

TESIS DOCTORAL

**Impacto del procesado mediante
tecnologías térmicas y no-térmicas en el
potencial alergénico de la
 β -Lactoglobulina**

Janire Orcajo Lago
2017

Directores:

Dr. Iñigo Martínez de Marañón Ibabe
Dra. María Lavilla Martín



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero mostrar mi agradecimiento al Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco por concederme la beca predoctoral que me ha permitido llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

Asimismo, a mis Directores Iñigo Martínez de Marañón y María Lavilla, por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollar este proyecto formando parte de la Unidad de Investigación Alimentaria de AZTI. Gracias por los conocimientos transmitidos, el esfuerzo y la dedicación para lograr que este trabajo haya salido adelante.

Tanto los Directores como la presente Doctoranda, agradecemos al Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología (UPV-EHU) por acoger este proyecto y facilitarnos su desarrollo y presentación, especialmente a Jorge Martínez, Tutor de esta Tesis Doctoral.

Del mismo modo, hemos de destacar la importante aportación del Centro Técnico de Investigación VTT de Finlandia, así como del Servicio de Alergología del Hospital de Basurto, por ceder amablemente material clave en el desarrollo de esta labor investigadora. De otra forma, este trabajo no hubiera sido posible.

Mi más sincero agradecimiento a todos mis compañeros del Área de Calidad, Seguridad e Integridad Alimentaria, incluido el personal de Análisis Físico-Químico, que de una manera u otra me han ayudado a lo largo de esta Tesis. Con gran afecto a Elisa Jiménez, compañera especial donde las haya; gracias por tu interés, tu apoyo y tus consejos, han sido cruciales para seguir adelante aportando claridad en el trayecto. De nuevo a María Lavilla, no sólo por ser una gran directora de Tesis, sino también por ser buena compañera, hasta de viaje. Al resto de compañeros de AZTI-Derio, porque sois muchos los que tanto dentro como fuera del laboratorio me habéis ayudado y habéis hecho los días más llevaderos. Mikel Orive, gracias por echar un cable siempre que ha hecho falta y gracias más aún por hacerme las horas de laboratorio más cañeras. A Esther San Martín y a Amaia Lasagabaster, con quienes he compartido parte de mi última etapa como Doctoranda y me han hecho sentir desde el principio una integrante más del equipo de proyecto. A Pilar Torre, gracias por contagiarnos con tu alegría y por tus ánimos tanto en lo profesional, como en lo personal, y también en lo deportivo; tampoco me olvido del cariño y los abrazos de Kauxk. Igualmente a Ziortza Cruz, Eduardo Puértolas, Bruno Iñarra, Eli Bilbao, Mónica Gutiérrez, Eduardo Saitua, Sandra Rainieri, Itziar Fernández, Kepa Escudero, Carlos Bald,..., y en general a todos aquellos y aquellas que no he nombrado pero que en algún momento hemos intercambiado una sonrisa.

También de los centros de Sukarrieta y Pasaia las aportaciones han sido numerosas, en especial de Iratxe Menchaca, María Uyarra y Javi Franco, compañeros eventuales de biblioteca. Siempre es un placer contar con vuestra visita.

Como no podía ser de otra manera, a vosotros que habéis sido más que compañeros, que a día de hoy sois amigos y confidentes. Nerea Arias, Nadia Conlledo, Ekaitz Martínez, Jone Ibarruri, Javier Amézaga y Mertxe Caro, no os voy dar las gracias porque sé que la mejor forma de demostrar lo importantes que habéis sido para mí estos años es con un buen hamaiketako y un plan de los nuestros en los que las historias infinitas están servidas, sobre todo si se acompañan de las peculiares visitas Mostoleñas. Mil gracias por lo pasado y por lo que vendrá.

Puesto que las andaduras doctorales se iniciaron antes de comenzar este proyecto, quiero dar mención a quienes me abrieron la puerta por primera vez, desde la Universidad de Oviedo, a Manuel Rendueles, Benjamín Paredes e Ismael Marcet. Gracias por todo lo aprendido con vosotros y seguir en contacto a pesar de la distancia y del tiempo transcurrido desde entonces. Igualmente, quiero señalar a mis entonces compañeros doctorales que tanto me apoyaron en el cambio. Al otro lado de los laboratorios, mi cuadrilla asturiana; el destino nos cruzó por casualidad llegados desde León, Argentina, Andalucía, País Vasco y, por supuesto, Asturias. Poco queda ya de “los martes de chicas” pero las criaturas que han llenado vuestras vidas merecen la pena. Gracias por el apoyo en mi primera etapa como doctoranda en la *tierrina*, y más aún por haber seguido a mi lado en esta segunda aventura.

A mis amigas de la juventud, media vida pasada con vosotras. A pesar de lo complicado que resulta coincidir todas, cuando nos esforzamos por lograrlo es como si el tiempo no pasara. Serán las ganas de divertirnos y olvidarnos de los problemas cuando estamos juntas. Se os quiere.

A quien me ha seguido desde mis inicios, prácticamente desde el principio de mi formación, en mis idas y venidas, vivencias en el extranjero, años fuera de casa, y aún así siempre me ha apoyado y animado a seguir adelante. Gracias por los empujones y no suponer nunca un obstáculo.

Mi mayor cariño, a mi familia, pilar fundamental en este recorrido. Especialmente a mis padres, por su apoyo incondicional en todo momento; todas las palabras serían pocas. A mis tíos y tías, primos mayores y pequeños, y la pequeña que está en camino y va a convertir a “la rubia” en bisabuela. Esa abuela que con sus 85 años no para de darnos lecciones, mantiene la familia unida y que en la cocina sigue poniendo el listón por las nubes. Todos vosotros sois mi mayor apoyo. Mil gracias.

RESUMEN

La β -Lactoglobulina (β -Lg) es considerada el principal alérgeno de la fracción sérica de la leche siendo una proteína con alta estabilidad al pH ácido y la digestión enzimática, lo que le permite pasar intacta a través de la mucosa gastrointestinal y desencadenar la reacción alérgica. Aunque se haya visto previamente que el tratamiento térmico de la leche mejora la digestibilidad de la β -Lg, afectando a su capacidad alergénica, sin embargo, el procesado térmico puede provocar alteraciones no deseadas en la calidad organoléptica, nutricional o propiedades físico-químicas de los diferentes productos alimenticios. Por ello, en este trabajo se procedió a estudiar el impacto de tecnologías alternativas como son la luz pulsada, las altas presiones hidrostáticas y el tratamiento térmico asistido por presión (TTAP), sobre la inmunoreactividad de la β -Lg. Para ello, previamente se desarrolló una metodología inmunoenzimática tipo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) competitivo indirecto (ciELISA), basada en anticuerpos recombinantes tipo E (IgEr) específicos de β -Lg, que permitió medir el potencial alergénico de la proteína en diferentes matrices lácteas que diferían en pH, composición y procesado tecnológico aplicado (tratamiento térmico tradicional y tecnologías alternativas). Para todas las matrices lácteas analizadas, se observó una reducción lineal de la inmunoreactividad con el incremento de la temperatura entre 75 y 105°C, descenso que ocurrió muy rápidamente (< 1 min). La influencia de la temperatura en la disminución de la inmunoreactividad de la β -Lg mediada por IgEr fue también muy relevante en TTAP, en particular para temperaturas finales de tratamiento altas (95 y 115°C). Sin embargo, un TTAP a 115°C y 600 MPa provocó una inhibición casi total del reconocimiento de la proteína mediante IgEr, contrariamente a un tratamiento térmico (115°C) a presión atmosférica donde todavía un 20-30% de la unión no fue inhibida. Durante la fase de presurización del TTAP se produjo una disminución de la inmunoreactividad que sería debido al efecto combinado de la presión con el incremento de la temperatura por encima de un umbral crítico a partir del cual ocurrió una disminución de la unión entre la β -Lg y la IgEr. En el caso de aplicar TTAP menos intensos (500-600MPa / 75°C), se puso en evidencia un efecto sinérgico de la presión y de la temperatura provocando una disminución de la inmunoreactividad de β -Lg, descenso que no fue apenas observado cuando se aplicaron separadamente esos niveles de presión (a temperatura ambiente) o de temperatura (a presión atmosférica). Estas diferencias en inmunoreactividad estarían asociadas a cambios estructurales en la proteína en función del procesado. Mientras que un tratamiento a 600 MPa llevado a cabo a temperatura ambiente indujo la formación de dímeros de β -Lg, un tratamiento al mismo nivel de presión aplicándose a 75°C (TTAP 600 MPa/75°C) produjo que tanto el estado monomérico de la β -Lg como sus agregados sufrieran una desnaturalización gradual con el tiempo de exposición. La formación de estructuras complejas de β -Lg también se pudo observar al exponer la proteína a un tratamiento de luz pulsada, modificaciones que conllevarían una reducción del reconocimiento de la β -Lg por parte de la IgEr así como por

otros anticuerpos empleados típicamente en kits ELISA de detección, las IgG. La disminución de la inmunoreactividad mediante luz pulsada ocurrió muy rápidamente; sin embargo, ocurrió de forma diferente para cada tipo de anticuerpo, probablemente por las diferencias en la concentración de proteína en el medio en los distintos estudios, mostrando un efecto protector frente a los pulsos de luz a mayor concentración de proteína. Del mismo modo, se observó una diferencia de reconocimiento de la β -Lg mediante anticuerpos de plasmas de pacientes alérgicos a las proteínas de la leche de vaca. Mientras que para plasmas de algunos pacientes el reconocimiento de la β -Lg procesada mediante luz pulsada no se vio afectado, en otros casos se evidenció un mayor reconocimiento indicando una mayor antigenicidad de la proteína procesada. Esta diferencia en la respuesta resalta la importancia de la capacidad de reconocimiento que presenta cada tipo de anticuerpo a la hora de evaluar el potencial alergénico de las proteínas. Por otro lado, más allá de las diferencias en el reconocimiento de la β -Lg por parte de los diferentes anticuerpos, se ha visto que la luz pulsada mejoró la hidrólisis de la proteína mediante pepsina lo que podría favorecer la digestión enzimática de la β -Lg en el organismo, afectando a su capacidad alergénica.

En resumen, este trabajo aporta nuevos datos que permiten una mejor comprensión del efecto que puede llegar a tener el procesado de los alimentos sobre el potencial alergénico de la β -Lg. Sin embargo, aún se debe profundizar en el conocimiento de las modificaciones estructurales, inducidas por los procesos tecnológicos, que dan lugar a cambios en la inmunoreactividad de las proteínas, de tal forma que se puedan ofrecer nuevas alternativas, desde sistemas de detección basados en IgE hasta nuevos procesos para la transformación de alimentos, sin comprometer la seguridad y salud de los individuos con alergias alimentarias.

ABSTRACT

The protein β -Lactoglobulin (β -Lg) is considered the main allergen in the fraction of cow whey milk. The β -Lg presents high stability to acidic pH and enzymatic digestion, properties that allow the protein to pass through gastrointestinal tract and to trigger an allergenic reaction. Heat treatment of milk has been proved to enhance the digestibility of β -Lg and therefore, to alter its allergenic capacity. However, thermal treatments can affect the organoleptic, nutritional and physic-chemical properties of the food products.

Thus, this work has been focused on the impact of alternative technologies such as pulsed light, high hydrostatic pressure, and pressure-assisted thermal processing (PATP) on the immunoreactivity of β -Lg. For that purpose, previously an indirect competitive ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) was developed. The ELISA technique here developed was based on type E recombinant antibody (IgEr) β -Lg specific, allowing measuring the allergenic potential of the protein in different food matrices with different pH, medium composition and technological process applied (traditional thermal treatment and alternative technologies). For each matrix analyzed, a lineal loss of the immunoreactivity with the increment of the temperature between 75 and 105°C was observed. This reduction was very quickly (< 1 min). The influence of the temperature in the reduction of the immunoreactivity of the β -Lg IgEr mediated was also very relevant in PATP, especially for high final temperatures (95 and 115°C). Nonetheless, a PATP at 115°C and 600 MPa provoked an inhibition almost total on the recognition of the protein by the IgEr, contrary to a heat treatment (115°C) at atmospheric pressure where still a 20-30% of the union remained. In the pressurization step of the PATP a reduction of the immunoreactivity happened, probably due to a combined effect of the pressure with the temperature rise reaching to a critic threshold from which a decrease on the union of the β -Lg with the IgEr took place. At lower intensities of PATP (500-600 MPa / 75°C), a synergic effect of the pressure and temperature was evidenced by a reduction in the immunoreactivity of the β -Lg, a decrease hardly observed when these levels of pressure (at room temperature) or temperature (at atmospheric pressure) were applied in isolation. These differences on the immunoreactivity could be associated with structural changes of the protein depending on the technological process applied. Meanwhile at 600 MPa processing at room temperature induced the formation of β -Lg dimers, a treatment at the same pressure level applying at 75°C (TTAP 600 MPa / 75°C) resulted in both the monomeric state of the β -Lg as its aggregates underwent a gradual denaturation with the exposure time. The formation of the complex structures of β -Lg could also be observed by the exposition of the protein to a pulsed light treatment. These modifications would lead to a reduction in the recognition of β -Lg by IgEr as well as by other antibodies typically used in ELISA detection kits, the IgG. The decrease in immunoreactivity by pulsed light was very quickly but different for each type of antibody, probably because of differences in protein

concentration between both studies, showing a protective effect against light pulses at higher protein concentration. Likewise, a difference in recognition of β -Lg was observed by the antibodies from plasma of allergic patients to cow's milk proteins. For some plasma, the recognition of the pulsed light processed β -Lg was not affected, whereas an increase of the antigenicity was evidenced in other cases. This fact highlights the importance of the recognition capacity of each kind of antibody when evaluating the protein allergenicity. Further from the differences on recognition of the β -Lg by the different antibodies, it has been proven that the pulsed light is capable to enhance the digestibility of the protein by pepsin enzyme which could favour the enzymatic digestion affecting its allergenic capacity.

In summary, this work provides new data which allow a better understanding of the effect that can have the food processing on the allergenicity of the β -Lg. However, there is still a necessity of going in deep on the knowledge of the structural modifications that alter the immunoreactivity of the proteins in order to offer new alternatives to the market, from detection systems based on IgE to new processes for the food transformation, without comprising the health of the patients with food allergies.

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------|
| α -La | α -Lactalbumin / α -Lactoalbúmina |
| AA | Amino Acid |
| Ac _s | Anticuerpo secundario |
| AGE | Advanced Glycation End products |
| APLV | Alérgicos a las Proteínas de Leche de Vaca |
| β -Lg | β -Lactoglobulin / β -Lactoglobulina |
| BSA | Bovine Serum Albumin / Albúmina Sérica Bovina |
| Cas | Casein / Caseinas |
| CMA | Cow's Milk Allergy |
| CMP | Cow's Milk Proteins |
| de | desviación estándar |
| DO / OD | Densidad Óptica / Optical Density |
| e.g. | for example |
| EU | Europe |
| FA | Food Allergy |
| FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FI | Food Intolerance |
| DBPCFC | Double-Blind, Placebo-Controlled, oral Food Challenge |
| EAACI | European Academy of Allergy and Clinical Immunology |
| EAST | Enzyme Allergosorbent Test |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| GLP | Good Laboratory Practices |
| HHP/APH | High Hydrostatic Pressure / Altas Presiones Hidrostáticas |
| HPLC | High-Performance Liquid Chromatographic |
| Ig | Immunoglobulin / Inmunoglobulina |

| | |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| IgEr | Inmunoglobulina E recombinante |
| LAB | Lactic Acid Bacteria |
| Lf | Lactoferrin |
| LOD | Limit of Detection |
| MS | Mass-Spectrophotometry |
| MW | Molecular Weight |
| NIAID | National Institute of Allergy and Infectious Disease |
| OGM | Organismos Genéticamente Modificados |
| OVO | Ovoalbúmina |
| PATP/TTAP | Pressure-Assisted Thermal Processing / Tratamiento Térmico Asistido por Presión |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PBST | Phosphate Buffered Saline with Tween 20 |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| RAST | Radio-Allergosorbent Test |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| SH | Sulfhidrilo |
| sIgE | serum-specific IgE |
| SOP | Standard Operating Procedures |
| SPT | Skin-Prick Test |
| S-S | enlaces disulfuro |
| SSF | Suero Salino Fisiológico |
| T _a | Temperatura ambiente |
| TT | Tratamiento Térmico |
| UHT | Ultra-High Temperature |
| UV | Ultra Violet / Ultravioleta |
| WHO | World Health Organization |
| WPC | Whey Protein Concentrate |
| WPI | Whey Protein Isolated |

