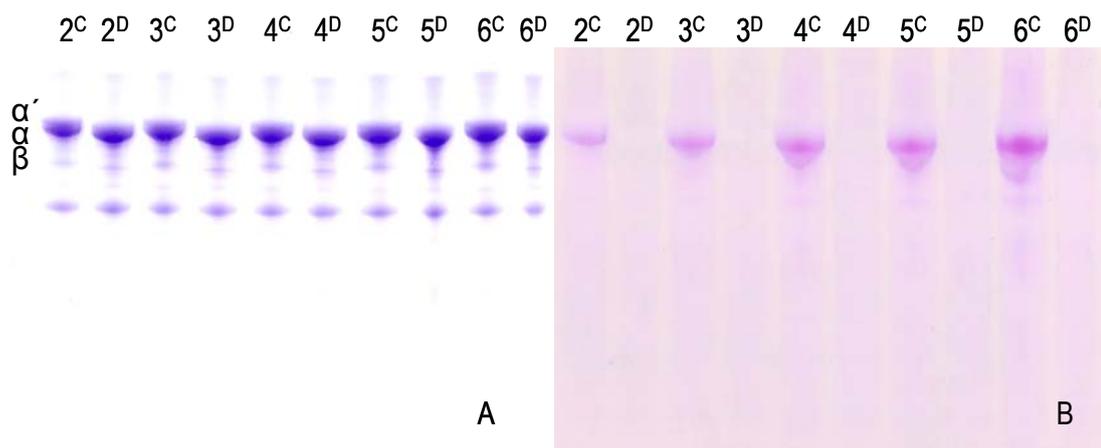


Figura 14. Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (A) y con tinción PAS (B) de la 7S globulina de la soja. El n° indica la concentración de proteína ensayada en mg/mL y el superíndice control (C) y desglucosilada (D).

Los datos obtenidos para las distintas concentraciones de la 7S globulina ensayadas sugieren que la desglucosilación se ha producido durante las 24 h de incubación. Además todo parece indicar que los glicanos que posee esta glicoproteína son todos de tipo *N*-glicano, lo que corresponde con lo descrito por otros autores en glicoproteínas de soja (Kimura y col., 1997). Los *N*-glicanos parecen no poseer fucosa unida por enlace α 1-3 a la *N*-acetilglucosamina, ya que la desglucosilación es completa.

4.2.3 Comparación con otras glicoproteínas

Otras glicoproteínas conocidas tales como manoproteína, invertasa, ovoalbúmina y ribonucleasa B fueron también objeto de estudio para comprobar la especificidad de la actividad de la enzima PNGasa F por los *N*-glicanos. El grado de desglucosilación se estimó mediante técnicas electroforéticas y cromatográficas siguiendo el mismo procedimiento

descrito para la 7S globulina. En la Figura 15 se puede observar las bandas electroforéticas detectadas por análisis de las glicoproteínas antes y después de la desglicosilación enzimática durante 24 h.

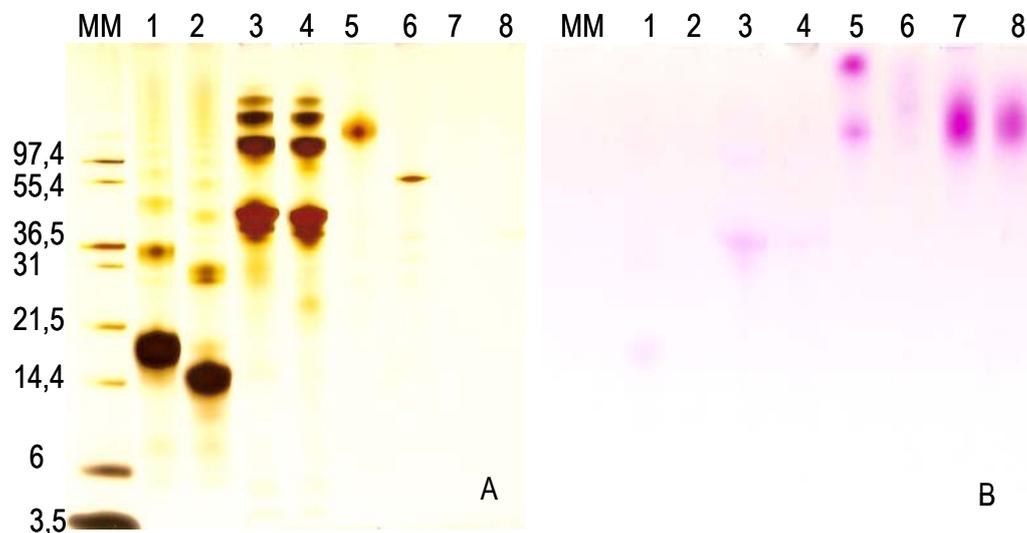


Figura 15. Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE teñido con plata (A) y PAS (B). MM: marcadores de peso molecular (kDa); 1: ribonucleasa B control; 2: ribonucleasa B desglicosilada; 3: ovoalbúmina control; 4: ovoalbúmina desglicosilada; 5: invertasa control; 6: invertasa desglicosilada; 7: manoproteína control; y 8: manoproteína desglicosilada.

En general, los perfiles electroforéticos de las formas desglicosiladas difieren de los correspondientes a las glicoproteínas nativas. No se observó banda correspondiente a la enzima PNGasa F ($M_r \sim 36$ kDa) en ninguna de las mezclas de desglicosilación. En el caso de la ribonucleasa B, ovoalbúmina e invertasa se produjo un desplazamiento de las bandas principales como consecuencia de la desglicosilación enzimática, aunque en cada una de modo distinto (Fig 15 A, calles 1-6). Para la ovoalbúmina el desplazamiento fue menor que para la ribonucleasa B y la invertasa, siendo para esta última mayor el cambio en el peso molecular. Como puede observarse para la manoproteína (Fig 15 A, calle 7-8) no se obtienen bandas por tinción con plata.