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1.4.2. | Effect of milk processing on allergenicity..... | 16 |
| 1.4.2.1. | Effect of homogenization | 16 |
| 1.4.2.2. | Effect of thermal processing..... | 17 |
| 1.4.2.3. | Effect of hydrolysis | 20 |
| 1.4.3. | Emerging technologies for preventing cow's milk allergy..... | 21 |
| 1.5. | Novel alternatives on food processing..... | 22 |
| 1.5.1. | Introduction | 22 |
| 1.5.2. | Pulsed light..... | 22 |
| 1.5.2.1. | Background and legal aspects of pulsed light..... | 22 |
| 1.5.2.2. | Theoretical basis and process description | 22 |
| 1.5.2.3. | Applicability of pulsed light in the food industry | 24 |
| 1.5.2.3.1. | Antimicrobial effect | 24 |
| 1.5.2.3.2. | Whey proteins modification..... | 25 |
| 1.5.2.3.3. | Impact on allergenicity..... | 26 |
| 1.5.3. | High hydrostatic pressure | 26 |
| 1.5.3.1. | Background and legal aspects of high hydrostatic pressure | 26 |
| 1.5.3.2. | Theoretical basis and process description | 27 |
| 1.5.3.3. | Applicability of high hydrostatic pressure to food industry..... | 29 |
| 1.5.3.3.1. | Antimicrobial effect | 29 |
| 1.5.3.3.2. | Effect on food color, texture and sensory qualities | 30 |

| | |
|------------------------------------------------------|-----------|
| 1.5.3.3.3. Effect on food yield..... | 30 |
| 1.5.3.3.4. Effect on food proteins | 30 |
| 1.5.3.3.5. Effect on allergenicity | 31 |
| 2. Objetivos..... | 33 |
| 3. Materiales y Métodos | 37 |
| 3.1. Materiales | 39 |
| 3.1.1. Inmunoquímica..... | 39 |
| 3.1.2. Plasmas de pacientes APLV..... | 39 |
| 3.1.3. Medios y disoluciones | 40 |
| 3.1.4. Digestión enzimática..... | 40 |
| 3.1.5. Electroforesis..... | 40 |
| 3.1.6. Otros productos | 40 |
| 3.2. Métodos | 41 |
| 3.2.1. Preparación de medios | 41 |
| 3.2.2. Preparación de muestras | 41 |
| 3.2.2.1. Disoluciones de β -Lg purificada..... | 41 |
| 3.2.2.2. Leche desnatada | 42 |
| 3.2.2.3. Lactosuero ácido..... | 42 |
| 3.2.2.4. Lactosuero industrial..... | 42 |
| 3.2.3. Procesado de muestras..... | 44 |
| 3.2.3.1. Tratamiento térmico..... | 44 |
| 3.2.3.2. Pulsos de luz | 44 |
| 3.2.3.3. Procesado por altas presiones..... | 46 |
| 3.2.3.4. Liofilización..... | 48 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.4. Ensayos inmunoenzimáticos..... | 48 |
| 3.2.4.1. ELISA directo..... | 48 |
| 3.2.4.2. Inmunoreactividad por ELISA competitivo indirecto..... | 49 |
| 3.2.4.3. Detección de β -Lg por sándwich ELISA | 50 |
| 3.2.4.4. Inmunodotting..... | 51 |
| 3.2.5. Otros experimentos y análisis..... | 51 |
| 3.2.5.1. Electroforesis Native-PAGE..... | 51 |
| 3.2.5.2. Digestibilidad <i>in-vitro</i> | 52 |
| 3.2.5.3. Electroforesis SDS-PAGE..... | 53 |
| 4. Desarrollo de un ELISA competitivo para evaluar la inmunoreactividad de la β-Lg medida por IgE..... | 55 |
| 4.1. Introducción y objetivo | 57 |
| 4.2. Resultados y discusión | 58 |
| 4.2.1. Ensayos inmunoenzimáticos para muestras no procesadas..... | 59 |
| 4.2.1.1. ELISA directo para β -Lg purificada..... | 59 |
| 4.2.1.2. ELISA competitivo indirecto para β -Lg purificada | 60 |
| 4.2.1.3. Manejo del ciELISA con matrices alimentarias..... | 61 |
| 4.2.2. Validación de ELISA competitivo indirecto para muestras procesadas..... | 63 |
| 4.3. Conclusión | 66 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5. Impacto de los pulsos de luz sobre la inmunoreactividad de la β-Lg | 69 |
| 5.1. Introducción y objetivo | 71 |
| 5.2. Resultados y discusión | 73 |
| 5.2.1. Caracterización por electroforesis..... | 73 |
| 5.2.2. Ensayos inmunoenzimáticos..... | 75 |
| 5.2.2.1.Detección de β -Lg (reactividad IgG)..... | 75 |
| 5.2.2.2.Afinidad de las IgE recombinantes con β -Lg purificada procesada por pulsos de luz | 77 |
| 5.2.2.3.Afinidad de las IgE recombinantes con β -Lg en matrices alimentarias procesadas por pulsos de luz | 79 |
| 5.2.3. Digestibilidad..... | 82 |
| 5.2.3.1.Digestión <i>in-vitro</i> con pepsina | 82 |
| 5.2.3.2.Electroforesis SDS-PAGE de los péptidos de β -Lg purificada | 83 |
| 5.3. Conclusión | 86 |
| 6. Impacto de las Altas Presiones Hidrostáticas y del Tratamiento Térmico Asistido por Presión sobre la inmunoreactividad de la β-Lg | 87 |
| 6.1. Introducción y objetivo | 89 |
| 6.2. Resultados y discusión | 91 |
| 6.2.1. Caracterización por electroforesis..... | 92 |
| 6.2.2. Ensayos inmunoenzimáticos..... | 96 |
| 6.2.2.1. Afinidad de IgE recombinante con β -Lg purificada procesada por APH y TTAP | 96 |
| 6.3. Conclusión | 105 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7. Impacto de los pulsos de luz en la inmunoreactividad de la β-Lg frente a plasmas sanguíneos..... | 107 |
| 7.1. Introducción y objetivo..... | 109 |
| 7.2. Resultados y discusión..... | 110 |
| 7.2.1. Inmunodotting..... | 111 |
| 7.2.2. Estudio de las condiciones óptimas de análisis por ELISA directo..... | 114 |
| 7.2.3. ELISA competitivo para muestras no procesadas..... | 116 |
| 7.2.3.1.ELISA competitivo para β -Lg purificada..... | 117 |
| 7.2.3.2.ELISA competitivo indirecto para lactosuero..... | 119 |
| 7.2.4. ELISA competitivo para muestras procesadas por pulsos de luz..... | 121 |
| 7.2.4.1. Impacto de los pulsos de luz en la unión entre la β -Lg purificada y los anticuerpos de pacientes APLV..... | 122 |
| 7.2.4.2. Impacto de los pulsos de luz en la unión entre la β -Lg del lactosuero y los anticuerpos de pacientes APLV..... | 124 |
| 7.2.4.3. Impacto de los pulsos de luz en la alergenicidad de la β -Lg frente a una mezcla plasmática de pacientes APLV..... | 128 |
| 7.3. Conclusión..... | 130 |
| 8. Conclusiones generales..... | 133 |
| 9. Perspectivas de futuro..... | 137 |
| 10. Bibliografía..... | 141 |

Dedicado a
M^a Esther y Jose Ignacio,
mis padres.



1. Introduction

1.1. Food Allergy

1.1.1. Epidemiology

During the past 50-60 years, the frequency of atopic diseases has increased in many Western countries. They now represent a substantial burden to healthcare systems and the society (Deckers *et al.*, 2012; Anandan *et al.*, 2009; Anandan *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2004; Schoenwetter *et al.*, 2004). Whilst the incidence of these diseases may have peaked in some settings (Anandan *et al.*, 2010), it has been suggested that the frequency of food allergy (FA) appears to have increased during the last 10-20 years (Allen and Koplin, 2012; Sampson, 2005; Prescott and Allen, 2011; Lack, 2012; Sicherer, 2011), leading to the thought that FA may have different risk factors (Allen and Koplin, 2012; Prescott and Allen, 2011).

FA is an important health problem (Sampson, 2004) and its prevalence in Europe is commonly estimated around 0.1-3.2% for adults and 0.1-5.7% for children. Most cases of FA are associated with a limited range of products; however, the extent to which allergy is associated with particular foods varies with time and geography, with changing dietary habits and preferences, the introduction of new foods, the way in which food is prepared, and the age at which foodstuffs are first introduced into the diet (Hourihane, 1998; Lucas *et al.*, 2004).

1.1.2. Definition of Food Allergy

Correct diagnosis of FA is of great importance to avoid falsely labelling the patient as food allergic or not allergic. Due to different terminology used in allergy and to facilitate clear communication between health professionals, the EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) proposed and recommended a nomenclature for the allergy (Johansson *et al.*, 2001) that has been updated and reviewed by the World Allergy Organization (WAO) in 2003 (Johansson *et al.*, 2004). According to its proposal, adverse non-toxic reactions to food should be termed 'Food Hypersensitivity' while 'Food Allergy' term should be used when an immunologic mechanism is demonstrated (**Figure 1**). FA can be further characterized by the fact the immunological mechanism involves immunoglobulin (Ig) E antibodies or not. Other reactions to food, previously referred as 'Food Intolerance' (FI), should be called non-allergic food hypersensitivity (WHO, 2006). Given that, FA can be defined as an adverse reaction to food that is mediated through immunological mechanisms. Such reactions can be provoked in sensitized subjects following dietary exposure to relevant allergens in food (Verhoeckx *et al.*, 2015).

The most common immunological mechanism implicated in the acquisition of sensitization to food proteins is the elaboration of IgE antibodies. Although non-IgE-mediated cellular immune responses are also important in some forms of FA (Johnston *et al.*, 2014; Kimber and Dearman, 2002; Sicherer and Sampson, 2014), this work will be only focused on IgE-mediated FA.

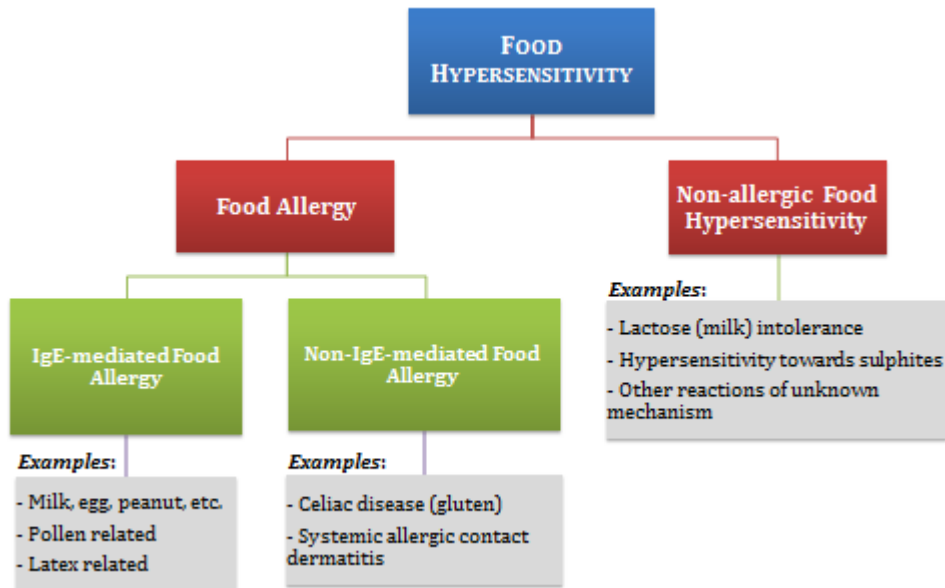


Figure 1. Terms used for adverse reactions to food and some examples (WHO, 2006)

1.1.3. Symptoms of Food Allergy

Symptoms of food allergies vary between different individuals and an individual can likewise tend to vary the reactions each time the allergenic food is consumed. Allergic reactions to foods generally occur within a few minutes to one hour after eating the offending food but reactions may be delayed for anything up to 48 hours. The severity of an allergic reaction is affected by the amount of the allergen consumed, by the preparation of the food and by the sensitivity of the allergic person. The signs and symptoms of FA may involve many systems, these reactions may occur anywhere in the body (Soliman, 2013). FA-related symptoms generally arise every time the offending food is eaten and range from mild discomfort to severe, life-threatening reactions that may require immediate medical intervention (EuroPrevall, 2009). The most common signs and symptoms of a FA (UCFA-Utrecht Center of Food Allergy, 2012) include:

- Hives, itching, or skin rash.
- Swelling of the lips, face, tongue and throat, or other parts of the body.
- Wheezing, nasal congestion, or trouble breathing.
- Abdominal pain, diarrhea, nausea, or vomiting.
- Dizziness, lightheadedness, or fainting.

In a severe allergic reaction to food -called anaphylaxis- it may have more extreme versions of the above reactions or may experience life-threatening signs and symptoms such as:

- Swelling of the throat and air passages that make it difficult to breathe.
- Shock, with a severe drop in blood pressure.
- Rapid, irregular pulse.
- Loss of consciousness.

1.1.4. Mechanism of Food Allergy

Many food allergies are caused by hypersensitivities to particular proteins in different foods. Even though the mechanisms by which an individual develops an allergy to specific foods are largely unknown (Sampson *et al.*, 2006), and the IgE-mediated FA is categorized as Hypersensitivity Type I (Cruvinel *et al.*, 2010).

The development of a FA can be divided into two phases: sensitization and symptom development (Herz, 2008). The sensitization phase is characterized by the production of an allergen-specific IgE antibodies response and their binding to tissue mast cells. Subsequent exposure of the sensitized individual to the same allergen, or to an immunologically cross-reactive protein, cross-linking mast cell-associated IgEs causes degranulation and the release of preformed and newly synthesized mediators (like histamines), as it is shown in **Figure 2**. This provokes local and/or systemic inflammation reactions (Dearman and Kimber, 2009). The latter phase results in structural mucosal changes that limit therapeutic options at this disease stage, that is why strategies to prevent the onset and the persistence of an allergic manifestation are needed (Herz, 2008).

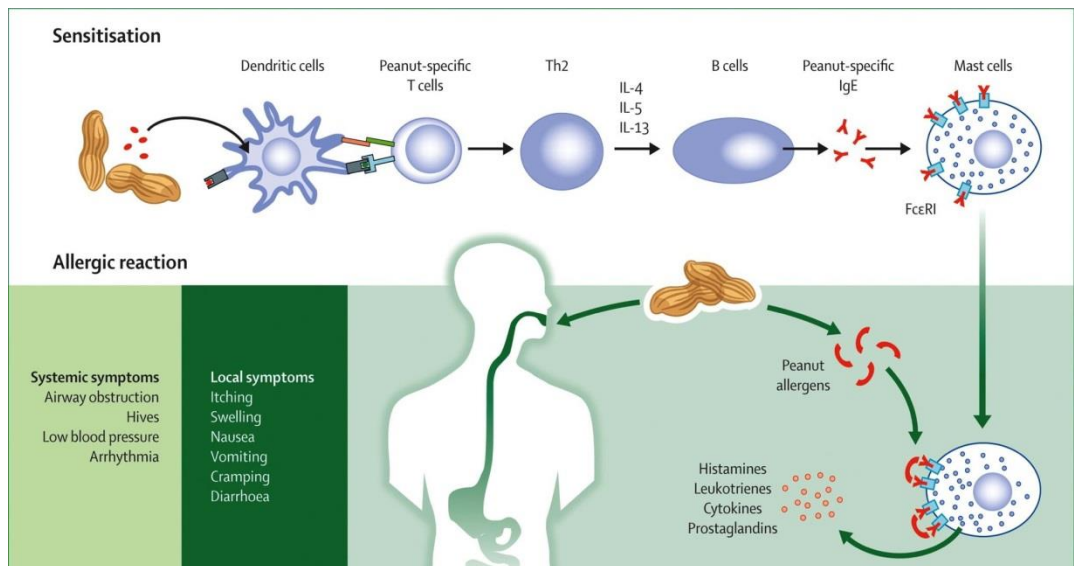


Figure 2. Food IgE-mediated allergy sensitization and reaction (Burks, 2008)

The only reliable treatment of FA at this moment is strict avoidance of the problematic foods and food ingredients.

1.2. Food Allergens

1.2.1. Introduction to Food Allergens

In food allergy (FA), the allergens are proteins or glycoproteins that induce the production of antibodies IgE that bind the allergens triggering the liberation of inflammatory intermediaries by the target cells (Lehrer *et al.*, 1996).

The allergens present epitopes that are those portions of the allergenic protein which bind to the specific (IgE) antibody and are therefore responsible for immunoreactivity and allergy. Epitopes may be sequential, or continuous, when they correspond to a fragment (peptide) of the primary sequence of the molecule, or they may be configurational, or discontinuous, when they correspond to distant fragments of the amino acid chain, brought close together by the folding and spatial configuration of the molecule. Their sizes range from 4 to 6 and 15 to 22 amino acid residues, depending on the molecule and the methods of study (Van Regenmortel, 1994).

Food allergens can be classified in terms of sensitization procedure into:

- allergens type I, when the sensitization takes place in the gut after the food allergen consumption; and
- allergens type II, when the sensitization is due to cross-reactivity between aeroallergens and foods.

The allergens type I are glycoproteins with a molecular weight between 10 and 70 kDa. Commonly, these allergens are resistant to heat, acidic pH and enzymatic digestion by contrast with type II allergens that are sensitive to heat and can lose their antigenicity by enzymatic proteolysis or acidic pH (Sampson and Burks, 2008).

1.2.2. Foods Containing Allergens

Most cases of FA are associated with a limited range of products. Previously the most commonly allergenic foods were considered to be cows' milk, hens' eggs, peanuts, tree nuts, soy, wheat, shellfish and fish (the 'big 8') (Hefle *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1994). Those foods are recognized by the FDA as allergenic foods in the United States of America (FDA, 2010). By contrast, that list has been expanded in Europe to 14 foodstuffs: cereals containing gluten, crustaceans, molluscs, eggs, fish, peanuts, tree nuts, soybeans, milk, celery, mustard, sesame, lupin and sulphur dioxide (Regulation EU No 1169/2011). According to this difference concerning allergenic foods regulation, the danger of people travelling abroad and being unaware that their allergy is not recognised, and therefore potentially not being declared on food products, becomes obvious.

1.3. Cow's Milk Allergy & Allergens

1.3.1. Introduction to Cow's Milk Allergy

The incidence of allergic diseases is increasing in westernized countries, and one of the first allergies to develop in life is cow's milk allergy (CMA) (Branum and Lukacs, 2009). CMA incidence characteristically peaks during early childhood and tends to recede later. The prevalence of confirmed CMA is reported to be 0.6–2.5% in pre-schoolers, 0.3% in older children and teens, and less than 0.5% in adults. However, the self-perceived prevalence is higher: 1–17.5% in pre-schoolers, 1–13.5% in older children and teens, and 1–4% in adults (Fiocchi *et al.*, 2010). In fact, 15% of allergic children remain allergic. This phenomenon, resulting in dietary restriction, may impair the quality of life of both child and family, impede children's growth, and induce unnecessary health care cost (Koletzko *et al.*, 2012). In patients with persistent CMA, the repetitive exposure to cow's milk proteins could result in chronic allergic inflammation accompanied along with anatomical and physiological defects, including eosinophilic gastroenteropathies (Galli *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2013). CMA patients, particularly the persistent cases, also develop substantial predisposition to respiratory allergies, such as asthma, in their later life, a phenomenon labelled as atopic march (Sprickelman *et al.*, 2000; Sampaio *et al.*, 2005).

From an immunological point of view, CMA is an IgE-mediated reaction to cow's milk. However, no dairy products could also be responsible for this type of allergy since cow's milk proteins (CMP) are used as processing aids and therefore a large number of food products may contain residual amounts of CMP (Wal, 2004).

1.3.2. Cow's Milk Allergens

Milk is an excellent source of fat, proteins, minerals and vitamins. On average, cow's milk consists of 90% water, 5% carbohydrates (48 g/L lactose, and minor to trace amounts of glucose and galactose), and 3–5% proteins (30–50 g/L). The action of chymosin (rennin), or the acidification of the milk to pH 4.6 results in the segregation of proteins into two fractions: lactoserum (whey), which contains approximately 20% of the CMPs (approximately 6 g/L), and coagulum (curd) with approximately 80% of the CMPs (approximately 28–30 g/L). The protein composition of cow's milk (Wal, 2002) and the names of allergens included in the official international list (Restani *et al.*, 2009) are shown in **Table 1**. The allergen nomenclature describes the taxonomic name of the origin source, e.g. cow (Bos d is *Bos domesticus*), and a number indicating the chronological order in which the allergen was identified as such (Bos d 4–8) (Tsabouri, 2014). Bos d 1–3 are not involved in food allergies and so they will not be considered in this introduction. The only protein not present in human milk is β -Lactoglobulin (β -Lg).

Table 1. Characteristics of cow's milk proteins and their inclusion in the official list of allergens
(Tsabouri *et al.*, 2014)

| Fraction | Protein | Allergen Name | g/l | % total protein | MW (kDa) | Number of AA | pI | |
|-----------------------|-----------------------|----------------|-------------|-----------------|-----------|--------------|---------|-----|
| Caseins | | | ~30 | 80 | | | | |
| | α_{S1} -casein | <i>Bos d 8</i> | 12-15 | 29 | 23.6 | 199 | 4.9-5.0 | |
| | α_{S2} -casein | | 3-4 | 8 | 25.2 | 207 | 5.2-5.4 | |
| | β -casein | | 9-11 | 27 | 24.0 | 209 | 5.1-5.4 | |
| | γ_1 -casein | | | | | 20.6 | 180 | 5.5 |
| | γ_2 -casein | | 1-2 | 6 | 11.8 | 104 | 6.4 | |
| | γ_3 -casein | | | | | 11.6 | 102 | 5.8 |
| | K-casein | | 3-4 | 10 | 19.0 | 169 | 5.4-5.6 | |
| | | | | ~5.0 | 20 | | | |
| Whey proteins | α -La | <i>Bos d 4</i> | 1-1.5 | 5 | 14.2 | 123 | 4.8 | |
| | β -Lg | <i>Bos d 5</i> | 3-4 | 10 | 18.3 | 162 | 5.3 | |
| | Ig's | <i>Bos d 6</i> | 0.6-1.0 | 3 | 160.0 | - | - | |
| | BSA | <i>Bos d 7</i> | 0.1-0.4 | 1 | 67.0 | 583 | 4.9-5.1 | |
| | Lf | | 0.09 | Traces | 800.0 | 703 | 8.7 | |
| Total Proteins | | | 36.0 | 100 | | | | |

AA = number of amino-acids residues per molecule
MW = molecular weight

In the coagulum, the whole casein (Cas) is consisted of 4 major proteins (α_{S1} -caseins, α_{S2} -caseins, β -caseins and k-caseins, *Bos d 8*) where in the whey the major proteins are α -Lactalbumin (α -La, *Bos d 4*) and β -Lg (*Bos d 5*) are the most important allergens (Natale *et al.*, 2004; Wal, 2004; Dalglish and Corredig, 2012). Other whey proteins are bovine serum albumin (BSA, *Bos d 6*), lactoferrin (Lf), and immunoglobulins (*Bos d 7*) (Natale *et al.*, 2004). These last proteins are considered as minor allergens, although recently, Gaudin *et al.* (2008), using a sensitive microarray assay, have shown that lactoferrin can be classed as one of the strong and frequent (41%) allergens in cow's milk.

The whey proteins are highly structured proteins with stable secondary and tertiary structures. The major forces responsible for maintaining their globular structure are disulphide bonds, hydrophobic interactions, hydrogen bonding, ion-pair interactions and van der Waal's interactions (Singh and Havea, 2003). The native composition of the whey proteins makes them highly soluble in the milk over a broad range of pH. This is due to the large proportion of hydrophilic residues on the surface of the globular structure and the large amount of disulphide bonds (Dissanayake and Vasiljevic, 2009).

β -Lg is the major whey protein, accounting for 50% of total protein in the whey fraction and 12% of the total protein content (Jarvinen *et al.*, 2001; Wal, 2002; Coscia *et al.*, 2012; Giovanna *et al.*, 2012). This protein is a good source of many essential amino acids (Smithers, 2008) and also has some highly regarded physical functional properties such as gelling,

emulsifying and foaming (Chevalier *et al.*, 2001). However, its application in food manufacturing is limited due to its allergenic potential (Hattori *et al.*, 2004). Therefore, the present work was focused on the β -Lg, one of the major bovine milk allergens, responsible for almost 80% of cow milk allergies (Bu *et al.*, 2009b).

1.3.2.1. β -Lactoglobulin, Bos d 5

1.3.2.1.1. Structure and Properties of β -Lg

β -Lactoglobulin (β -Lg) occurs naturally in the form of a 36 kDa dimer. Each subunit corresponds to a 162-residue polypeptide. The molecule possesses two disulphide bridges and one free cysteine (Jayat *et al.*, 2004). This structure is responsible for the main physicochemical properties and also for interaction with other proteins, as the caseins, during technological treatments (Reddy *et al.*, 1988). The tertiary structure of β -Lg is known and shown in **Figure 3**.

This protein belongs to the lipocalin superfamily (Sawyer, 2003). Lipocalins bind and carry hydrophobic ligands. They share well conserved sequences in their N-terminal parts, with tryptophan always present at position 19. Crystallography studies revealed a very similar conical-shaped tertiary structure called β -barrel (or calyx), with the same arrangements of 8 (or 10) anti parallel β -strands (Kontopidis *et al.*, 2004). These kinds of molecules have a high allergenic potential. Specifically, β -Lg is one of the best characterized lipid-binding proteins and as such it is capable of binding a wide range of molecules including retinol, β -carotene, saturated and unsaturated fatty acids, aliphatic hydrocarbons vitamins, and cholesterol (Breiteneder and Mills, 2005) thanks to the interior of the calyx which contains a hydrophobic pocket that allows the union (Wu *et al.*, 1999; Kontopidis *et al.*, 2002; Loch *et al.*, 2011).

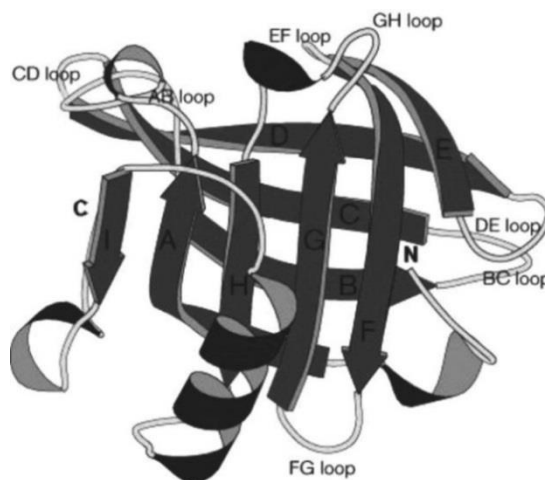


Figure 3. Schematic representation of a single subunit of β -Lactoglobulin lattice X. The β strands and joining loops are labelled (Brownlow *et al.*, 1997)

Depending on the medium conditions as pH, temperature, and salt concentration, β -Lg can alter its structural configuration and exists as a monomer, dimer, or octamer (Sakurai *et al.* 2001):

- **pH dependent manner:** Under physiological conditions (neutral pH and β -Lg concentration $>50 \mu\text{M}$), β -Lg is predominantly dimeric. Although the dimer interface buries only 6% of the monomer surface area, it involves 12 intermolecular hydrogen bonds and 2 ion pairs (Brownlow *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1998), and these specific interactions have been shown to be critical for dimer stability (Kobayashi *et al.*, 2002; Sakurai and Goto, 2002). At pH 2 to 3, β -Lg is essentially monomeric under salt-free conditions (Baldini *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 2001). In the pH range 3.7 to 5.2, β -Lg can reversibly forms a larger oligomer depending on the salt conditions (Piazza and Iacopini, 2002). This self-association process has a maximum around pH 4.6, just below the isoelectric point.

- **Temperature:** The heat-induced aggregation of β -Lg has been extensively studied under a wide range of experimental conditions, such as pH, ionic strength, protein concentration, and heating temperature (Iametti *et al.*, 1995; Manderson *et al.*, 1998; Hoffmann and Van Mil, 1999). Heating above 70°C results in the dissociation of the dimer into monomers and the exposure of hydrophobic AA and free thiol/sulfhydryl groups (McKenzie, 1971; Iametti *et al.*, 1995, 1996). This leads to the formation of a reactive monomer that undergoes sulfhydryl–disulfide exchange reactions to form non-native dimers. These non-native dimers react further to form intermediate oligomers and larger aggregates (Schokker *et al.*, 1999).

- **Salt concentration:** Salt concentration takes more importance at lower pHs where β -Lg is found in monomer-dimer equilibrium. While the native monomer is the major species under low salt conditions at pH 3, it has been shown that an increase in the salt concentration stabilizes the dimer (Joss and Ralston, 1996). However, the thermodynamic mechanism by which salt stabilizes the dimer is unknown. Sakurai *et al.*, (2001) demonstrated that addition of salt at pH 3 shifts the equilibrium to the dimer because counterion binding to the positive charges of the monomer suppresses the charge repulsion; consequently, the intrinsic forces stabilizing the native dimer manifest themselves. Harwalkar and Kalab (1985) showed that at low protein and NaCl concentrations, β -Lg remains soluble upon heating at pH 2.5, but at high concentrations of protein and NaCl gels or precipitates are formed.

The β -Lg structure endows it with exceptional resistance to denaturants such as heat and digestive enzymes, especially to pepsin (Breiteneder and Mills, 2005; Creamer *et al.*, 2011), which is associated with its complex structure characterized by a hydrophobic pocket with stability in acidic pH (Chicón *et al.*, 2008). This resistance results in non-fragmentation of the epitopes which can cross the intestinal barrier, be absorbed, and bind to the antibodies of sensitive individuals unleashing an allergic process, even when the β -Lg is present at low concentration in the foods (Mouécoucou *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2011).

1.3.2.1.2. Allergenicity of β -Lg

Allergic reactions are triggered by parts of protein called epitopes that bind with specific antibodies and provoke adverse immune reactions (Lehrer *et al.*, 1996). In β -Lg, both conformational epitopes (discontinuous AA sequences whose function is based on the tertiary or quaternary structure of protein) and linear or sequential epitopes (continuous sequences of AA that determine the primary structure of protein) contribute to the antigenic response (Kleber *et al.*, 2004). Therefore, modifying these epitopes in proteins may modulate the antigenic responses of milk proteins.

Seló *et al.* (1999) used trypsin digestion to investigate the allergenicity of β -Lg and have shown that there are many allergenic epitopes spread all over the β -Lg structure. Some of them are short linear sequences, while others are more complex consisting of large fragments that may contain conformational epitopes or parts of epitopes. The peptides recognized by 97, 92 and 89% of human sera were the fragments AA102-124, AA41-60 and AA149-162, respectively. A second group of peptides AA1-8, AA25-40, AA92-100 was recognized by 58–72% of human sera and the last group accounting for peptides AA9-14, AA84-91 and AA92-100 was recognized by 40%. Jarvinen *et al.* (2001) used synthetic peptides covering the amino acid sequence of β -Lg and identified seven different IgE epitopes and six IgG binding regions that are largely in agreement with the human sera binding β -Lg fragments described by Seló *et al.* (1999). A number of the β -Lg epitopes were mentioned as a marker for persistent CMA. In addition to B cell epitopes, T cell epitopes of β -Lg have also been described (Inoue *et al.*, 2001) and are reported in **Table 2**.

Table 2. IgE binding epitopes from β -Lg in transient and persistent allergic patients (Monaci *et al.*, 2006)

| B cell epitope | | T cell epitope |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Sera 11 patients (4-18 years) persistent CMA | Pool sera 8 patients (<3 years) outgrow CMA | 4 donors |
| 1-16 LIVTQTMKGLDIQKVA | | 1-21 LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYS |
| 31-48 LLDAQSAPLRVYVEELKP | | 14-29 KVAGTWYSLAMAASDI |
| 47-60 KPTPEGDLEILLQK | 49-60 TPEGDLEILLQK | 30-47 SLLDAQSAPLRVYVEELK |
| 67-78 AQKKHIAEKTKI | | 47-67 KPTPEGDLEILLQKWENGECA |
| 75-86 KTKIPAVFKIDA | 119-128 CQCLVRTPEV | 77-97 KIPAVFKIDALNENKVLVLDT- DYKKYLLFCM |
| 127-144 EVDDEALEKFDKALKALP | 129-138 DDEALEKFDKAL | 97-117 TDYKKYLLFCMENSAPPEQSL |
| 141-152 KALPMHIRLSFN | 143-152 LPMHIRLSFN | 142-162 ALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI CQCLVRTPEV |

1.3.2.1.3. Detection Methods for β -Lg

Due to the low cost of milk proteins together with their technological properties (eg. emulsification, foaming, gelling capacity, ...) has led to their widespread use as ingredients in the world food industry. In spite of food regulations, processed foods could contain a large variety of ingredients, including allergenic dairy proteins, that may not be included on the label. Reliable detection methods for milk allergens are then necessary to ensure compliance with labelling legislation and improve consumer protection

Several analytical procedures for the determination of milk presence in food products have been developed, targeting either the allergen (milk proteins) or markers (DNA fragments). Currently, the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) is the most commonly used method in food laboratories to detect and quantify hidden milk protein allergens in foods (Demeulemester *et al.*, 1991; Poms *et al.*, 2004; Monaci *et al.*, 2006). During the past few years, several methods for the detection of milk residues in food products have become commercially available as test kits, which are generally based on competitive ELISA. They detect either BSA, casein, β -Lg, or unspecified whey proteins with detection limits between < 2.5 and < 5 mg/kg. In addition, sandwich-type ELISA test kits for the determination of milk residues (targeting β -Lg) in food products are on the market with sensitivities down to 1 mg/kg (Poms *et al.*, 2004). However, some authors have demonstrated the effectiveness of other detection methods for β -Lg detection or/and quantification. The most characteristic techniques for β -Lg detection are described below:

- **ELISA:** The Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) technique is the most commonly method used in laboratories of the food industry and official food control agencies to detect and quantify hidden allergens in food. It is also the most widely used form of immunoassay in milk analysis and has advantages such as high sensitivity, low cost and fast application. It is easy to use, reliable, rapid and readily automated (Bottero *et al.*, 2002; Popelka *et al.*, 2002). In the last few years, there has been an increasing demand of rapid and reliable techniques for detection of milk allergens in food products and as a consequence, various commercial ELISA kits from different manufactures have entered the market. Two ELISA approaches are available for the quantification of allergens or proteins of potentially allergenic food, sandwich ELISA and competitive ELISA. The first one is the most common type of immunoassay for the detection of potential food allergens, while the competitive ELISA is the preferred format for the detection of relatively small proteins. Competitive ELISA methods have been described for some food allergens with sensitivities down to 0.1 mg/kg.

- **SDS-PAGE & Immunoblotting:** One-dimensional sodium dodecyl sulphate (SDS) polyacryl gel electrophoresis (PAGE) followed by immunoblotting represents the standard procedure for protein/allergen separation and identification. SDS-PAGE and immunoblot with human IgE antibodies are used extensively to identify and characterize new allergens (Pastorello and Trambaioli, 2001). Bovine milk proteins (α -La and β -Lg) were found down to

levels of 0.1% in soy protein by employing SDS-PAGE and immunoblotting (Molina *et al.*, 1998). The major disadvantages of SDS-PAGE and immunoblotting for routine food analysis are the elaborate and time-consuming procedures and the reliance on appropriate human sera.

- **Biosensors:** Biosensors have also been employed to determine β -Lg in food with a detection limit of < 10 mg/kg (Jonsson, 2002) and even have proved to be able to discriminate between intact and degraded β -Lg milk protein in dairy products with LOD (Limit of Detection) of 85 ng/mL (Dupont and Muller-Renaud, 2006). Nevertheless, up to date this test is not available in a kit format.

- **HPLC:** A perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed by Garcia *et al.* (1998) simultaneously to separate soybean and bovine whey proteins (α -La and β -Lg), which achieved results in a very short analysis time. However, the method was not able to detect milk residues lower than 1%.

- **Mass-Spectrophotometer:** Czerwenka *et al.* (2007) introduced the concept of internal standards for the quantification of β -Lg in different cows' milk products. After sample preparation (lipid removal and casein precipitation), proteins were separated by liquid chromatography using a C8 column. The mass spectrometer was in full-scan mode to acquire the entire charge state distributions of the proteins. A good correlation was found between bovine β -Lg concentration in the whole milk analyzed (3.25 ± 0.15 g/L) and previous literature reports.

The properties and particularities of the different methods for the allergen detection greatly influence the determination of immunoreactive β -Lg present in processed food. Therefore, it is very important to know the pitfalls of any assay before it is used to generate data which will be used in risk assessment.

1.3.2.1.4. Measurement of the Protein Allergenic Potential

The protein function (including enzymatic activity), stability (including resistance to proteolytic digestion) and glycosylation patterns can affect both immunogenic and allergenic potential (Huby *et al.*, 2000). The allergenic potential of proteins can also be influenced by the food matrix and the applied process to transform it, as it has been reported in several studies (Mills *et al.*, 2009; Nowak-Wegrzyn and Fiocchi, 2009; Lepski and Brockmeyer, 2013; Jiménez-Saiz *et al.*, 2014). Therefore, sensitive and specific analytical tests are required for the identification and the characterization of the allergenic potential of proteins to ensure consumer safety.

Even though no methodologies have been described to assess the allergenic potential of dairy proteins, the methodologies for assessing the potential allergenicity of novel food proteins, which were reported by the Food and Agriculture Organization/World Health

Organization (FAO/WHO) (2001), could be considered. The five standardized methodologies are:

- **Sequence homology as derived from allergen databases:**

The commonly used protein databases (PIR, SwissProt and TrEMBL) contain the amino acid sequences of most allergens for which this information is known. However, bioinformatical analysis can predict, but not directly evaluate, the allergenic potential of food proteins.

- **Specific serum screening:**

Serum screening based on the testing of serum IgE binding to the introduced protein can determine the potential risk of cross-reactivity for those with known allergens (Goodman, 2008). However, there was little correlation between the serum IgE antibody level and the severity of the clinical symptoms (Sharman *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2013).

- **Targeted serum screening:**

The targeted serum screening is conducted with serum samples that contain high levels of IgE antibodies with a specificity that is broadly related to the gene source. If the targeted serum screening is positive, then the protein is considered likely allergenic. If the targeted serum screening is negative, then pepsin resistance of the expressed protein and the immunogenicity of the expressed protein in suitable animal models are to be assessed to determine the likelihood that the protein will be allergenic.

- **Pepsin resistance:**

Purified or enriched expressed protein (non-heated and non-processed) should be subjected to pepsin degradation conditions using Standard Operating Procedures and Good Laboratory Practices (SOP/GLP). However, as well as for the bioinformatical analysis, the pepsin digestion assay cannot evaluate the allergenic potential of a protein.