En el gel obtenido por tinción PAS (Fig 15 B) se puede observar una banda electroforéticas difusa y de coloración intensa para la manoproteína, indicativa de un alto contenido en carbohidrato estructural. La intensidad de la banda disminuye, pero no desaparece como consecuencia de la actividad de la PNGasa F. La invertasa presenta dos bandas sensibles a la tinción de PAS mientras que la ovoalbúmina y ribonucleasa B

mostraron una única banda electroforética. La modificación en la movilidad electroforética depende del porcentaje de carbohidrato presente en la estructura de cada glicoproteína en particular. La Figura 16 muestra los glicanos hasta ahora descritos para la invertasa, la ribonucleasa B y la ovoalbúmina .

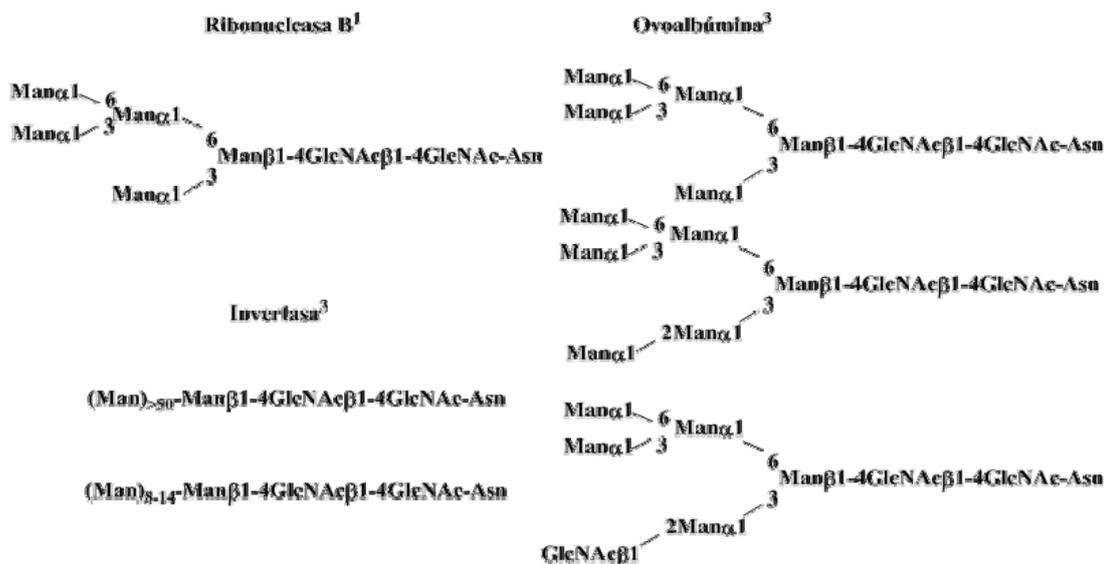


Figura 16. Glicanos descritos para las glicoproteínas ribonucleasa B, ovoalbúmina e invertasa. Tomado de: (1) Rudd y col., 1995; (2) Ziegler y col., 1988 y (3) Dua y Bush, 1984.

En general, las diferencias entre las glicoproteínas y formas desglucosiladas se observan empleando tanto tinción de plata como PAS siendo esta última más selectiva. Los resultados obtenidos por tinción PAS indican la pérdida de peso molecular de todas las glicoproteínas objeto de estudio como consecuencia de la actividad de PNGasa F. Este resultado apunta a que las glicoproteínas han sido desglucosiladas en las condiciones ensayadas siendo la manoproteína la que se vio afectada en menor medida.

Neumann y Lampen (1967) caracterizaron la invertasa en la que el 50% de la molécula corresponde a glicano, se estima que tiene 14 posibles sitios de glicosilación, 13 de los cuales son *N*-glicanos ricos en manosa. El perfil electroforético de la invertasa obtenido para las formas tanto glicosilada como desglucosilada corresponde con el descrito en la literatura por Ziegler y col. (1988). El peso molecular obtenido en el presente trabajo para la forma desglucosilada constituye el 63% del peso molecular de la glicoproteína de partida.

En el caso de la manoproteína se estima que el 90% de la glicoproteína es glicano (boletín técnico del producto, Laffort, 2007), de tal modo que para la concentración empleada (10 mg/mL) no hay suficiente proteína como para detectar la banda electroforética correspondiente mediante tinción de plata (Fig. 15 A, calle 7 y 8). Sin embargo, la tinción PAS demostró un cambio ligero en la movilidad electroforética y una leve disminución en intensidad del color de la banda electroforética correspondiente a la forma desglicosilada (Fig. 15B, calle 7 y 8). Parte de los glicanos que conforman esta glicoproteína son del tipo anclados al glicosil fosfato inositol lo que explicaría una baja actividad endoglicosidasa por parte de PNGasa F, también se sabe que otras manoproteínas comerciales contienen glucosa, galactosa, manosa, arabinosa y ramnosa entre sus carbohidratos, pero su estructura no ha sido del todo elucidada (Gonçalves y col., 2002). Por otra parte, puede tratarse de un *O*-glicano, un glicano anclado al glicosil fosfato inositol o incluso de un *N*-glicano resistente a la actividad de la glicosidasa empleada en la presente memoria (PNGasa F) (apartado 2.6). Igualmente, las condiciones de desglicosilación ensayadas (tiempo de incubación, etc) podrían resultar inadecuadas para la desglicosilación de esta compleja glicoproteína.

Las bandas obtenidas para la ovoalbúmina (~47 kDa) y su forma desglicosilada (~45 kDa) se corresponden con las descritas en la literatura (Tai y col., 1977; Nisbet y col., 1981). La hidrólisis enzimática de esta glicoproteína supone una disminución en el peso molecular determinado por SDS-PAGE del 5%, los glicanos que posee, tienen una masa molecular de unos 1,428 kDa y son de tipo *N*-glicano. La pequeña variación en la movilidad electroforética observada corresponde en masa a esta variación y la desaparición de la banda de carbohidrato detectada mediante tinción PAS confirma la desglicosilación total de esta glicoproteína. La aparición de bandas de mayor masa molecular no glicosiladas que se observan para esta glicoproteína (Figura 15 y calle 3-4) pueden deberse a la presencia de impurezas en la preparación de glicoproteína comercial empleada en la presente memoria.

La ribonucleasa B es la forma glicosilada enzimáticamente de la ribonucleasa A, está glicosilada en la Asn³⁴ por un solo glicano que aumenta su masa molecular de aproximadamente 14 hasta 17 kDa (Joao y Dwek, 1993; Rudd y col., 1995) lo que concuerda con lo obtenido en el presente estudio, 16,6 y 13 kDa para la glicoproteína y su forma desglicosilada, respectivamente. Las bandas que aparecen podrían deberse al grado de purificación del compuesto, aunque esta banda aparece glicosilada como puede verse con la tinción de carbohidratos, y también resulta completamente desglicosilada.

De las cuatro glicoproteínas estudiadas por SDS-PAGE la que presenta un comportamiento similar a la 7S globulina es la ovoalbúmina, debido a que el contenido del carbohidrato en ambas es un *N*-glicano que representa el 5% de la molécula y, por tanto, el desplazamiento obtenido en el peso molecular de las bandas concuerda con la pérdida de su respectivos glicanos.

4.2.4 Isoelectroenfoque-PAGE

Con el objeto de comprobar el efecto de la desglicosilación en el punto isoeléctrico de la proteína se realizó, un análisis de la proteína antes y después de la desglicosilación mediante isoelectroenfoque. En la Figura 17 se muestra la focalización isoeléctrica de la glicoproteínas estudiadas.

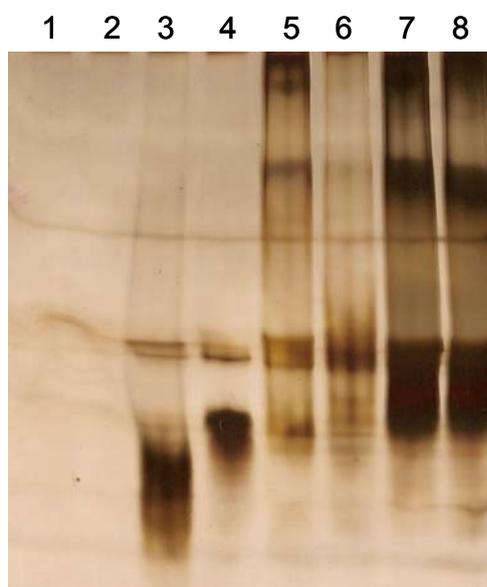


Figura 17. Perfiles electroforéticos obtenidos por isoelectroenfoque de: manoproteína control (1) y desglicosilada (2); invertasa control (3) y desglicosilada (4); 7S globulina control y desglicosilada (6); y ovoalbúmina control (7) y desglicosilada (8).

No se observaron variaciones del pI de 7S (4,9) y ovoalbúmina (4,9) por actividad de PNGasa F. Como puede observarse, no se obtuvieron por los mismos motivos descritos anteriormente (apartado 4.2.3) bandas para la manoproteína. La invertasa presentó un pI de entorno a 3,3 que se incrementó ligeramente como consecuencia de su desglicosilación (pI de 3,7).

El pI obtenido para las glicoproteínas controles es similar al que indican en la bibliografía (fichas técnicas producto 17044201 e I-4504 de Sigma; 17044201 Agilent). En cuanto a lo que cabe esperar al desglicosilar hay distintos aspectos a tener en cuenta. En principio al añadir un grupo ácido como es el Asp y siguiendo la teoría básica de la curva de titulación de un aminoácido, cabe pensar que el pI se mantiene o disminuye debido a su adición, obteniéndose una carga neta igual a cero a pH más ácidos. Sin embargo, debido a la complejidad de las proteínas no se puede explicar fácilmente las modificaciones en el pI ya que depende de su estructura tridimensional, composición de aminoácidos, el valor de pK_a para las cadenas laterales de los aminoácidos, y grupos amino y carboxilo terminal, y la presencia de otros grupos ionizables como ácido siálico o fosfatos (Henriksson y col., 1995).

Los resultados que se describen en la literatura son contradictorios. Al desglicosilar distintas esterasas (Small y Hemingway, 2000) y eritropoyetina (Schlags y col., 2002), se ha visto como el pI de la proteína se desplazaba hacia pH más básicos debido a la presencia de ácido siálico en la estructura del glicano, lo que es más frecuente en glicoproteínas de origen animal. Otros autores sin embargo, han observado que el punto isoeléctrico al desglicosilar avidina no varía (Yao y col., 1999).

En el caso de la 7S globulina al no observarse variación, podría deberse a que la variación es muy pequeña y la técnica no tiene suficiente resolución como para mostrarnos un cambio perceptible, que realmente no se produzca variación, o que los residuos de ácido aspártico que se forman al hidrolizar la molécula podrían estar en regiones internas donde no interactúan con el medio.

4.2.5 CZE

Con el objeto de obtener una mejor caracterización de la 7S globulina, las otras glicoproteínas estudiadas y sus formas desglicosiladas se realizó análisis por CZE. Los electroferogramas obtenidos para las distintas glicoproteínas se pueden observar en la **Figura 18**.