- **Animal models:**

Conversely, animal models can detect the potential of a protein to induce IgE-mediated allergic reactions *in-vivo*, but the natural complexity makes it difficult to identify a validated animal model for evaluating the allergenicity to food proteins (Ladics *et al.*, 2008). Furthermore, none of the animal models has yet proved to be relevant for determination of human IgE-binding epitopes and thus for assessing and predicting the allergenic potential of specific proteins in humans (Wal, 1991).

This allergy assessment strategy has been widely adopted by the agricultural biotechnology industry for the evaluation of the potential allergenicity of the novel gene products (proteins) in genetically modified foods (Metcalf *et al.*, 1996). However, it presents some disadvantages and to overcome these problems, immunological assays like ELISA's, typical used for allergen detection, are currently of considerable interest to study the allergenic activity of food proteins. Nonetheless, there are multiple methods for food allergen detection that employ antibodies that may not be implicated in the hypersensitivity reactions and a validated model with IgE for predicting the allergenic potential of processed food must be developed.

1.4. Impact of Cow's Milk Processing on Allergenicity

1.4.1. Introduction to Raw Cow's Milk Processing for Consumption

In developed countries cow's milk is extensively processed before consumption, as can be seen in milk processing flow diagram (**Figure 4**), and rarely consumed in its raw form. Upon harvesting, milk is cooled to 4°C, stored and transported in stainless steel tanks at 4°C. Then the milk is centrifuged to separate the milk fat from the skimmed milk residue. The next step is standardising fat content, which is the industrial addition of milk fat to the milk in a specified ratio. This ratio determines the type of milk produced: skimmed milk (1% or less fat), semi-skimmed milk (2%) or whole-milk (>3.25%) (Chandan and Kilara, 2011). Finally, the milk is heated. Most commonly used heat treatment conditions are: pasteurisation (heating milk to 70–80°C for 15–20 seconds), sterilisation (110–120 °C for 10–20 minutes) and ultra-high temperature (UHT) processing (135–145°C for 0.5–4 seconds) (Claeys *et al.*, 2013; EFSA, 2014). After heating, the milk is immediately cooled down to a temperature below 4°C and packaged.

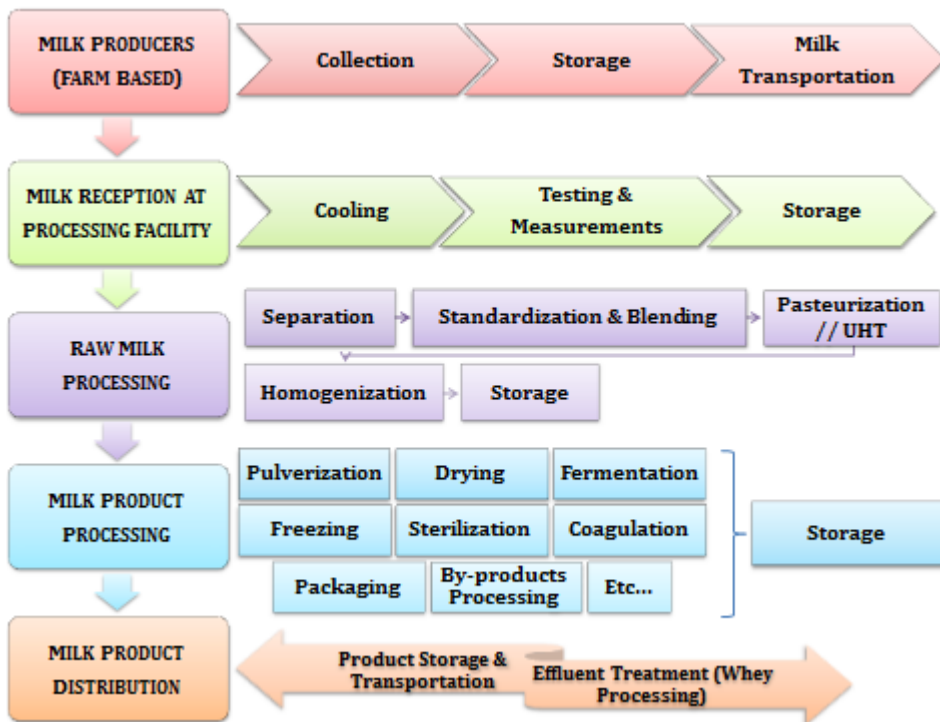


Figure 4. Generic Dairy Milk Processing Flow Chart

Attending to the kind of dairy product to be produced, the milk is further processed (eg. condensation, spray drying, filtration, hydrolysis...).

1.4.2. Effect of Milk Processing on Allergenicity

Food processing can alter the allergenic properties of proteins by altering their structure, namely hiding, destroying, or disclosing allergic epitopes through conformational changes in proteins besides improving the access of the hidden epitopes located within the protein to the gastrointestinal enzymes (Villas-Boas *et al.*, 2012).

Human studies that analyse the effect of processing on milk and its allergens are very scarce. The experimental design in almost all studies involving humans is not targeted at analysing processing effects, which would require, e.g. comparing a challenge with raw milk vs. challenge with milk that has been treated in a strictly defined way, but rather serves a clinical setting, to test, e.g. diagnostic procedures, establish eliciting doses, or to test a therapeutic approach. Most data presented in this section refer to *in-vitro* test results.

1.4.2.1. Effect of Homogenisation

Homogenisation of milk is the process in which fat globules are pressed at high pressure through small holes. During this process, the large lipid globules are broken to

smaller globules increasing the surface area of the milk lipid globules, causing proteins to adsorb to it and forming fat globules loaded with protein that replace part of the milk lipid membrane. In raw milk most of the antigenic determinants are inside the casein micelles, while homogenization of milk increases the exposed antigenic determinants. Little *in vivo* research is done on the effect of homogenisation on the allergenicity of milk proteins. Poulsen *et al.* (1987) showed, in a murine model, that homogenised milk and pasteurised milk triggered anaphylactic reaction. In addition, they found that the potential of homogenised milk to trigger anaphylactic reactions increased with fat content. On the other hand, Pelto *et al.* (2000), performing a randomised, double-blind, cross-over study on humans, found no significant differences in allergenicity between the groups treated with and without homogenised milk. This finding was supported by DBPCFC performed by Host and Samuelsson (1988), stating that homogenisation had no effect on the allergenicity of milk.

The homogenisation-promoted adsorption of protein at globules interfaces could lead to an unfolded state since it is known that interfacial adsorption of β -Lg causes some unfolding (Husband *et al.*, 2001). Such unfolded states are generally more dynamic and are likely to be more effective substrates for pepsin (Kageyama, 2002), increasing the rate of digestion of β -Lg at least ten fold once adsorbed to the oil-water interface (Macierzanka *et al.*, 2009). This suggests that adsorption-induced changes in the conformation and/or flexibility of β -Lg may allow pepsin to cleave the proteins much more effectively than in solution, which could decrease the allergenicity of β -Lg.

1.4.2.2. Effect of Thermal Processing

The degree of structural changes of proteins occurring during heating depends on both the type of protein and the intensity of thermal treatment. The suggested mechanisms include initial unfolding of a protein molecule, loss of secondary and tertiary structure, formation of intra and/or inter-molecular covalent and non-covalent interactions. Caseins are heat stable because they do not have secondary, tertiary and quaternary structures that can be disrupted by heating, implicating that heating of milk can only partly reduce its allergenicity (Michalski and Januel, 2006; Bu *et al.*, 2013). By contrast, whey proteins denature progressively upon heat treatment (Chandan and Kilara, 2011). Conditions such as pH and ionic strength are important factors for heat mediated denaturation of β -Lg (Schmitt *et al.*, 2009) and thus can influence related changes in allergenicity. For example, compared to neutral pH, heating of β -Lg at acidic pH (pH 3) leads to unfolding of protein molecule, exposure of β strands and partial acid hydrolysis, which could contribute to the appearance of some new epitopes resulting in enhanced antigenicity (Rahaman *et al.*, 2015).

Moreover, thermal treatment can induce the Maillard reaction by interaction of the dairy proteins with the sugars such as lactose during heating (Maillard, 1912), which alters the availability of epitopes affecting the antigenicity of milk. The effects of the Maillard reaction conditions on the antigenicity of β -Lg and α -La in the conjugates of whey protein

isolated (WPI) with glucose were investigated using response surface methodology (Bu *et al.*, 2009a, 2010a). The results showed that the conjugation of WPI with glucose effectively reduced the antigenicity of β -Lg and α -La via *in-vitro* detection of competitive ELISA with rabbit serum. The inhibition rates of the antigenicity of both whey proteins under optimal reaction condition were over 90%.

Heat treatment can also mediate interactions between the different dairy proteins. The main aggregates formed as a consequence of heat treatment of milk, are complexes formed by aggregation of denatured whey proteins and complexes between β -Lg and κ -casein on the surface of the casein micelles via disulphide bonds and hydrophobic interactions. At temperatures below 70°C the interaction is mostly caused by hydrophobic interactions while at higher temperatures it is mostly caused by disulphide bonds (O'Connell and Fox, 2011).

The effects of the different heating methods on the allergenicity of the whey proteins are analysed in the following sub-sections.

- **Pasteurization:**

Few reports deal with the possible increased allergenicity of pasteurized milk. Host and Samuelsson (1988), showed no differences in the allergenic potential between raw untreated milk and pasteurized milk (75°C for 15 s) on a double-blind placebo-controlled (DBPCFC) study with milk allergic children. All provocations with milk samples were positive irrespective of the type of milk, and all challenges with placebo (Nutramigen) were negative. More recently, Ehn *et al.* (2004) and Taheri-Kafrani *et al.* (2009) showed, by indirect competitive ELISA, that denaturation and aggregation of β -Lg caused by heating of whole milk and β -Lg solutions at 90–95°C decreased the IgE-binding capacity of this whey protein slightly but significantly. Their research indicated that heating of milk was insufficient to eliminate/destroy all epitopes but that the affinity of the remaining epitopes might be lower or that epitopes may have been destroyed after heating. These findings are in contrast with other epidemiological studies. An *in-vivo* mouse model study detailed the mechanism of higher IgE reactivity of β -Lg as a consequence of pasteurization (Roth-Walter *et al.*, 2008). Aggregated β -Lg could be taken up more extensively by Peyer's patches in the intestinal mucosa, which leads to greater production of IgE although anaphylactic symptoms were elicited only by absorbed soluble β -Lg. Bu *et al.* (2009b) also found that IgE-binding by α -La and β -Lg increased significantly after pasteurisation at temperatures between 50 and 90°C, compared to non-heated milk, by means of indirect competitive ELISA. The increase in whey protein antigenicity from 50 to 90°C may be caused by exposure of allergenic epitopes buried inside the native molecule due to the unfolding of conformational structure during heat denaturation (Kleber and Hinrichs, 2007). Moreover, it has also been shown that heat-denatured β -Lg presents some new epitopes, which are not found in the native state (Davis and Williams, 1998).

- Sterilisation:

Considerable reduction in the antigenicity of whey protein has been observed after high heat treatments (Lee, 1992) meanwhile milk caseins antigenicity was not reduced when it was heated at 121°C for 15 min (El-Agamy, 2007). Boiling whey for 30 min reduced the antigenicity and immunogenicity significantly; however, infants still reacted to heat-treated whey protein despite that reduction (Lee, 1992). Tolerance to heated milk may partially be explained by the research of Taheri-Kafrani *et al.* (2009), who studied the effects of heating on the major milk allergen, β -Lg. These researchers noted changes in β -Lg molecular weight following thermally induced denaturation and subsequent aggregation. The reorganization of β -Lg is thought to mask the conformational or linear epitopes present on the major allergen, thus reducing overall IgE binding. Bu *et al.* (2009b), using an indirect ELISA with rabbit serum, also found a decrease in IgG-binding by both α -La and β -Lg after sterilisation (120°C for 20 min) compared to pasteurisation (from 50 to 90°C). The antigenicity decrease at above 90°C can be attributed to the destruction or masking of conformational epitopes exposed to the surface of the molecule by sulfhydryl/disulfide exchange and subsequent aggregation (Kleber and Hinrichs, 2007). Sterilisation causes denaturation of 75% of the whey proteins and promotes Maillard reaction to occur (Porter, 1978; Chandan and Kilara, 2011), which may lead to loss of linear epitopes and consequently reduced antigenic response (Davis and Williams, 1998; Fritsche, 2003; Peram *et al.*, 2013). In conclusion, the decrease in IgE- and IgG-binding capacity of the main allergenic whey proteins caused by sterilisation can be explained by two phenomena: denaturation and Maillard reaction of existing epitopes of both β -Lg and α -La (Verhoeckx *et al.*, 2015).

- Ultra-High Temperature:

Ultra-high temperature (UHT) heating is a sterilisation process of milk, widely implemented in Europe because both the pathogens and spores are destroyed but no/little Maillard reaction occurs, minimising the impact on colour and taste of the milk (Tamime, 2009). Though, no reports are found on the effect of UHT processing on the allergenicity of milk. All studies examined the effect of sterilisation thermal treatment up to 120°C (see previous paragraph) on the allergenicity of milk. This is problematic as UHT processing is the most common thermal processing method used within Europe. Unfortunately, no conclusion can be drawn from the thermal effects of pasteurisation and sterilisation on the allergenicity of UHT processed milk, because the thermal treatment applied during UHT processing differs from pasteurisation and sterilisation (Verhoeckx *et al.*, 2015).

- Spray Drying:

During spray drying, the milk is placed in a dry air stream that causes both a temperature and a water gradient, leading to evaporation of the water from the milk to the air stream and heat transfer from the air stream to the milk particles. Maillard reactions may occur during spray drying, possibly affecting the allergenicity of milk (Schuck *et al.*, 2013).

Aalaei *et al.* (2016) studied available lysine as marker to monitor the Maillard reaction in the skim milk powders produced (freeze-dried, spray-dried and drum-dried) and stored differently (temperature and humidity). This research determined that the decrease in available lysine content during 200 days of storage follows almost the same pattern regardless of the type of skim milk powder and depends more on the storage conditions. However, there is no literature that directly examines the effect of spray drying on the allergenicity of cow's milk.

- **Vacuum Evaporation:**

Vacuum evaporation generally comprises heating of the milk to its boiling point under vacuum (80°C for 15 minutes) (Schuck *et al.*, 2013) and is used to obtain liquid concentrates and milk powders, the latter being spray-dried after the evaporation step. Vacuum by itself exerts no influence on the structural properties of proteins. Therefore, temperature is the most relevant parameter that may impact on protein structure during vacuum evaporation. Since vacuum evaporation takes some minutes, the treatment time at temperature inducing dairy proteins denaturation may also play a role. However, the effect of vacuum evaporation on the allergenicity of cow's milk has not been reported in the literature yet.

1.4.2.3. Effect of Hydrolysis

One of the common characteristics of food allergen is their resistance to gastrointestinal digestion; therefore pre-hydrolysis with enzymes is one of the most effective methods of modifying immune reactivity of food proteins. In fact, currently the only available preparations that are considered hypoallergenic are extensively hydrolysed milk formulas, which are primarily prepared by enzymatic hydrolysis, and elemental formulas, which are prepared from synthesised free amino acids (Baker *et al.*, 2000; Bahna, 2008; Niggemann *et al.*, 2008). As a result of hydrolysis conformational epitopes rapidly collapsed whereas linear epitopes are cleaved and their further existence depends on the degree of hydrolysis and type of enzyme used (Sabadin *et al.*, 2012).

Many studies have been performed to assess the allergenicity of hydrolysed milk or whey protein concentrate and all showed significantly lower reactivity of resulting hydrolysate with serum from allergic patients (Sabadin *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2014). Although extensively hydrolysed whey and casein formulae and amino acid preparations were tolerated by most of the allergic patients without any reactions, allergic reactions such as atopic dermatitis have been reported for several individuals (Meulenbroek *et al.*, 2014). Such reactions of cow milk allergy patient to hydrolysed formula are attributed to the residual antigenicity of the small peptides (Bu *et al.*, 2013).

For whey proteins, the minimal molecular mass to elicit immunogenicity and allergenicity appears to be between 3000 and 5000 Da, so the molecular weight cut-off value of the filters required (Van Beresteijn *et al.*, 1994). Whey protein hydrolysate, prepared with

alcalase enzyme, significantly lowers immune reactivity of α -La and β -Lg (Wróblewska *et al.*, 2004) and its effectivity can be maximized by controlling pH, temperature and enzyme-substrate ratio (Zheng *et al.*, 2008). Peptic and tryptic hydrolysates from heated whey protein also showed lower allergenicity than the unheated hydrolysate (Kim *et al.*, 2007). Heat induced unfolding of protein molecule with exposure of cleavage sites for enzymes resulting in enhanced proteolysis, destruction of epitopes and thereby reduction of allergenicity could be the most plausible explanation.

Therefore, hydrolysis seems an effective method to reduce the immunoreactivity of cow whey milk protein. In dairy products microbial enzymatic hydrolysis during fermentation can also destroy antigenic epitopes resulting in decreased allergenicity (Fotschki *et al.*, 2015). However, total elimination of allergenic properties appears to be unrealistic to achieve.

1.4.3. Emerging Technologies for Preventing Cow's Milk Allergy

Some processing technologies (glycation, enzymatic hydrolysis and lactic acid fermentation) can be used to effectively reduce the allergenicity of milk proteins by controlling and optimizing the processing conditions. Nonetheless, the utilization of traditional methods, like enzymatic treatments and thermal processes for the treatment of food allergens, showed several limits and drawbacks, such as scarce effect on the allergenicity and the reduction of the nutritional value of foods. Moreover, considering the risk of appearance of some new epitopes during processing, attention should be paid during modification of milk proteins.

Food scientists and the food industry are therefore searching for novel methods to modulate food allergy with less adverse effects on product quality. Recent advances in emerging food-processing technologies, such as high hydrostatic pressure or pulsed light, have proved they allow to modify food molecules (in particular proteins) and preserve foodstuffs. These non-thermal technologies are able to induce changes in functional properties of food protein similarly to the traditional thermal treatments (Davis *et al.*, 2001) and seem promising alternatives for reducing the allergenicity of known allergens in a wide variety of food materials (Sathe *et al.*, 2005; Verhoeckx *et al.*, 2015; Rahaman *et al.*, 2016). However, there is still scarce information in the literature concerning the specific effect of these novel processing alternatives on the allergenicity of the antigen whey protein β -Lg.