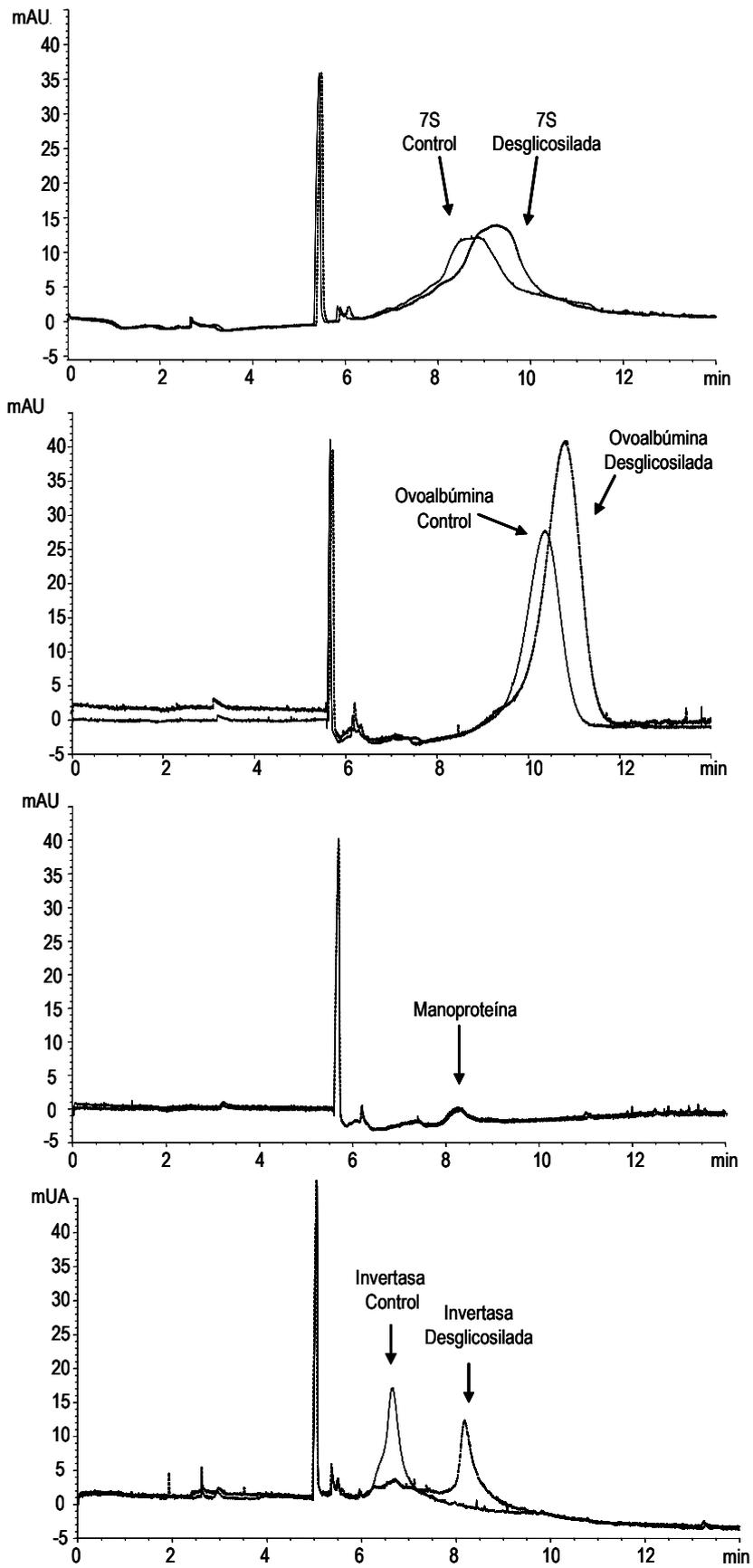


Figura 18. Electroferogramas de las glicoproteínas (línea continua) y sus formas desglicosiladas (línea discontinua).

El marcador de flujo electroosmótico, en este caso DMSO, mostró un tiempo de migración medio de $5,5 \pm 0,5$ min. En todas las muestras analizadas puede observarse un pico con igual tiempo de migración que el flujo electroosmótico, probablemente debido a la presencia de sustancias con carga neutra. Todas las glicoproteínas objeto de estudio están cargadas negativamente al pH de separación (8,5) y por tanto presentan menor movilidad electroforética (mayor tiempo de migración) que el marcador del flujo electroosmótico. Los electroferogramas correspondientes a 7S, ovoalbúmina e invertasa mostraron un único pico bien resuelto (línea continua) que difiere en tiempo de migración a las correspondientes glicoproteínas tratadas con PNGasa F (línea discontinua). En el caso de la manoproteína se observó un pico pequeño que no difiere en tiempo de migración de su forma desglicosilada.

La forma del pico de la 7S globulina puede deberse a fenómenos de agregación entre las distintas subunidades que conforman esta fracción proteica. El pico de 7S globulina desglicosilada se desplaza a tiempos de migración más largos (9,25 min) con respecto a la control (8,5 min). El tiempo de migración y la forma del pico obtenido para 7S coincide con los resultados descritos por Wong y col. (1994) en las mismas condiciones de separación electroforéticas empleadas en esta memoria.

El cambio en la movilidad electroforética en las muestras digeridas con PNGasa F respecto a las controles se puede también observar tanto para la ovoalbúmina (10,4 min control y 10,8 min desglicosilada) como para la invertasa (6,2 min control y 8,25 min desglicosilada), en este último caso la variación es mayor. Además, comparando el desplazamiento electroforético de la forma desglicosilada de la 7S y las otras glicoproteínas estudiadas, podemos decir que los resultados obtenidos por CZE coinciden con los de SDS-PAGE. Ovoalbúmina y 7S muestran un comportamiento similar debido muy probablemente a la similitud estructural de estas glicoproteínas.

La migración de las glicoproteínas se debe a la superposición de dos fenómenos: la electromigración y el flujo electroosmótico. En condiciones de electroforesis capilar de campo libre la aplicación del campo eléctrico causa que el tampón de separación se desplace de la entrada del capilar (ánodo) hacia la salida (cátodo), arrastrando todas las moléculas cualquiera que sea su carga en dirección del cátodo; pero la separación ocurre en función de la relación carga/masa.

Teniendo en cuenta los principios de separación antes expuestos podemos afirmar que las glicoproteínas han migrado de acuerdo a lo esperado. Los puntos isoeléctricos de las 4 glicoproteínas son ácidos (3.3-4.9) y sus masas también difieren lo que explica que sus tiempos de migración sean distintos. El tratamiento de desglicosilación disminuye las masas de las glicoproteínas haciendo que el tiempo de migración para estas muestras sea mayor.

En general, los resultados obtenidos mediante CZE coinciden y confirman los obtenidos por SDS-PAGE e indican la desglicosilación de las glicoproteínas por acción de la PNGasa F, con excepción de la manoproteína. Es de destacar que las condiciones de análisis son apropiadas para el estudio de las 4 glicoproteínas descritas en este apartado. La caracterización de glicoproteínas por medio de digestión y CZE con detección UV-Vis y/o espectrometría de masas ha sido llegado a cabo exitosamente también por otros autores (Balaguer y col., 2006; Berkowitz y col., 2005), pero nunca antes se había descrito para la 7S globulina.

4.2.6 RP- HPLC

Dado que el comportamiento de la 7S globulina y la ovoalbúmina es similar durante su desglicosilación con PNGasa F para el análisis por RP-HPLC se eligió esta glicoproteína para compararla por esta técnica. Los resultados se muestran en la **Figura 19**.

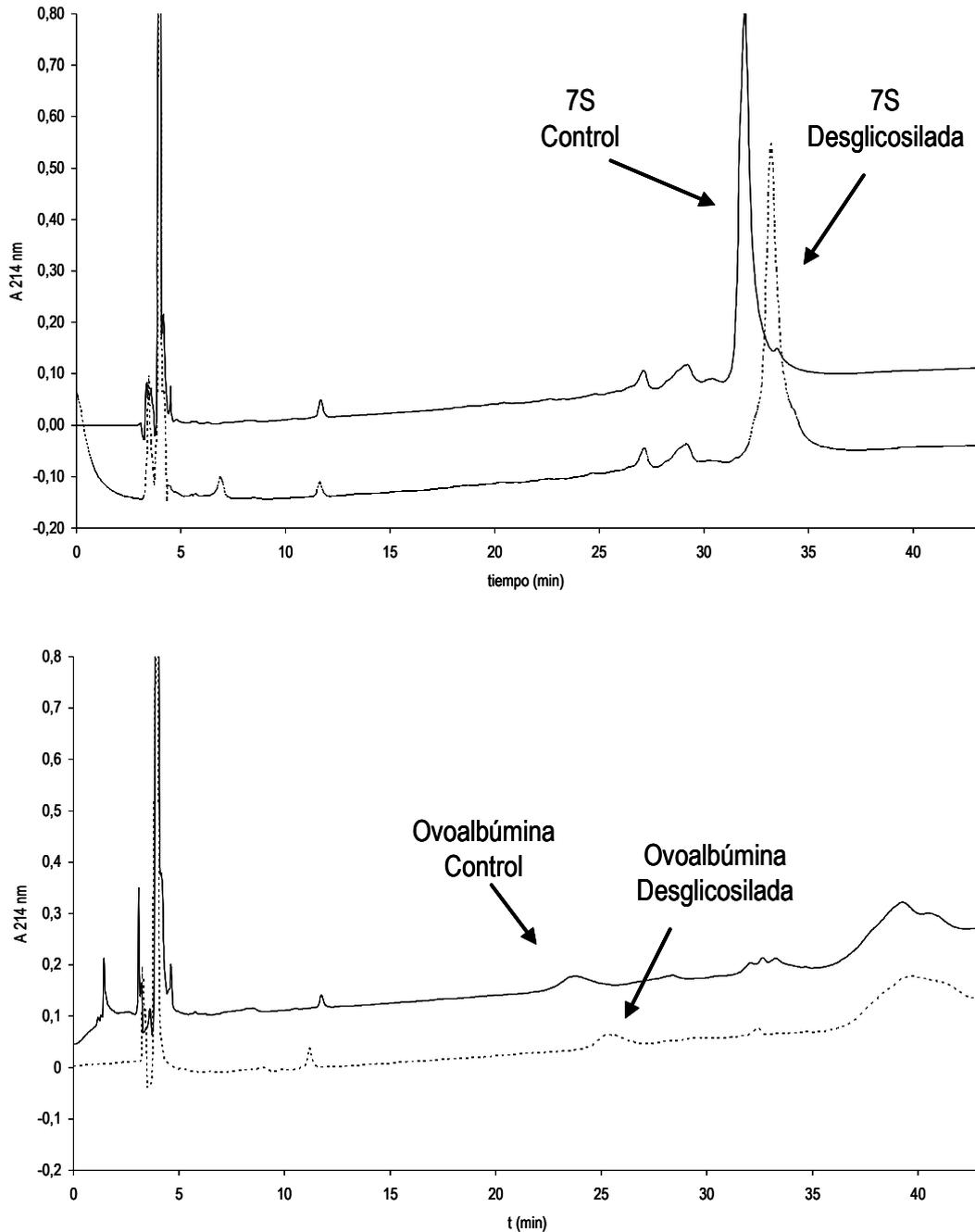


Figura 19. Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de las glicoproteínas controles (línea continua) y desglicosiladas (línea discontinua).

Las proteínas 7S y ovoalbúmina mostraron tiempos de retención superiores a los 20 min. La 7S globulina se retiene más por poseer mayor peso molecular de sus cadenas individuales comparada con la ovoalbúmina.

El análisis cromatográfico confirmó además el elevado grado de pureza de la fracción 7S obtenida por precipitación isoeléctrica según Nagano y col. (1992). El pico mayoritario de la 7S globulina eluye a los 32 min y corresponde a las subunidades α y α' que se encuentran en mayor cantidad en fracción de glicoproteína aislada. La identificación de las diferentes subunidades se llevó a cabo por colección de los picos separados por HPLC y análisis por electroforesis en gel en condiciones desnaturizantes y reductoras (datos no mostrados, Amigo-Benavent et al., en revisión). El pico correspondiente a la 7S desglicosilada presenta un tiempo de retención mayor (33,1 min). En el caso de la ovoalbúmina se produce un ligero cambio de perfil, aparece un pico con un tiempo de elución de 24 min en la control, que al desglicosilarse se retrasa a 25,1 min. Estos resultados coinciden con los descritos para los métodos de electromigración en apartados anteriores y apoyan la clara actividad glicosidasa de la enzima en las mezclas conteniendo 7S globulina y ovoalbúmina, así como el similar comportamiento en las técnicas de ambas glicoproteínas por su similar contenido en carbohidratos.