Accordingly, this work has been focused on the impact of the pulsed light technology and high hydrostatic pressure as well as in combination with heat treatment in pressure-assisted thermal processing, on the behavior of β -Lg -with allergenic implication- considering their novel interest in the food industry.

1.5. Novel Alternatives on Food Processing

1.5.1. Introduction

The ubiquitous presence of allergens in human food supply coupled with an increased awareness of food allergies have also intensified the effort for developing novel allergy mitigation methods to avoid the negative impact of thermal treatments on the quality of food products (Meinlschmidt *et al.*, 2016), even though those processes have been proved to alter allergenic potential of many foods (Beller *et al.*, 2001; Mondoulet *et al.*, 2005; Taheri-Kafrani *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Houska *et al.*, 2013).

In this sense, different studies have shown that non-thermal technologies such as high hydrostatic pressure (HHP) (Achouri and Boye, 2013; Somkuti and Smeller, 2013; de Maria *et al.*, 2016; Lavilla *et al.*, 2016) and pulsed light (Chung *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010; Shriver *et al.*, 2011; Tammineedi *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015; Panozzo *et al.*, 2016) hold a great promise for the development of food ingredients with reduced allergenicity. Furthermore, those technologies preserve original characteristics of foods, maintaining fresh-like attributes and thermolabile nutrients contrary to the heat treated foods (Rahaman *et al.*, 2016).

1.5.2. Pulsed Light

1.5.2.1. Background and Legal Aspects of Pulsed Light

While many different pulsed light devices were developed before 1970 for different industrial purposes, the use of inert-gas flashlamps generating intense and brief pulses of UV light as a technique of microbial inactivation definitely started during the late 1970s in Japan and was patented by Hiramoto (1984).

Such a technology, was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 1996 and recently has been widely investigated in view of possible commercial applications (Wang, 2009). Currently, the use of pulsed light “for production, processing and handling of foods” is approved by the FDA (2000) with an upper limit fluence of 12 J/cm². In Europe, even though the pulsed light technology is concerned by Regulation (EC) 258/97 on novel foods, the EFSA (2015) has approved the use of UV light radiation (UV-C) to increase vitamin D₃ in milk.

1.5.2.2. Theoretical Basis and Process Description

Pulsed light technology is an innovative method of purification and sterilization of food items that consists of a successive repetition of short duration and high power flashes of broadband emission light (190-1000 nm) using inert-gas flash lamps (Figure 5).

The limited energy cost of pulsed light and its great flexibility and speed are some of the major interests of the technique. It has potential applications for the treatment of foods,

packages, medical devices, and packaging and processing equipment for the food, medical, and pharmaceutical industries and water and air (Dunn *et al.*, 1997).

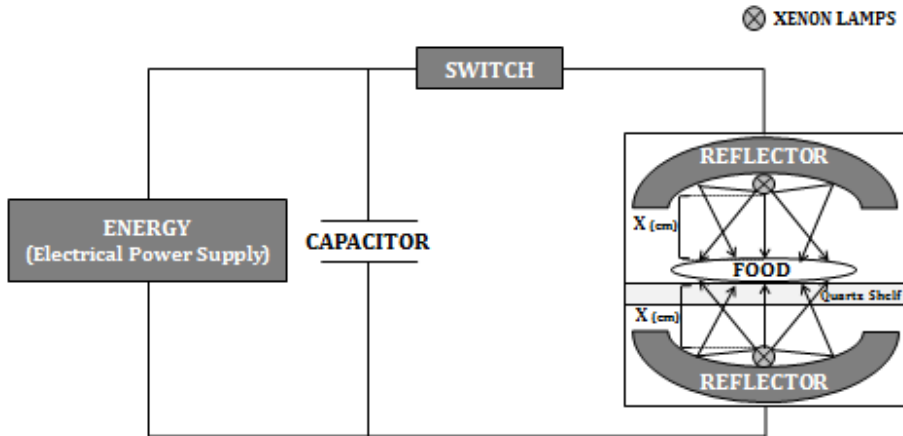


Figure 5. Schematic diagram of pulsed light process

Pulsed ultraviolet light is considered more effective in food processing, specifically for microbial inactivation, than conventional or continuous UV light, because of its instantaneous high-energy pulses and greater capability to penetrate. In a pulsed light system, electrical energy is captured and stored in a capacitor and is ultimately released in short pulses as UV, infrared, and visible light (approximately 54%, 20%, and 26%, respectively) (Shriver *et al.*, 2011). The resultant bursts can be several thousand times more intense than continuous UV light (Dunn *et al.*, 1989; Sharma and Demirci, 2003; Krishnamurthy *et al.*, 2007).

Among pulsed light technology limitations, several parameters such as opacity of the liquid, presence of particulate materials, treatment time, distance of sample from the light source, and volume of the sample affect the sample–light interaction. Furthermore, the number, orientation, and design of lamps have a direct relevance to the energy delivered and dose effectiveness.

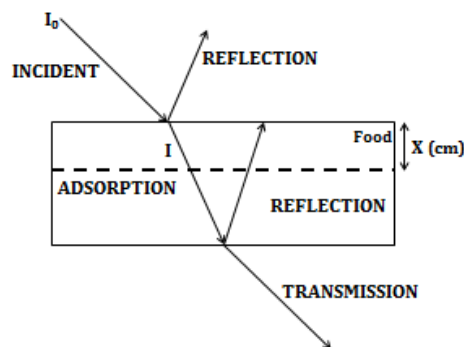


Figure 6. Interaction of light and food

When a food material is exposed to pulsed light, the energy can be absorbed, reflected or transmitted (**Figure 6**). The intensity of pulsed light exponentially decays within the food matrix. When light, with an initial intensity, I_0 , penetrates the food, its intensity decays along a distance, X , beneath the food surface. The actual intensity, I , available at any point within the food, which is located at a distance X from the food surface, can be given by the Beer-Lambert law (**Equation 1**),

$$I = T * I_0 e^{-x} \quad \text{(Eq. 1)}$$

where T is the transparency coefficient of the food material. The characteristics of the food, especially optical properties, determine the percentage of actual energy absorbed by the food.

1.5.2.3. Applicability of Pulsed Light in the Food Industry

1.5.2.3.1. Antimicrobial Effect

The antimicrobial effect of pulsed light has been attributed mainly to DNA damage (e.g. formation of pyrimidine dimers and other photoproducts) caused by its high content in UV wavelengths. Other structural damages induced in cell walls, membranes and some internal structures could also be involved in the pulsed light inactivation efficiency (Takeshita *et al.*, 2003; Lagunas-Solar *et al.*, 2006; Bialka *et al.*, 2008; Krishnamurthy *et al.*, 2008). Upon coming into contact with a sample, the light interacts with molecules, which are excited and—upon returning to ground state—liberate energy as photons or heat, which can also induce chemical changes. Thus the efficacy of pulsed light has been attributed to photochemical, photothermal, and photophysical reactions (Krishnamurthy *et al.*, 2007). Although photo-thermal effect after very intense pulsed light treatments has been suggested (Wekhof, 2000), a shorter exposure (e.g., seconds) to pulsed light is normally regarded as non-thermal, as the temperature rise of food is insignificant (Krishnamurthy *et al.*, 2009).

Thereby, light pulses may be used to reduce or eliminate the need for chemical disinfectants and preservatives eradicating residual compounds and the applied chemicals that can cause ecological problems and/or are potentially harmful to humans. Concretely, this method is capable of reducing the microbial populations, vegetative cells, and spores on the food surfaces, with remarkable rapidity and effectiveness.

The capacity of pulsed light technology to inactivate microorganisms *in-vitro* or in food products has been extensively studied (Takeshita *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2002; Gómez-López *et al.*, 2005; Feuilloley *et al.*, 2006; Lagunas-Solar *et al.*, 2006; Kaack and Lyager, 2007; Turtoi and Nicolau, 2007; Lasagabaster *et al.*, 2011; Artíguez and Martínez de Marañón, 2015). A lower level of microbial inactivation has been shown with increasing levels of oil and protein, which could be due to a decrease in the effective radiation dose on microorganisms (Gómez-López *et al.*, 2005). By contrast, rich protein and fat liquid foods, such as milk, have been

successfully decontaminated (Krishnamurthy *et al.*, 2007) giving to pulsed light treatment a potential to be used as a pasteurization technology in specific processing situations, such as small-scale milk processing operations.

Currently, dairy industry produces significant amounts of liquid wastes, mostly whey obtained during the cheese making process. Whey and other dairy processing by-products may provide an excellent environment for the growth and proliferation of a wide range of microorganisms (Chandan, 2011). Although pasteurization has been traditionally used to reduce microbial load present in whey, high temperature processes are known to denaturize whey proteins (Anema and Li, 2003) causing substantial changes in their nutritional, organoleptic and/or technological properties. To prevent those adverse thermal effects and produce safe food products, pulsed light has been successfully tested for the inactivation of pathogenic and spoilage microorganisms in liquid dairy foods (Smith *et al.*, 2002; Krishnamurthy *et al.*, 2007; Palgan *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2012; Artíguez and Martínez de Marañón, 2015). However, some studies show whey decontamination by pulsed light could be limited by the restricted penetration of the light into the fluid, as it has been shown for other liquid food products (Artíguez *et al.*, 2012; Hsu and Moraru, 2011).

1.5.2.3.2. Whey Proteins Modification

Pulsed light has been shown to alter whey proteins structure and conformation. Elmnasser *et al.* (2008), who carried out a study on the effect of the pulsed light on milk protein and lipids, found that pulsed light treatments can cause milk protein aggregation by disulphide bonds. In a recent studio of the effect of pulsed light on the structural properties of commercial whey protein isolate (including β -Lg 43–48%, α -La 14–18%, BSA 1–2%, IgG 1–3%, and Lf <1%), the experimental data demonstrated that pulsed light treatments increased the concentration of total and free sulfhydryl groups and protein carbonyls, decreased the denaturation temperature and enthalpy ratio, changed the secondary structure and induced dissociation and partial unfolding of the whey protein isolate (WPI), thus improving some of their functional properties, such as solubility and foaming ability (Siddique *et al.*, 2016).

For isolated β -Lg, Fernández *et al.* (2012) concluded that pulsed light treated β -Lg was affected in its structure changing the conformation, likely to increase in random coil, suggesting a partial denaturation with loss of secondary and tertiary structure. These authors also demonstrated changes on β -Lg functional properties induced by pulsed light, as higher rates of protein adsorption at the air water interface, higher surface activity, a significant increase in the viscoelasticity and foaming capacity. The impact of pulsed light treatment on β -Lg functionality was confirmed by the patent EP 2 548 450 A1 from Arboleya *et al.* (2013), who reported that the treatment of β -Lg aqueous solutions with pulsed light is capable of improving its properties of surface tension, foaming capacity, foaming stability, as well as its

emulsifying properties. Also, [del Castillo-Santaella et al. \(2014\)](#) demonstrated that pulsed light can have a significant impact on the digestibility of β -Lg.

These results clearly reveal, significant conformational changes in whey proteins due to the pulsed treatment and consequently, significant changes take place in the functionality of treated β -Lg.

1.5.2.3.3. Impact on Allergenicity

Based on the literature evidence, pulsed light could be efficiently exploited to modify the structure of those proteins that cause food allergy. Changes in protein structure and reduction in IgE binding to allergens by pulsed light have already been proved in food products like almond ([Li, 2011](#); [Li et al., 2013](#)), peanut ([Chung et al., 2008](#); [Yang et al., 2012](#)), soybean ([Yang et al., 2010](#); [Meinlschmidt et al., 2016](#)), gluten ([Panozzo et al., 2016](#)), wheat extracts ([Nooji, 2011](#)) and white shrimp allergens ([Shriver et al., 2011](#)). In our knowledge, there is a lack of research about the impact of pulsed light in the allergenicity of β -Lg. Only [del Castillo-Santaella et al. \(2014\)](#) have shown a significant impact on digestibility of β -Lg by pulsed light suggesting a possible route to control the digestibility of the proteins and, thus, contributing to the battle against food allergies.

1.5.3. High Hydrostatic Pressure

1.5.3.1. Background and Legal Aspects of High Hydrostatic Pressure

Two regulatory attitudes towards commercialization of food products manufactured using High Hydrostatic Pressure (HHP) have emerged, i.e. within the Europe (EU) or outside. In countries outside the EU, there is currently no specific legislation applicable to HHP treatment. In the USA, for example, the traditional health regulations are applied and products treated by HHP, such as guacamole and oysters, have already been introduced to the market without any specific regulation. In EU countries, however, national regulations for new products have been replaced, in the application of the precautionary principle, by a community regulation for novel foods and ingredients ([Regulation 258/97/EC](#)). This 'Novel Foods' legislation establishes an evaluation and licensing system that is compulsory for new foods and new processes. HHP-processed food products are novel foods since they fulfill two conditions: their history of human consumption has so far been negligible and, secondly, a new manufacturing process has produced them.

In July 2001, after the last meeting of the EU commission in charge of 'novel foods' several decisions were taken to simplify the regulations. Specifically, if it is possible to show that the new product (e.g. the HHP-treated food) is substantially equivalent to a product already on the market, then the product can be treated at a national regulation level and will not need to comply with the 'novel food' regulation ([Hugas et al., 2002](#)).

1.5.3.2. Theoretical Basis and Process Description

In industrial scale HHP units consist of a high pressure vessel and an external pressure generating device. The simplest practical system of such an intensifier is a single-acting, hydraulically driven pump. For the HHP treatment, the packed food is deposited in carrier and automatically loaded into the HHP vessel. After closing the vessel plugs, the pressure transmitting media, usually water, is pumped into the vessel from one or both sides. After reaching the wanted maximum pressure the pumping is stopped and in ideal case no further energy input is needed to hold the pressure during dwell time (Cheftel and Culioli, 1997). Pressure is transmitted in a uniform (isostatic) and quasi-instantaneous manner throughout the sample; the time necessary for pressure processing is therefore independent of sample size, in contrast to thermal processing (Torres and Velazquez, 2008). As the pressure acts instantaneously and is equally distributed, there is no obvious crushing effect on the packaged food. The pressure is then applied for a set time period typically from a few seconds up to 20 minutes. On completion of the time period, the chamber depressurizes. **Figure 7** shows the different steps in HHP operation.

The total time for pressurization, holding and depressurization is referred to as the 'cycle time'. The cycle time and the loading factor (i.e. the percentage of the vessel volume used for holding packaged product) determine the throughput of the system. In a commercial situation, with this sort of batch process, a short holding time under pressure is desirable to maximize throughput of product.

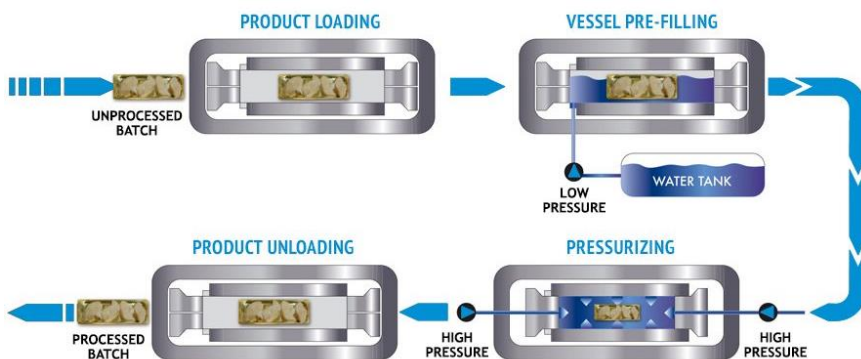


Figure 7. Diagram of operation of a HHP unit (Image courtesy of [Hiperbaric](#))

The work of compression during HHP treatment will increase the temperature of the water due to transformation of the energy during compression. All the materials susceptible to be compressible suffer a change on its temperature during the compression process depending on its compressibility and specific heat (Ting *et al.*, 2002). The water temperature rise by adiabatic compression is shown in **Figure 8** (Makita, 1992) for different initial temperatures before pressurization. For example, the water temperature will increase 14°C at

600 MPa when the initial water temperature is 10°C, meanwhile this rise will be greater if the initial temperature is higher (for an initial temperature of 80°C, the water temperature increases 27-28°C at 600 MPa).

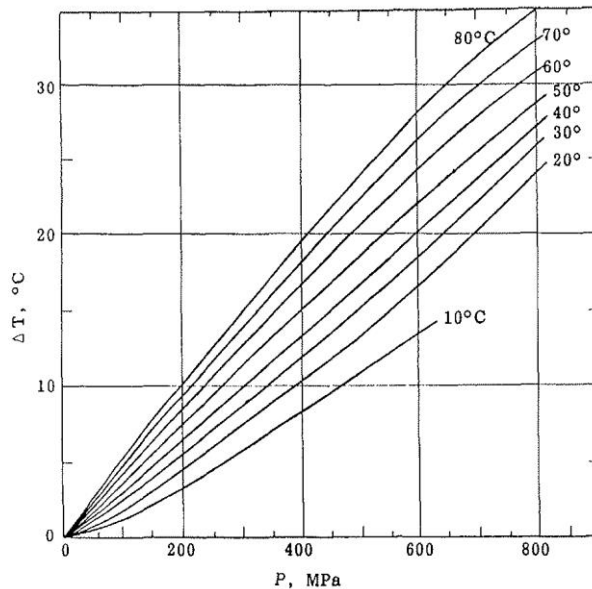


Figure 8. Temperature rise (ΔT) of water by adiabatic compression. The temperatures on each curve denote the initial temperatures before compression (Makita, 1992)

The HHP process is then characterized by three parameters: pressure, temperature and time. These factors offer a wide variability on the procedure design in contrast with the use of heat treatment which is only based on temperature and time.

Similarly, the work of compression during HHP treatment will increase the temperature of foods through adiabatic heating approximately 3°C per 100 MPa, depending on the composition of the food (Balasubramanian and Balasubramaniam, 2003). For example, if the food contains a significant amount of fat, such as butter or cream, the temperature rise can be a bit larger. Foods cool down to their original temperature on decompression if no heat is lost to, or gained from, the walls of the pressure vessel during the hold time at pressure.

Accordingly, using HHP two different technologies can be applied: High Hydrostatic Pressure (HHP) when working with final temperatures closed to room temperature, and Pressure-Assisted Thermal Processing (PATP) when the food product to be processed has previously been heated with the aim to get a moderate or high final temperature (Knoerzer *et al.*, 2010). Thereby, the PATP allows reaching final temperature in few minutes (time required to reach the holding pressure).