La separación de las proteínas ha tenido lugar de acuerdo al principio de separación empleado y las características estructurales de las distintas glicoproteínas y sus productos de desglicosilación. La separación se ha realizado en condiciones de gradiente, desnaturizantes y reductoras y fase inversa lo que hace que la interpretación de los resultados sea compleja. La presencia de los agentes desnaturizante y reductor tanto en la preparación de muestra y componente de la fase móvil hace que se separen las cadenas que conforman las glicoproteínas al menos con una resolución parcial. Las condiciones de separación en fase inversa permiten que las proteínas se separen en orden decreciente de polaridad. La elución de aquellas moléculas más apolares requiere de elevadas concentraciones de modificador orgánico. Sin embargo, también pueden influir otros factores que determinan la separación de las proteínas tales como la composición de la cadena polipeptídica, su masa molecular, la conformación, etc. Teóricamente se espera que la desglicosilación cause un aumento del tiempo de retención y su variación estaría determinada por el contenido de carbohidratos en la glicoproteína, siendo estos los resultados que hemos obtenido. La actividad enzimática de PNGasa F causa ligeros cambios en los tiempos de retención de las glicoproteínas 7S y ovoalbúmina de acuerdo con su contenido en carbohidratos (5%). Los resultados coinciden con los obtenidos por las técnicas de electromigración antes descritos que indican que la PNGasa F en las condiciones aquí ensayadas causa desglicosilación total de 7S.

4.3 Antigenicidad de la 7S globulina y su forma desglucosilada

Con objeto de conocer si la desglucosilación tiene efecto en la antigenicidad de la 7S globulina se llevó a cabo el análisis de sus formas desglucosiladas por inmunoblotting y ELISA indirecto. En la Figura 20 pueden observarse los resultados obtenidos por inmunoblotting de los productos de desglucosilación de la 7S empleando distintos tiempos de incubación y concentración de sustrato.

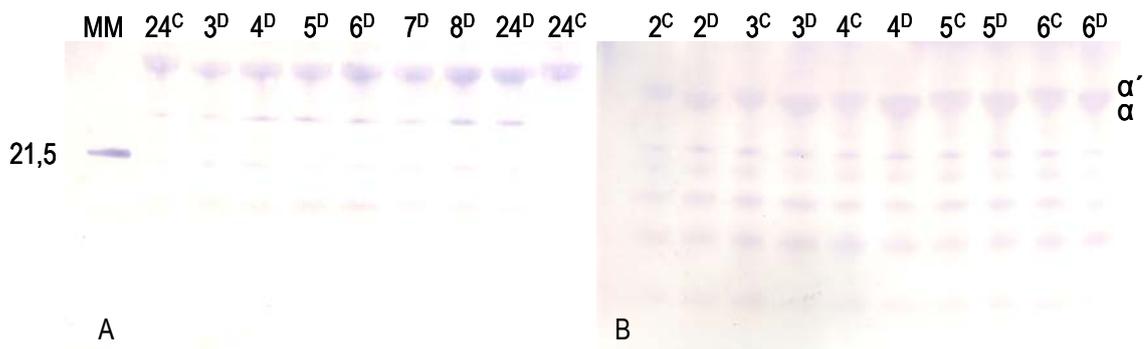


Figura 20. Inmunoblotting de la 7S y sus productos de desglucosilación empleando anticuerpos desarrollados en conejo contra soja total. (A) Efecto del tiempo de desglucosilación, donde: MM: marcadores de masa molecular; el número indica las horas de incubación y el superíndice control (C) y desglucosilada (D). (B) Efecto de la concentración de la 7S; el número indica la concentración de proteína en mg/mL y el superíndice control (C) y desglucosilada (D).

En ambos casos se observa un desplazamiento de las bandas correspondientes a la 7S desglucosilada que también son detectadas por los anticuerpos. Los resultados del inmunoblotting parecen indicar que el tiempo de actividad de la PNGasa F así como la diferencia en la concentración de sustrato no tienen influencia en la respuesta antigénica.

Con objeto de cuantificar la respuesta antigénica de 7S y sus productos de desglucosilación se realizó un análisis de las muestras mediante ELISA indirecto. Los valores de la respuesta antígeno-anticuerpo se muestran en la Tabla 4.

Muestra	Respuesta del antígeno –anticuerpo (%)
7S	100 ± 6,05
7S desglucosilada	99,84 ± 8,29

Tabla 4. Datos de antigenicidad obtenidos para la glicoproteína y su forma desglucosilada. Los valores representan la media ($n=3$).

Tras el análisis estadístico se obtuvo un valor de $p > 0,05$ indicando que no se observan diferencias significativas entre la glicoproteína y su forma desglucosilada. Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que los cambios estructurales producidos al desglucosilar enzimáticamente con PNGasa F la 7S globulina no interfieren en el reconocimiento antígeno-anticuerpo.

Los resultados obtenidos en la presente memoria concuerdan con los publicados por Fu y col. (2007), quienes desglucosilaron sólo la subunidad α de la 7S globulina y realizaron un análisis por inmunoblotting frente a anticuerpos desarrollados en cerdos jóvenes. Por el contrario, otros autores (Hiemori y col., 2000) han encontrado que la alergenicidad de la glicoproteína Gly M Bd 28K de la soja, sí disminuye al desglucosilar con PNGasa A. Nuestros resultados sugieren que el glicano unido a la 7S globulina no tiene que poseer la estructura $\alpha 1 \rightarrow 3$ fucosa o de tenerla no debe estar unida al núcleo principal de *N*-acetilglucosamina, ya que de ser así, la desglucosilación no habría podido producirse completamente con la enzima PNGasa F. La confirmación de esta hipótesis se realizará mediante técnicas estructurales tales como espectrometría de masas y RMN.

No obstante podría haber diferencias entre estos resultados y los anticuerpos empleados de distintas especies. Por tanto, es necesario la realización de experimentos empleando IgE aisladas de sueros de pacientes alérgicos a soja. Además se sabe que uno de los papeles que poseen los glicanos es proteger a la glicoproteína de la acción de proteasas y que la 7S globulina es resistente a la digestión gástrica (Lallès y col., 1999). Por tanto, también es necesario la realización de estudios de digestibilidad con proteasas de la 7S desglucosilada.

5. CONCLUSIONES

Del trabajo presentado en esta memoria pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. La actividad de la enzima PNGasa F (2U) causa la desglicosilación total de la 7S globulina (25 - 225 μ g) tras una hora de tratamiento, confirmando que ésta es una *N*-glicoproteína.
2. Las técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas ensayadas son adecuadas para la caracterización de la 7S globulina y la evaluación de los cambios estructurales producidos en esta glicoproteína por la actividad de la PNGasa F. La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturalizantes con tinción PAS resultó la técnica de electroseparación que proporciona mayor información acerca del grado de desglicosilación de esta glicoproteína.
3. Las técnicas inmunológicas empleadas permitieron la evaluación de la antigenicidad de la 7S. Información cualitativa y complementaria se obtuvo mediante immunoblotting mientras que el ELISA indirecto permitió cuantificar el grado de modificación de la respuesta antigénica de 7S como consecuencia de su desglicosilación total.
4. Los resultados sugieren que la cadena de glicanos unidas a las subunidades α y α' de la 7S no están involucrados de manera significativa en la respuesta antigénica de esta glicoproteína utilizando anticuerpos de conejo anti-proteína total de soja. Probablemente la antigenicidad de esta glicoproteína se deba a su parte proteica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalberse, R. C., Koshte, V. y Clemens J. G. J. (1981) *J Allergy Clin Immunol* 68, 356-364
- Agilent boletín técnico del producto 17044201 (2005)
- Ahrazem, O. y col. (2006) *Int Arch Allergy Immunol* 139, 96-103
- Amigo-Benavent, M., Silván, J. M., Moreno, F. J., Villamiel, M. y del Castillo (en revisión)
Food Chem Tox
- Babiker, E. E., Azakami, H., Ogawa, T. y Kato, A. (2000) *J Agric Food Chem* 48, 571-575
- Balaguer E. y col. (2006) *Electrophoresis* 27, 2638-2650
- Batanero, E., Crespo, J. F., Monsalve, R. I., Martín-Esteban, M., Villalba, M. y Rodríguez, R. (1999) *J Allergy Clin Immunol* 103, 147-153
- Berkowitz S. A. y col. (2005) *J Chromatogr A* 1079, 254-265
- Brooks J. R. y Morr, C. V. (1985) *J Am Oil Chem Soc* 62, 1347-1354
- Buehler, R. E., Vantoi, T. T. y McIntosh, G. H. (1989) *Seed Sci Technol* 17, 193-204
- Burks, A.W. y col. (1992) *J Allergy Clin Immunol* 90, 889-897
- Deak, N. A., Murphy, P. A. y Johnson, L. A. (2007) *J Am Oil Chem Soc* 84, 137-149
- Derbyshire, E., Wright, D. J. y Boulter, D. (1976) *Phytochemistry* 15, 3-24
- Dua V. K. y Bush C. A. (1984) *Anal Biochem* 137, 33-40
- Duranti, M. y col. (2004) *J Nutr* 134: 1334-1339.
- Duranti, M. (2006) *Fitoterapia* 77, 67-82
- Fan, J. Q. y Lee, Y. C. (1997) *J Biol Chem* 272, 27058-27064
- FAO. (1995) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of the FAO technical consultation on food allergies Rome, Italy.

- Foetish, K. y col. (2003) *J Allergy Clin Immunol* 111, 889-896
- Foucard, T. y Yman, I. M. (1999) *Allergy* 54, 261-265
- Fötisch, K. y Vieths, S. (2001) *Glycoconj J* 18, 373-390
- Franck, P. y col. (2002) *Int Arch Allergy Immunol* 128, 212-219
- Friedman, M. y Brandon, D. L. (2001) *J Agric Food Chem* 49, 1069-1086
- Fu, C. J., Jez, J. M., Kerley, M. S., Allee, G. L. y Krishnan, H. B. (2007) *J Agric Food Chem* in press, ver si ya está disponible
- Garcia, M. C., Torre, M., Marina, M. L. y Laborda, F. (1997) *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 37, 361-391
- García-Casado, G. y col. (1996) *Glycobiology* 6, 471-477
- García-Segura J. M. y col. (1996) en *Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica*, pp. 212-290, Editorial Síntesis, Madrid (España)
- Golbitz, P. y Jordan, J. (2006) en *Soy Applications in Food* (Riaz, M. N., ed.), pp. 1-21, Taylor and Francis, Boca Ratón (USA)
- Gonçalves, F., Heyraud, A., Norberta de Pinho, M. y Rinaudo, M. (2002) *J Agric Food Chem* 50, 6097-6101
- Hiemori, M. y col. (2000) *Int Arch Allergy Immunol* 122, 238-245
- Henriksson, G., Englund, A.-K., Johansson, G. y Lundahl, P. (1995) *Electrophoresis* 16, 1377-1380
- Herman, E. M., Helm, R. M., Jung, R. y Kinney, A. (2003) *Plant Physiol* 132, 36-43
- Invitrogen manual de instrucciones IM-1025F 061002 (2004)
- Invitrogen manual de instrucciones IM-8042F 061002 (2004)
- Invitrogen manual de instrucciones IM-6005B (2004)
- Jensen-Jarolim, E. y col. (2002) *Allergy* 57, 805-810