In HHP treatments, especially when combining pressure with temperature, two main control points can be distinguished as critical for safety: preheating and pressurization. It results of great importance an uniform initial temperature of the product, especially for sterilization by PATP at high temperatures, without gradients of temperature between the center and the surface to avoid cold points. This stage must be optimized to avoid the negative effects on product quality due to an unsuitable preheating (Barbosa-Cánovas and Juliano, 2008). When *pressurizing* in PATP, a difficult task is to get a uniform distribution of the temperature inside the product (Knoerzer *et al.*, 2007; Juliano *et al.*, 2009). While the temperature of a homogenous food (one with less than 25% fat) will increase uniformly due to compression, the temperature distribution in the mass of food during the holding period at pressure can change due to heat transfer to or from the walls of the pressure vessel. Gradients of temperature inside the vessel are the result of the heat compression differences from the equipment components (the transmitting fluid, the food product, the packaging material,...) and the metallic material of the vessel (Balasubramanian and Raghubeer, 2002; de Heij *et al.*, 2003). The pressure vessel must be held at a temperature equal to the final food temperature increase from compression for truly isothermal conditions (Farkas and Hoover, 2000). In order to counteract the cooling effect due to vessel walls, some proposals have been considered, among them, the use of internal electric heaters or insulating polymeric containers (Knoerzer *et al.*, 2007; Juliano *et al.*, 2009). However, the presence of gradients of temperature is still a problem in many systems. Recently, a new equipment has been developed for AZTI with a horizontal design (minimizing the gradients associated to the vessel height) where the vessel has been thermostatted to maintain the final temperature along processing.

1.5.3.3. Applicability of High Hydrostatic Pressure to Food Industry

Although the potential for HHP processing of foods has been known since the late nineteenth century, its application and potential have only recently been widely recognized. HHP processing offers the food industry a technology that can assess the food safety while meeting consumer demand for fresher-tasting foods. Furthermore, other promising applications have been reported: pressure stability of food enzymes (Krebbbers *et al.*, 2003), functional properties of proteins (Liu *et al.*, 2009; Dalai and Sahu, 2010; Qin *et al.*, 2013; de María *et al.*, 2016), or alteration in food antigenicity (Hajós *et al.*, 2004; Belloque *et al.*, 2008; Achouri and Boye, 2013; Somkuti and Smeller, 2013).

1.5.3.3.1. Antimicrobial Effect

The primary site for pressure-induced microbial inactivation is the cell membrane (e.g. modifications in permeability and ion exchange) (McClements *et al.*, 2001). In addition, HHP causes changes in cell morphology and biochemical reactions, protein denaturation and

inhibition of genetic mechanisms. Other mechanisms of action which may be responsible for microbial inactivation include the denaturation of key enzymes and the disruption of ribosomes (Linton and Patterson, 2000). Different microorganisms react to high pressure treatment with different degrees of resistance. For *Bacillus cereus* spore inactivation in milk, Evelyn and Silva (2015) found that inactivation increased as the temperature increased from 38 to 70°C at 600 MPa, and Jiao *et al.* (2016) concluded that high-pressure processing treatment with 400 MPa for 3 min can be used to control *Cronobacter sakazakii* contamination in milk samples, microorganism related to infections such as meningitis, septicemia, and necrotizing enterocolitis.

1.5.3.3.2. Effect on Food Colour, Texture and Sensory Qualities

In order to select the most suitable processing conditions for a particular food product, sensory characteristics must be taken into account (Polydera *et al.*, 2003), as HHP treatment is capable to prevent sour tastes, off-flavours and even colour changes (Hugas *et al.*, 2002). If required, HHP treatments can also induce desirable changes in product texture and structure and, accordingly, can be used for the development of new products or to increase the functionality of some ingredients (Hugas *et al.*, 2002). For example, it was reported that HHP treatment of Mozzarella cheese significantly accelerated the development of desirable functional properties on melting (O'Reilly *et al.*, 2002).

1.5.3.3.3. Effect on Food Yield

HHP treatment may affect the yield of certain products, a very important economic issue for food manufacturers. While effects on yield depend on the type of product and the intensity of treatment, HHP treatment can give a higher yield in food products than heat treatment. For example, Mor-Mor and Yuste (2003) reported that weight loss was significantly higher in heat-treated sausages than in HHP-treated control samples.

1.5.3.3.4. Effect on Food Proteins

High pressure (up to 1000 MPa) can affect protein conformation by the three major effects that can be observed: elasticity, destabilization or/and unfolding. *Elastic* effects already appear at the lowest pressure values. These are reversible distortions of the primary and secondary bonds. The compression of the primary chemical bonds is very small; their contribution to the volume change of the system is negligible. Compression of the hydrogen bonds can lead to distortion of the conformation, which can reduce the size of the internal cavities in the protein. If the pressure reaches typically 200 MPa the intermolecular interactions and the tertiary structure are *destabilized* (Schay *et al.*, 2006). This can be explained by the increased molecule surface leading to a larger hydration layer in the monomer state, and by the cavities at the internal surface of the oligomers/aggregates due to

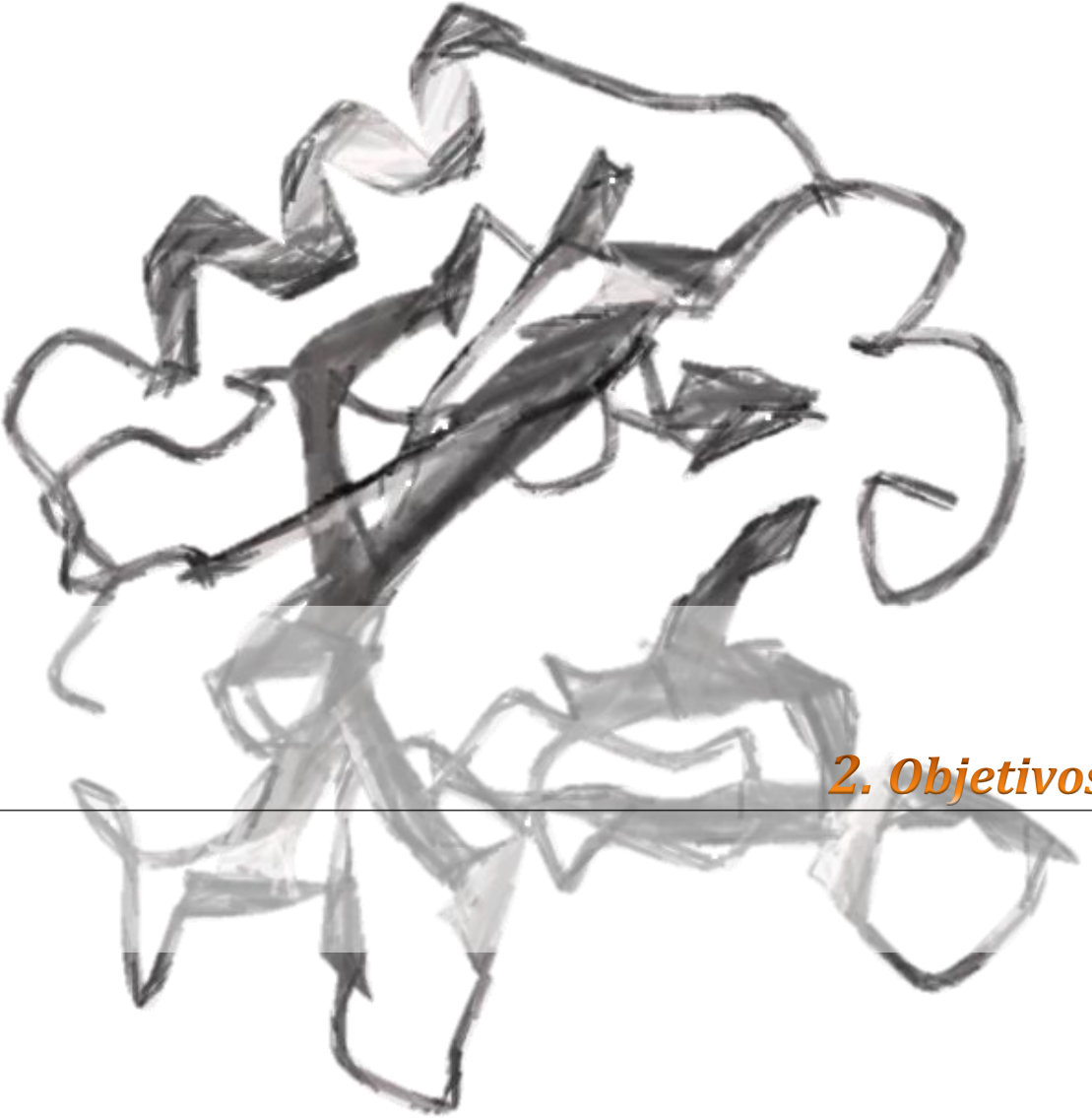
improper packing. Higher pressure can *unfold* the protein. The typical pressure needed for the unfolding is around 500 MPa but it varies from protein to protein, in the range from 100 MPa to 1 GPa or until even higher pressures in special cases (Tolgyesi *et al.*, 2004). Pressure unfolding of proteins has been reviewed in several papers (Silva *et al.*, 2001; Smeller, 2002; Balny *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2007), however there are some aspects of its mechanism which are still unclear.

The presence of multiple proteins in a whey protein concentrate (WPC) can have significant influence on the behavior of whey proteins during high pressure and heat treatment. de Wit and Klarenbeek (1984) reported that although α -La is the whey protein with the lowest denaturation temperature, it appears to be (at pH 6.0) most thermostable against protein aggregation because of its high capability of renaturation on cooling. This renaturation effect is not observed in WPC, which might be due to heat-induced interactions with β -Lg and BSA. In the mixture of α -La and β -Lg, during HHP treatment (1000 MPa, 30 min), β -Lg promoted the oligomerization of α -La (Jegouic *et al.*, 1997). In this case, mixing and denaturation of β -Lg with α -La resulted in the formation of a large heterogeneous population of oligomers including β -Lg or α -La/ β -Lg dimmers (Considinea *et al.*, 2006).

Changes in the surface hydrophobicity and aggregation effects have been observed with β -Lg subsequent to treatments between 200 and 600 MPa (Dumay *et al.*, 1994). High pressure induced β -Lg into the MG state (Kamatari *et al.*, 1999), indicating enhanced aromatic hydrophobic binding.

1.5.3.3.5. Effect on Allergenicity

Most of the studies about HHP immunological effects have been related with enhanced digestibility by enzymatic action and the hypoallergenic properties of the resulted peptides of whey proteins (Peñas *et al.*, 2006; Chicón *et al.*, 2008a) or of the isolated β -Lg (Knudsen *et al.*, 2002; Bonomi *et al.*, 2003; Chicón *et al.*, 2008b; Zeece *et al.*, 2008; López-Expósito *et al.*, 2012). Only Kleber *et al.* (2007) studied the antigenic response of β -Lg influenced by HHP, with an observed increase of the antigenicity with increasing pressure and with holding time. However, the allergenic potential was measured by competitive ELISA and polyclonal immunoglobulins from chicken egg yolk, not involved in the human allergy triggering.



2. Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es aportar un mayor conocimiento sobre el efecto de tecnologías emergentes como la luz pulsada o las altas presiones hidrostáticas, sobre la inmunoreactividad de la β -Lactoglobulina (β -Lg) bovina, proteína presente en la fracción sérica de la leche, así como determinar si estas tecnologías presentan una ventaja en la obtención de productos de alergenidad reducida.

Para la consecución de este objetivo se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo de un método de análisis inmunoenzimático con anticuerpos recombinantes para medir la inmunoreactividad de la β -Lg.
- Estudio del impacto de distintas intensidades de tratamiento mediante pulsos de luz en la inmunoreactividad con anticuerpos recombinantes, detección, cambios estructurales y digestibilidad de la β -Lg purificada.
- Evaluación del impacto de diferentes intensidades de pulsos de luz en la inmunoreactividad con anticuerpos recombinantes de la β -Lg presente de forma natural en matrices de origen alimentario, el lactosuero.
- Investigar el impacto de la tecnología de pulsos de luz en la inmunoreactividad de la β -Lg purificada y en lactosuero con plasmas de pacientes alérgicos a las proteínas de la leche.
- Determinar modificaciones en la unión de los anticuerpos recombinantes con β -Lg purificada previamente procesada por alta presión hidrostática, alta temperatura o por la aplicación simultánea de alta presión hidrostática y alta temperatura.



3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Inmunoquímica

La proteína β -Lactoglobulina (β -Lg) liofilizada en polvo (L0130 pureza $\geq 90\%$) procedente de leche bovina, las membranas de transferencia de nitrocelulosa Protran@BA83 y el sustrato para el immunodotting (4-Chloro-1-naphthol), fueron suministrados por Sigma-Aldrich (San Luis, Estados Unidos). La proteína albúmina sérica bovina (BSA) fracción V, fue proporcionada por Fisher Scientific (Leics, Reino Unido). Los anticuerpos secundarios de cabra tipo G anti-human Kappa-HRP (2060-05) empleados en este trabajo fueron suministrados por Southern Biotech (Birmingham, Estados Unidos). Las placas de 96 pocillos Maxisorp y de 12 pocillos Nunclon Delta Surface fueron proporcionadas por la firma NUNC (Roskilde, Dinamarca); mientras, el kit de detección de β -Lg *Proteon β -Lactoglobulin* fue proporcionado por Zeulab (Zaragoza, España). Para el desarrollo colorimétrico en las placas se empleó el sustrato Ultra TMB-ELISA suministrado por Thermo Scientific (Rockford, Estados Unidos).

Respecto a los anticuerpos primarios, las inmunoglobulinas (Ig) E recombinantes anti- β -Lg fueron amablemente cedidas por el centro técnico de investigación de Finlandia VTT (Espoo, Finlandia), y los plasmas séricos de pacientes diagnosticados con alergia a proteínas de la leche de vaca fueron cordialmente donados por el Servicio de Alergología del Hospital de Basurto (Bilbao, Vizcaya, España).

3.1.2. Plasmas de Pacientes Alérgicos a Proteínas de Leche de Vaca

Los sueros de pacientes anónimos APLV fueron cedidos por el Servicio de Alergología del Hospital de Basurto (Vizcaya) y empleados cumpliendo con los requerimientos éticos. Cada suero sanguíneo presentó diferente alergenicidad específica frente a varias proteínas de la leche de vaca (ver **Tabla 3**): α -Lactoalbúmina (α -La), β -Lactoglobulina (β -Lg) y caseínas (cas). Estas muestras se codificaron y se mantuvieron en congelación hasta su utilización.

Tabla 3. Alergenicidad de sueros de pacientes alérgicos a proteínas lácteas expresado en kU_A/L

| | β -Lg | α -La | cas |
|-------------|-------------|--------------|------|
| L 1* | | | |
| L 2* | | | |
| 39 | 5,84 | - | - |
| 41 | 9,89 | 2,93 | 0,45 |
| 42 | 5,53 | - | - |
| 43 | 5,53 | 4,41 | 5,73 |
| 44 | 16,8 | 15,4 | 449 |

*L1 y L2: alergenicidad específica desconocida.

3.1.3. Medios y Disoluciones

Para la preparación de soluciones tampón y otras disoluciones se emplearon los siguientes reactivos:

- Carbonato de sodio (Na_2CO_3), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), ácido acético glacial (CH_3COOH) y bifosfato de sodio (NaH_2PO_4), suministrados por Panreac Química (Barcelona, España);
- el cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4) 6N, metanol (CH_3OH) y glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), fueron proporcionados por Fisher (Leics, Reino Unido);
- el sodio fosfato dibásico (Na_2HPO_4) y Azul de Coomassie R-250 fueron abastecidos por Fisher (Nueva Jersey, Estados Unidos);
- el Tween 20 fue suministrado por Sigma-Aldrich (San Luis, Estados Unidos);
- y el acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) por Probus (Barcelona, España).

3.1.4. Digestión Enzimática

La pepsina de mucosa gástrica de cerdo P7000 (≥ 250 U/mg sólido) fue adquirida en Sigma-Aldrich (San Luis, Estados Unidos).

3.1.5. Electroforesis

Todas las electroforesis se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida de gradiente 8-25%. Para la electroforesis nativa, Native-PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), se emplearon bandas buffer Nativas. Para las electroforesis en condiciones reductoras, SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), se emplearon bandas buffer SDS y como marcador una mezcla de proteínas estándar de bajo peso molecular (LMW-SDS marker kit). Todos estos materiales fueron suministrados por GE Healthcare (Upsala, Suecia). El SDS $\geq 98,5\%$ (L3771) empleado provenía de Sigma-Aldrich (San Luis, Estados Unidos). El Tris ($\geq 99,8\%$) y el EDTA fueron suministrados por Thermo Scientific (Rockford, Estados Unidos).

3.1.6. Otros Productos

La leche cruda fue suministrada por Vascolac S. L. (Zamudio, Vizcaya, España) y el suero lácteo fue amablemente cedido por la misma empresa. La membrana cerámica de microfiltración con punto de corte $0,5 \mu\text{m}$ (EE199.1) fue suministrada por Pall Corporation (Pall Exekia, Francia). El resto de productos no señalados específicamente, se han obtenido de diferentes fuentes y corresponden a reactivos de grado analítico.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparación de Medios

Para el tapizado de las placas ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) se preparó un tampón carbonato-bicarbonato de sodio (0,015 M y 0,035 M, respectivamente) ajustando el pH a 9,6. El tampón salino de fosfato, PBS (*Phosphate Buffered Saline*), se elaboró con 0,014M NaCl, 0,002M KCl, 0,001M KH_2PO_4 y 0,008M Na_2HPO_4 , ajustando el pH a 7,4. La solución de lavado de las placas ELISA, el PBST, se preparó con Tween 20 al 0,05% en PBS. Para detener la reacción enzimática en placa ELISA se preparó una disolución de H_2SO_4 2M.

Como medio de disolución para la β -Lactoglobulina (β -Lg) se preparó un tampón fosfato 0,1M (concentración final), partiendo de NaH_2PO_4 0,2M, Na_2HPO_4 0,2M, y agua destilada (25,5%, 24,5%, y 50%, respectivamente), ajustando el pH a un valor de 6,8. Otro tampón de dilución para la β -Lg fue el buffer acetato 0,1M, partiendo de ácido acético 0,2M, acetato de sodio 0,2M, y agua destilada (25,5%, 24,5%, y 50%, respectivamente). La disolución se ajustó a pH 4,6.

Para trabajar con plasmas sanguíneos de pacientes alérgicos se preparó una solución salina fisiológica (SSF) de 150 mM NaCl, 8 mM K_2HPO_4 , y 16 mM KH_2PO_4 . La solución se ajustó a pH 7,4.