- Joao, H. C. y Dwek, R. A. (1993) *Eur J Biochem* 218, 239-244
- Kimura, Y., Ohno, A. y Takagi, S. (1997) *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 1866-1871
- Kobata, A. (1992) *Eur J Biochem* 209, 483-501
- Laffort, boletín técnico de Mannostab™ (2001)
- Lakshmanan, R., Lamballerie, M. y Jung, S. (2006) *J Food Sci* 71, E384-E391
- Lallès, J.-P. (1999) *J Agric Food Chem* 47, 2797-2806
- L'Hocine, L. y Boye, J. I. (2007) *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 47, 127-143
- L'Hocine, L., Boye, J. I. y Arcand, Y. (2006) *Food Chem Toxicol* 71, C137- C145
- Lessof, M. H. (1998). Food Allergy and other adverse reactions to food. 2ª edición, 1-23. Belgium, International Life Sciences Institute. ILSI Europe concise monograph series
- Lis, H. y Sharon, N. (1993) *Eur J Biochem* 218, 1-27
- Maruyama N. y col. (1998) *Eur J Biochem* 258, 854-862
- Maruyama, Y., Maruyama, N., Mikami, B., Utsumi, S. (2004) *Acta Cryst D60*, 287-297
- Mills, E. N. C., Jenkins, J. A. y Bannon, G. A. (2003) in Plant Food Allergens (Mills E. N. C. y Shewry, P. R. Eds.), pp 141-157, Blackwell Publishing, Oxford (Reino Unido)
- Nagano, T., Hirotsuka, M., Mori, H., Kohyama, K. y Nishinari, K. (1992) *J Agric Food Chem* 40, 941-944
- Newmann N. P. y Lampen, J. O. (1967) *Biochem* 6, 468-475
- Nisbet, A. D., Saundry, R. H., Moir, A. J., Fothergill, L. A. y Fothergill, J. E. (1981) *Eur J Biochem* 115, 335-345
- Ogawa, T., Bando, N., Tsuji, H., Nishikawa, K. y Kitamura, K. (1995) *Biosci Biotech Biochem* 59, 831-833
- Ogawa, T. (2006) in Soy in Health and Disease Prevention (Sugano, M., ed.), pp. 123-137, CRC Taylor & Francis group, Boca Raton

-
- Oomah, B. D., Voldeng, H. y Fregeau-Reid, J. A. (1994) *Plant Foods Hum Nutr* 45, 251-263
 - Ortega Anta, R. M., López Sobaler, A. M., Requejo Marcos, A. M. y Andrés Carvajales, P. (2004) La composición de los alimentos. Herramienta básica para la valoración nutricional., Editorial Complutense, Madrid
 - Paulsen, P. V., Welsby, D. y Huang, X. L. (2006) en *Soy Applications in Food* (Riaz, M. N.; ed.), pp 200-226, Taylor and Francis, Boca Ratón (USA)
 - Peñas, E., Préstamo, G., Polo, F. y Gomez, R. (2006a) *Food Chem* 99, 569-573
 - Peñas, E. y col. (2006b) *Eur Food Res Technol* 222, 286-290
 - Peterson, R. E. y Wolf, W. J. (1992) *Cereal Chem* 69, 101-102
 - Rodríguez, R. y Villalba, M. (1997) *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 12, 269-281
 - Rudd, P. M. y col. (1994) , *Glycoconj J* 9, 17-22
 - Schlags, W., Lachmann, B., Walther, M., Kratzel, M. y Noe, C. R. (2002) *Proteomics* 2, 679-682
 - Shibasaki, M. y col. (1980) *Int Arch Allergy Appl Immunol* 61, 441-448
 - Sigma boletín técnico del producto R1153 (2001)
 - Sigma boletín técnico del producto I-4504 (2002)
 - Small, G. J. y Hemingway, J. (2000) *Insect Biochem Mol Biol* 30, 443-453
 - Souci, S. W., Fachmann, W. y Kraut, H. (2000) *Food Composition and Nutrition Tables*, Medpharm Scientific Publishers, London
 - Tai, T., Yamashita, K., Ito, S. y Kobata, A. (1977) *J Biol Chem* 19, 6687-6694
 - Takahashi, K., Banba, H., Kikuchi, A., Ito, M. y Nakamura, S. (1994) *Breed Sci* 44, 65-66
 - Takamatsu, K., Tachibana, N., Matsumoto, I. y Abe, K. (2004) *Biofactors* 21, 49-53

- Tarentino, A. L. y Plummer, T. H. (1994) Enzymatic Deglycosylation of Asparagine-Linked Glycans - Purification, Properties, and Specificity of Oligosaccharide-Cleaving Enzymes from *Flavobacterium-Meningosepticum*, completar
- Thanh, V. H. y Shibasaki, K. (1977) *Biochim Biophys Acta* 490, 370-384
- Torres.N., Torre-Villalvazo, I. y Tovar, R. (2006) *J Nutr Biochem* 17, 365-373
- Tsuji, H. y col. (1997) *Biosci Biotech Biochem* 61, 942-947
- Tsumura, K., Saito, T., Kugimiya, W. y Inouye, K. (2004) *J Food Sci* 69, C363-C367
- Usui, M. y col. (2004) *Nahrung-Food* 48, 69-72
- van de Lagemaat, J., Silván, J. M., Moreno, F. J., Olano, A. y del Castillo, M. D. (2007) *Food Res Int* 40, 153-160
- Weber, A., Schöeder, H., Thalberg, K. y März, L. (1987) *Allergy* 42, 464-470
- Wilson, S., Blaschek, K. y Gonzalez de Mejia, E. (2005) *Nutr Rev* 63, 47-58
- Wong, T. M., Carey, C. M. y Lin, S. H. C. (1994) *J Chromatogr A* 680, 413-417
- Yamanishi, R. y col. (1995) *Food Sci Technol Int* 1, 14-17
- Yamauchi, F., Kawase, M., Kanbe, M. y Shibasaki, K. (1975) *Agric Biol Chem* 39, 873-878
- Yao, Z y col. (1999) *J Nucl Med* 40, 479-483
- Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H. y Woodlock, J. J. (1969) *Anal Biochem* 30, 148-152
- Ziegler, F. D., Maley, F. y Trimble, R. B. (1988) *J Biol Chem* 263, 6986-6992

Páginas Web

<http://foodallergens.ifr.ac.uk>