Para la digestión enzimática se preparó un tampón gástrico simulado con glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) al 0,01M y NaCl al 0,03M, llevado a pH 2,5 con ácido clorhídrico (HCl) 2M. Para detener la reacción enzimática se elaboró un tampón 0,1M de carbonato-bicarbonato de sodio, $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, ajustado a pH 9,6 con hidróxido sódico (NaOH) 2 M.

Para la tinción de los geles se empleó colorante azul de Coomassie R, al 0,065 % diluido en una solución 30:10:10:50 (vol.) de metanol, ácido acético glacial, glicerol y agua destilada, respectivamente.

El decolorante de los geles fue una mezcla de metanol, ácido acético, glicerol y agua destilada, en una relación 25:8:2:65 (vol.), respectivamente.

3.2.2. Preparación de Muestras

3.2.2.1. Disoluciones de β -Lactoglobulina Purificada

Se prepararon distintos medios de disolución para estudiar el efecto del pH sobre la configuración de la β -Lactoglobulina (β -Lg), (500 y de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en PBS (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,4; en tampón fosfato, pH 6,8, dado que el pH la leche de vaca es ligeramente ácido y tiene un pH comprendido entre 6,6 y 6,8; en tampón acetato, pH 4,6, cercano al pH del lactosuero ácido; y, por último, en agua destilada, a pH neutro, en ausencia de sales. Las muestras se guardaron en refrigeración hasta su estudio.

3.2.2.2. Leche Desnatada

La leche desnatada se obtuvo por centrifugación de leche cruda entera a 2500 rpm y 4°C durante 20 minutos en una centrífuga Ortoalresa Dígitor 20R con rotor RT191 (Madrid, España). Una vez finalizada la centrifugación, se separó la nata recogiendo cuidadosamente la leche desnatada con una pipeta Pasteur. Después, se guardó la leche desnatada en refrigeración hasta su tratamiento por un tiempo máximo de 2 días.

3.2.2.3. Lactosuero Ácido

El lactosuero ácido se obtuvo por acidificación de la leche desnatada con HCl 4M hasta alcanzar un pH 4,6. Las caseínas precipitadas se separaron repitiendo el proceso de centrifugación. Después, se recogió el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se mantuvo en refrigeración hasta su uso (máximo 2 días).

3.2.2.4. Lactosuero Industrial

Por último, se trabajó con lactosuero industrial procedente del procesado de leche bovina para la fabricación de queso. Una vez recogido y antes de someterlo a cualquier tratamiento, este lactosuero fue procesado mediante la unidad piloto de microfiltración MEMBRALOX XLab5 (Figura 9), suministrada por TIA (Bollène, Francia), para la reducción en la carga microbiológica. Dicha unidad está equipada con un tanque de acero inoxidable de 3 L, una bomba centrífuga de recirculación (220 V) y aire comprimido para crear una presión y un flujo cruzado a través del bucle de circulación, un módulo para insertar la membrana, un dispositivo de retrolimpieza con aire comprimido (*backpulsing*), válvulas y manómetros. En el módulo de acero inoxidable MEMBRALOX T1-70 (Pall Exekia, Francia) se insertó la membrana que consistía en un único canal de flujo de 25 cm de longitud y 7 mm de diámetro con un área de filtración de 50 cm². La membrana cerámica EE199.1 (Pall Corporation, Francia), con un tamaño de poro de 0,5 µm, permitió el paso al permeado de la β-Lg.



Figura 9. Unidad de filtración MEMBRALOX XLab 5

Para la filtración del lactosuero, éste siguió el circuito que se muestra en la **Figura 10**. Cuando el sistema se estabilizó, transcurridos unos 5 minutos, se abrió la válvula de permeado y se mantuvo el retenido recirculando sin realimentación, por lo que el volumen en el tanque de alimentación fue reduciéndose paulatinamente. Este tipo de operación es el correspondiente a la microfiltración en modo semicontinuo, más enfocado a la concentración del rechazo, por lo tanto, a medida que el tiempo transcurre, la concentración en el tanque de alimentación se va enriqueciendo en los componentes rechazados por la membrana.

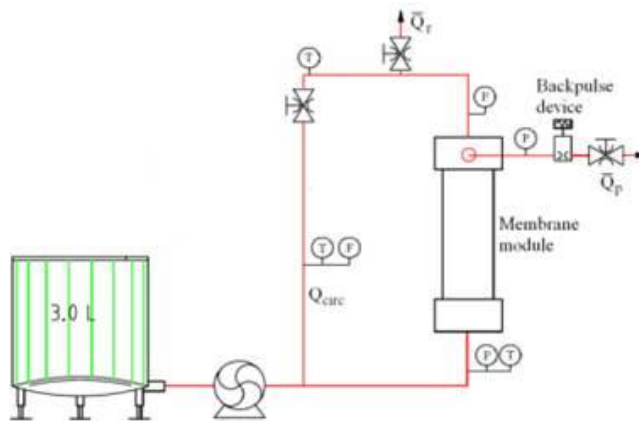


Figura 10. Circuito de microfiltración

Tras alcanzar un volumen de 0,5 L de lactosuero, éste se almacenó a 5°C en una cámara de refrigeración hasta su tratamiento (máximo 2 días). Los ensayos tuvieron una duración aproximada de 1 hora.

3.2.3. Procesado de Muestras

3.2.3.1. Tratamiento Térmico

Para llevar a cabo los tratamientos térmicos, 300 μL de las muestras fueron envasadas por separado en bolsas de polietileno termoselladas resistentes a altas temperaturas. Las muestras sometidas a 75°C, 85°C y 95°C fueron tratadas en un baño Lauda Controller E300 Baths EcoLine 012 (Lauda-Königshofen, Alemania) (**Figura 11**), precalentado previamente a la temperatura de tratamiento con el fin de producir un incremento rápido de la temperatura de la muestra. Al finalizar cada tratamiento, las muestras se colocaron en agua con hielo para un enfriamiento rápido. Después, las muestras se pasaron a tubos eppendorf específicos para una baja retención de proteínas, *LoBind Protein Tubes* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis. Para cada tratamiento se realizaron duplicados de cada muestra.

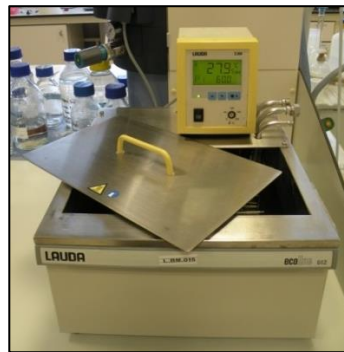


Figura 11. Baño termostático Lauda Controller E300 Baths EcoLine 012

Para alcanzar temperaturas superiores a 100°C se empleó un autoclave piloto Sundry APR-95 (Vizcaya, España) donde se procesaron las muestras en las mismas condiciones de envasado y volumen que las empleadas a temperaturas más bajas en el baño termostático. La variación de la temperatura de las muestras siguió el mismo perfil de incremento, mantenimiento y bajada de la temperatura que la consigna establecida en el autoclave. Al sacar las muestras del autoclave, se introdujeron en agua con hielo y se siguió el mismo protocolo que el descrito para temperaturas más bajas.

3.2.3.2. Pulsos de Luz

Los tratamientos mediante pulsos de luz se llevaron a cabo con el equipo SBS-XeMaticA-(L+L) de SteriBeam Systems, Alemania (**Figura 12**). Para la emisión de pulsos de luz, la energía eléctrica es almacenada en un condensador para a continuación liberarse rápidamente a las dos lámparas de Xenón que dispone el equipo emitiendo pulsos de luz de alta intensidad y 325 μs de duración. El espectro de luz emitido incluye longitudes de onda (λ)

desde 200 nm hasta 1000 nm con una considerable cantidad de luz (aproximadamente el 40%) en el espectro UV-C.

La cámara de tratamiento consta de una bandeja de cuarzo, de dimensiones 195x134 mm, donde se disponen las muestras. Esta bandeja se localiza entre las dos lámparas de xenón situadas en la parte superior e inferior de la cámara de tratamiento. Tanto los reflectores de las lámparas como las paredes de la cámara de tratamiento son de acero inoxidable altamente reflectante. El equipo está equipado además con un sistema de refrigeración por aire formado por un pequeño ventilador próximo a cada lámpara.

El equipo empleado en este estudio permite seleccionar automáticamente el voltaje del pulso (entre 1,8 y 2,8 kV) y variar la distancia de las muestras a la lámpara de xenón (4-8 cm) mediante el desplazamiento vertical de la bandeja de cuarzo sobre la que se sitúan las muestras. En un estudio previo ([Artíguez y Martínez de Marañón, 2014](#)) la fluencia por pulso (J/cm^2) se midió mediante un medidor de energía (QE25-LP-H-MB, Gentec, Canadá) conectado a un sistema electrónico de adquisición de datos (Solo2, Gentec, Canadá) para determinar la fluencia en función de la posición de la muestra. Para la posición empleada y la distancia, la fluencia fue de $0,55 \text{ J}/\text{cm}^2$, como lo describieron [Artíguez y Martínez de Marañón \(2014\)](#). Por tanto, la fluencia total que incide sobre la muestra viene determinada por la fluencia del pulso y el número de pulsos aplicados como viene descrito en el **apartado 1.5.2.2. (Ecuación 1)**.

Para el tratamiento de β -Lactoglobulina (β -Lg) comercial purificada y diluida en los buffers preparados a distintos pH, 300 μL de cada muestra fueron introducidos en cubetas de cuarzo (1 mm de espesor) y se colocaron en el centro de la bandeja de cuarzo a 6 cm de la lámpara de Xenon superior con la lámpara inferior desactivada, por lo que la luz sólo fue emitida por la lámpara situada en la parte superior. Puesto que la fluencia por pulso a esta distancia fue $0,55 \text{ J}/\text{cm}^2$ ([Artíguez y Martínez de Marañón, 2014](#)) y se aplicaron 7, 15, 22 y 29 pulsos, la fluencia total de cada tratamiento fue $3,85 \text{ J}/\text{cm}^2$, $8,25 \text{ J}/\text{cm}^2$, $12,1 \text{ J}/\text{cm}^2$ y $15,95 \text{ J}/\text{cm}^2$, respectivamente. Estas condiciones no generan un incremento significativo de la temperatura (en torno a $0,6^\circ\text{C}/\text{pulso}$), como se ha mostrado anteriormente ([Lasagabaster, 2009](#)) lo que llevaría a un ΔT máximo de $17,4^\circ\text{C}$ para el tratamiento más intenso de $15,95 \text{ J}/\text{cm}^2$, alcanzándose por tanto una temperatura máxima en la muestra cercana a 40°C .

Para el procesado mediante luz pulsada del lactosuero (ácido e industrial), se trataron por separado 100 mL de ambos tipos de lactosuero. Para ello se usó como reactor una caja de cuarzo (16,6 x 9,8 cm) que se situó a 8 cm de la lámpara de Xenon superior mientras la lámpara inferior fue desactivada, lo que permitió aplicar una fluencia por pulso de $0,4 \text{ J}/\text{cm}^2$ como se recoge en un trabajo anterior ([Fernández et al., 2012](#)). Con el fin de obtener un tratamiento más homogéneo, se agitó el lactosuero entre cada pulso mediante un agitador magnético. Puesto que la fluencia por pulso a esta distancia fue $0,4 \text{ J}/\text{cm}^2$ y se aplicaron 7, 15, 22 y 29 pulsos, la fluencia total de cada tratamiento fue $2,8 \text{ J}/\text{cm}^2$, $6 \text{ J}/\text{cm}^2$, $8,8 \text{ J}/\text{cm}^2$ y $11,6$

J/cm². El lactosuero fue agitado tras cada pulso para asegurar un tratamiento homogéneo en toda la muestra.



Figura 12. Equipo de pulsos de luz SBS-XeMaticA-(L+L)

Se realizaron duplicados para cada condición de procesado en al menos tres tratamientos independientes. Por último, todas las muestras se recogieron en tubos eppendorf *LoBind Protein* y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

3.2.3.3. Procesado por Altas Presiones

Los tratamientos por *Alta Presión Hidrostática* (APH) así como los *Tratamientos Térmicos Asistidos por Presión* (TTAP) se realizaron en un equipo de escala industrial WAVE 6000/55HT (Hiperbaric, Burgos, España) capaz de combinar altas presiones (hasta 625 MPa) con temperatura (máximo 117°C) para el procesado de alimentos (**Figura 13**). Posee un diseño horizontal que permite minimizar la existencia de gradientes de temperatura en su interior. El fluido de transmisión utilizado fue agua.

La medición de la temperatura en el interior de la cámara de tratamiento se llevó a cabo por dos termopares en cada extremo que permitieron medir la temperatura del agua durante el ciclo de tratamiento. El registro de presión y temperatura en cada ciclo se realizó mediante el software SCADA (Supervisory Control And Data Acquisition, Hiperbaric). Hasta la fecha no existen sondas de temperatura disponibles aptas para ser introducidas en el equipo de altas presiones (se están desarrollando en la actualidad algunos prototipos que todavía no están validados) de tal forma que se pueda monitorizar la temperatura en el centro del producto. Por ello, a lo largo de este trabajo se ha realizado una aproximación de la temperatura en el interior del producto (mayoritariamente constituido de agua) considerando que su temperatura es igual a la del agua de tratamiento, dado el calentamiento adiabático e instantáneo que se produce (*Knorr et al., 2004*).

Para los tratamientos de APH y TTAP, 300 µL de cada muestra fueron empaquetados en bolsas de polietileno termoselladas resistentes a altas temperaturas y alta presión. Para los tratamientos por APH y TTAP se trabajó a 500 y 600 MPa, durante tiempos de tratamiento de 0 (el ciclo finaliza inmediatamente tras alcanzar la presión programada), 1, 3 y 6 minutos de

tratamiento. Para los tratamientos TTAP se trabajó como temperatura final de consigna de: 75°C, 95°C y 115°C. Dependiendo de la temperatura y presión final del TTAP, la temperatura del agua al inicio (presión atmosférica) o lo que es lo mismo la temperatura de entrada de las muestras (envases de 300 μ L), fueron diferentes. En el caso del tratamiento APH, la temperatura inicial del agua fue de 10°C y 7°C para presiones de 500 y 600 MPa respectivamente, alcanzando una temperatura final de tratamiento de 22°C.



Figura 13. Equipo de altas presiones hidrostáticas Wave 6000/55HT

El aumento de presión durante la presurización de las muestras se produjo a una velocidad media de 3 MPa/s, incremento que siempre va acompañado de un aumento de temperatura en el producto debido a la transformación de energía durante la compresión (Knorr *et al.*, 2004). La velocidad de aumento de la temperatura para las diferentes condiciones de procesado TTAP varió entre 0,11°C/s (tratamiento menos intenso: 500MPa/75°C) y 0,14°C/s (tratamiento más intenso: 600MPa/115°C) para los tratamientos aplicados, y están acorde al trabajo de Makita (1992) que muestra que el incremento de temperatura varía en función de la temperatura inicial del mismo y de las condiciones de presión fijadas (Figura 8). Una vez alcanzada la temperatura de tratamiento, la vasija termostatazada permitió mantener constante la temperatura de la cámara de tratamiento ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante el tiempo requerido de procesado. Al finalizar el tiempo de tratamiento, la presión fue liberada instantáneamente (se requieren aprox. 2 segundos para llegar de nuevo a presión atmosférica), ocurriendo en el caso de 0 minutos de procesado una vez alcanzada la presión de consigna (presión final de tratamiento). Esta despresurización conlleva un enfriamiento de la muestra y del agua que la rodea hasta la temperatura inicial previa a la presurización.

Tras el tratamiento, las muestras sometidas a APH se refrigeraron ($4\pm 1^\circ\text{C}$) directamente mientras que las muestras habiendo sido sometidas a TTAP fueron rápidamente enfriadas en agua con hielo y posteriormente almacenadas en refrigeración hasta su análisis.

3.2.3.4. Liofilización

Para la liofilización del lactosuero, 1 mL de cada muestra fue colocada en viales específicos para este tratamiento. Primeramente, estas muestras se llevaron a congelación hasta -20°C y se dejaron durante la noche. Después se colocaron en las bandejas porta-producto del equipo de secado. La liofilización se llevó a cabo a escala piloto en un liofilizador Telstar LyoBeta 15 (Terrassa, España) a -25°C durante 26 horas alcanzando una temperatura final de 10°C manteniendo una presión de 0,16 mbar durante el tratamiento. Al finalizar, las muestras se conservaron en refrigeración hasta su empleo.

3.2.4. Ensayos Inmunoenzimáticos

3.2.4.1. ELISA Directo

Se llevó a cabo un ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) directo con el fin primero de definir la relación óptima entre las inmunoglobulinas E recombinantes (IgEr) y la β -Lactoglobulina (β -Lg). En la **Figura 14** se muestra el diagrama de flujo para el procedimiento de ELISA directo.

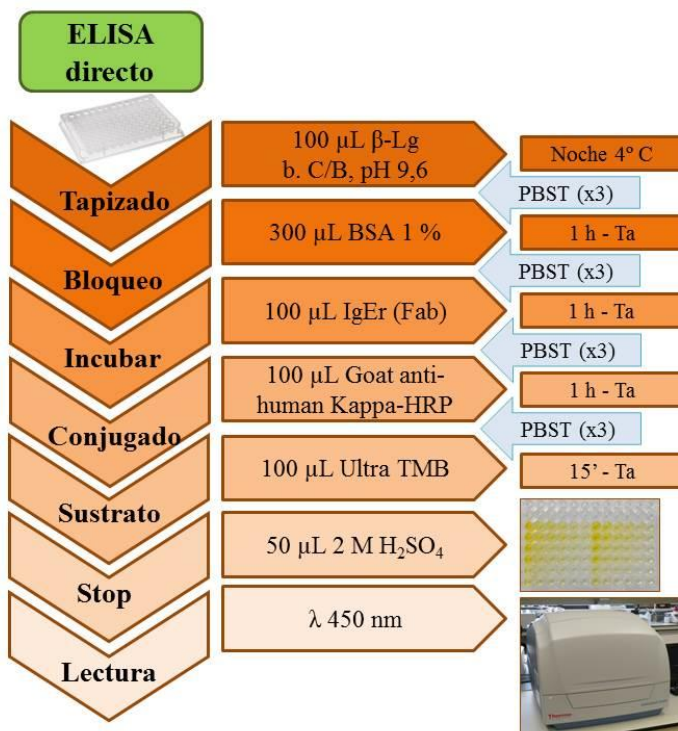


Figura 14. Diagrama de flujo de ELISA directo

Primero, las placas fueron tapizadas con 100 µL de β -Lg purificada (5-10 µg/mL) en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0,05M, pH 9,6. Tras dejar las placas durante la noche en refrigeración a $4,5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), los pocillos se lavaron tres veces con PBST (*Phosphate Buffered Saline-Tween*)

(de ahora en adelante será indicado como *PBST (x3)*). Después, los pocillos se bloquearon con 300 μL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) al 1 % (p/v) en PBS (*Phosphate Buffered Saline*), se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente (T_a) y se lavó de nuevo con *PBST (x3)*. Seguido, se añadieron a los pocillos 100 μL de diluciones seriadas de IgEr en PBS, y se dejó incubar durante 1 hora a T_a . Tras lavar con *PBST (x3)* se incubaron 100 μL de anticuerpo secundario (conjugado), Goat anti-human Kappa-HRP, en diluciones seriadas de PBS a T_a durante 1 hora. Finalmente se lavaron las placas con *PBST (x3)*, se añadieron 100 μL del sustrato TMB por pocillo y se dejó incubar durante 15 minutos aproximadamente. Después, la reacción enzimática se detuvo añadiendo 50 μL por pocillo de H_2SO_4 2M, y se leyeron las absorbancias a 450 nm en un lector Thermo Scientific™ Varioskan Flash (Waltham, Estados Unidos). Cada muestra, es decir, cada combinación tapizado/IgE/Kappa-HRP se analizó por triplicado en al menos dos experimentos independientes.

3.2.4.2. Inmunoreactividad por ELISA competitivo indirecto

Después de realizar el ELISA directo y a partir de sus resultados, se establecieron las condiciones a estudiar en ELISA competitivo indirecto (ciELISA). Estos parámetros de estudio no necesariamente coinciden con los mejores valores obtenidos en el ELISA directo puesto que al pasar de una metodología a otra pueden surgir ciertas variaciones en la optimización del método.

En la **Figura 15** se muestra el diagrama de flujo para el procedimiento del ciELISA. Las placas fueron primeramente tapizadas con 100 μL por pocillo de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de β -Lg purificada en tampón de carbonato-bicarbonato sódico 0,05 M, pH 9,6. Tras dejar las placas a 4,5°C (\pm 2°C) durante la noche, éstas se lavaron con *PBST (x3)*. Después, se bloqueó cada pocillo con 300 μL de BSA en PBS al 1 % (p/v), se dejó incubar durante 1 hora a T_a y se lavó con *PBST (x3)*. Entonces se pasó a la etapa de competición en la que se añadió a cada pocillo 100 μL de una mezcla (1:1) de IgEr y diluciones seriadas de β -Lg purificada a concentraciones conocidas, diluido en PBS. También se incubaron dos tipos de controles: PBS como control blanco; e IgEr (sin β -Lg) como control negativo. La reacción de competición tuvo lugar durante 2 horas a T_a . Se lavaron los pocillos con *PBST (x3)*, se incubaron con 100 μL de conjugado diluido durante 1 hora a T_a y se volvieron a lavar con *PBST (x3)*. Finalmente, la reacción enzimática se detuvo añadiendo 50 μL por pocillo de H_2SO_4 2M y se leyeron las absorbancias a 450 nm en un lector Thermo Scientific™ Varioskan Flash (Waltham, Estados Unidos). Cada muestra fue incubada por triplicada en al menos dos experimentos independientes.

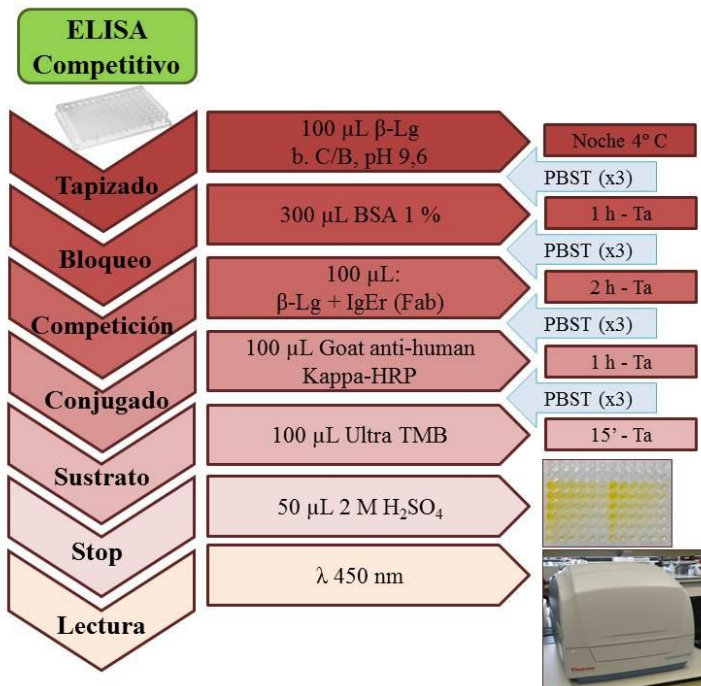


Figura 15. Diagrama de flujo de ELISA competitivo

Una vez establecidas las condiciones de análisis a partir de soluciones de β -Lg sin tratar (nativa), los resultados obtenidos mediante ciELISA utilizando muestras tratadas fueron expresados como porcentaje de inhibición en la unión antígeno-anticuerpo, según la **Ecuación 2** (adaptada de [Lavilla et al., 2016](#)):

$$\text{Porcentaje de Inhibición (I \%)} = \frac{DO_{\text{muestra}} - DO_{0\%}}{DO_{100\%} - DO_{0\%}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde DO_{muestra} hace referencia al valor de absorbancia (DO, densidad óptica) para la muestra sometida a tratamiento, $DO_{0\%}$ es el valor de la muestra control (sin tratar) y $DO_{100\%}$ es la absorbancia del control negativo (sin β -Lg). Por tanto, un valor positivo de 0 % a 100 % de inhibición en la unión β -Lg - IgE indica una reducción en la unión con IgE de la proteína tratada (con una hipotética reducción de la alergenicidad); mientras que valores negativos indican un aumento en el reconocimiento de la proteína por parte de la IgE recombinante (teóricamente, aumento de la alergenicidad).

3.2.4.3. Detección de β -Lactoglobulina por Sandwich ELISA

Los métodos tradicionales de detección de alérgenos se basan en la unión con IgG. Para determinar la afinidad β -Lg-IgG se empleó un kit comercial de detección *Proteon β -Lactoglobulin* de Zeulab y se siguieron las instrucciones suministradas por el fabricante. Brevemente, los componentes del kit se dejaron atemperar a T_a durante al menos 30 minutos.

Después, 100 μL de las correspondientes diluciones del estándar y de las muestras a estudiar se añadieron en cada pocillo de la placa pretapizada (con un anticuerpo policlonal anti- $\beta\text{-Lg}$) y se incubaron durante 30 minutos a T_a . Tras lavar tres veces con PBS, los pocillos se incubaron con 100 μL del conjugado, IgG, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a lavar con PBS (x3) y finalmente se añadieron 100 μL por pocillo de sustrato y se dejó reaccionar durante 30 minutos a T_a . La reacción enzimática se paró añadiendo 50 μL de la solución Stop en cada pocillo. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de placas Thermo Scientific™ Varioskan Flash.

3.2.4.4. Inmunodotting

El proceso metodológico inmunodotting solo se puede emplear como técnica de presencia/ausencia de la biomolécula o biomoléculas a detectar, no como método de cuantificación. Por tanto, para la detección se aplicó un volumen de 2 μL del marcador a trabajar (antígeno/anticuerpo) en membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm de tamaño de poro. Una vez secas las muestras aplicadas, se bloquearon los sitios libres en la membrana con diferentes soluciones a estudiar (ovoalbúmina 1,5%, o BSA 1%) durante 1 hora a T_a . Posteriormente, después de 3 lavados con PBS, la membrana se incubó con los plasmas de los pacientes durante 2 horas a T_a y las membranas se volvieron a lavar 3 veces con PBS para proceder a la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a T_a . Finalmente, tras un último lavado con PBS (x3) y se añadió el sustrato (4-Chloro-1-naphthol) disuelto en una mezcla de metanol, agua destilada y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la proporción 3mg :1mL :2mL :5 μL , respectivamente, para el desarrollo colorimétrico de las muestras. La reacción se detuvo lavando las membranas de nitrocelulosa en abundante agua destilada.

3.2.5. Otros Experimentos y Análisis

3.2.5.1. Electroforesis Native-PAGE

Se realizaron análisis electroforéticos para aquellas muestras controles (sin tratar) y tratadas. La electroforesis se desarrolló en un equipo PhastGel System (Pharmacia, Champaign, IL) (**Figura 16**) siguiendo las recomendaciones del fabricante de la **Tabla 4** (Ficha Técnica de Separación, Nº 120). Las muestras suspendidas en el mismo medio de tratamiento fueron analizadas con geles de gradiente de acrilamida 8-25%. Tras la separación, los geles se tiñeron por inmersión en el preparado al 0,065% de azul de Coomassie R. Después, se eliminó el excedente de tinción por inmersión en la disolución decolorante. Los geles se dejaron secar en su mismo embalaje a temperatura ambiente.



Figura 16. Equipo PhastSystem

Tabla 4. Método optimizado para Native-PAGE en los medios de gradiente PhastGel para programar el método de separación del PhastSystem

| | | |
|-----------------------------|---------------|--------------------|
| Sample Appl. Down at | 1,2 | 0 Vh |
| Sample Appl. Up at | 1,2 | 2 Vh |
| Sep 1.1 | 400 V 10,0 mA | 2,5 W 15° C 10 Vh |
| Sep 1.2 | 400 V 0,1 mA | 2,5 W 15° C 2 Vh |
| Sep 1.3 | 400 V 10,0 mA | 2,5 W 15° C 268 Vh |

3.2.5.2. Digestibilidad *In-Vitro*

Para los ensayos de digestión enzimática se preparó un tampón gástrico simulado de glicina ($C_2H_5NO_2$) al 0,01M, y de NaCl al 0,03M, a pH 2,5. Con este medio se preparó una solución stock de pepsina 0,5 mg/mL en tampón gástrico simulado y se dejó en hielo hasta su uso. Las soluciones stock de pepsina fueron preparadas inmediatamente antes de cada ensayo.

Para la digestión, 500 μ L de muestras de 2000 μ g/mL de β -Lg y de los lactosueros se añadieron por separado en 400 μ L del medio tamponado glicina-NaCl pH 2,5. Posteriormente, se ajustó el pH a un valor cercano a 2 con 50 μ L de HCl (1N para las muestras de β -Lg en tampón acetato a pH 4,6 y lactosuero ácido; y 2N para las muestras de β -Lg en tampón fosfato pH 6,8 y lactosuero industrial). Una vez alcanzado el pH óptimo para la acción de la pepsina, las muestras se colocaron en un baño de agua caliente a 37°C –temperatura controlada- y se dejaron atemperar durante 5 minutos. Tras añadir 50 μ L de la solución enzimática (relación enzima-sustrato 1:40) para dar inicio al proceso de hidrólisis, se recogieron alícuotas en los tiempos 1 segundo (inmediatamente tras la adición de la enzima), 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 15 minutos y 60 minutos. La hidrólisis se paró, para cada tiempo de digestión, añadiendo inmediatamente 100 μ L de las alícuotas de hidrolizado en 20 μ L de una disolución de carbonato/bicarbonato 0,5M a pH 9,6 para alcanzar un pH final cercano al 7,0. Las muestras hidrolizadas se mantuvieron en refrigeración hasta el análisis. La relación final enzima:sustrato fue 1:40.

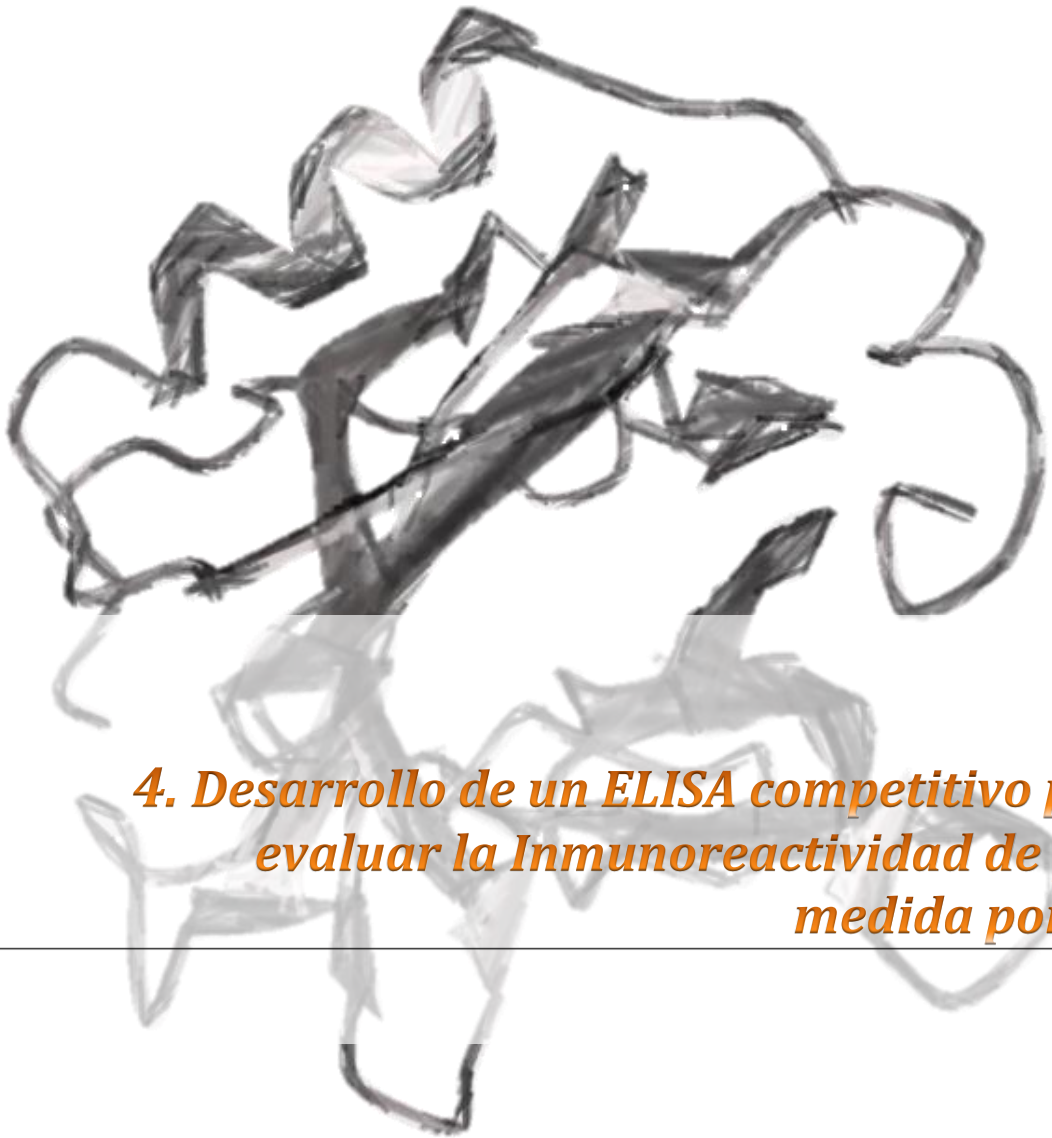
3.2.5.3. Electroforesis SDS-PAGE

Los productos de digestión se acondicionaron para su separación en el gel. Para ello 50 μL de cada muestra se colocaron en eppendorf tipo *LoBind Protein* y se añadieron a 45 μL de la dilución Tris 20 mM - EDTA 2 mM, 10 μL de SDS al 25%, y 5 μL β -mercaptoetanol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$). Se llevó a ebullición durante 5 minutos.

Las muestras se llevaron a análisis en geles de electroforesis de gradiente de acrilamida 8-25 % en un equipo PhastGel System. La separación se llevó a cabo siguiendo el manual del fabricante de la **Tabla 5** (Ficha Técnica de Separación, N^o 110). Finalmente, se siguió el mismo procedimiento de tinción y decoloración que para la Native-PAGE. Los geles se dejaron secar en su mismo embalaje a temperatura ambiente para su conservación.

Tabla 5. Método optimizado para SDS-PAGE con un gradiente PhastGel 8-25 para programar el método de separación del PhastSystem

| | | | |
|-----------------------------|---------------|-------|-------------|
| Sample Appl. Down at | | 2,1 | 1 Vh |
| Sample Appl. Up at | | 2,1 | 10 Vh |
| Sep 2.1 | 250 V 10,0 mA | 3,0 W | 15° C 65 Vh |
| Sep 2.2 | 50 V 0,1 mA | 0,5 W | 15° C 0 Vh |



***4. Desarrollo de un ELISA competitivo para
evaluar la Inmunoreactividad de β -Lg
medida por IgE***

4.1. Introducción y Objetivo

La β -Lactoglobulina (β -Lg) está considerada como el mayor alérgeno presente en la fracción sérica de la leche; es decir, la proteína presente en mayor proporción y la más intensamente reconocida por las inmunoglobulinas (Ig) E humanas (Wal *et al.*, 1995; Wal, 2001; Wal, 2002). Dadas sus propiedades tecnológicas, como la gelificación, la emulsificación, o su capacidad espumante, es ampliamente utilizada como ingrediente en la industria alimentaria (Damodaran, 2005; Bromley *et al.*, 2006; van den Berg *et al.*, 2008; Foegeding *et al.*, 2010). Por ello, son necesarios robustos métodos de identificación para asegurar la protección de los consumidores.

Tradicionalmente, los métodos inmunoquímicos empleados para la detección de alérgenos se basan bien en el uso de anticuerpos IgG policlonales obtenidos de animales inmunizados, bien en *pools* aislados de suero humano de pacientes alérgicos (IgE) o, en algunos casos, de anticuerpos monoclonales producidos por tecnología de hibridoma (Poms *et al.*, 2004; van Hengel, 2007). No obstante, tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales, habitualmente reconocen epítomos inmunogénicos de las proteínas, es decir, aquellos reconocidos por IgG, que no son necesariamente los mismos epítomos alérgicos reconocidos por las IgE, desencadenantes de la respuesta alérgica. Es decir, que la detección de una proteína no está siempre relacionada con su potencial alérgico, y los epítomos involucrados en las reacciones alérgicas tienden a no ser reconocidos por los test ELISA más comúnmente empleados, los tipo Sandwich (de Luis *et al.*, 2007). Por tanto, resulta necesario contar con un método analítico basado en anticuerpos IgE para así relacionar la detección con el potencial alérgico real de la proteína. El desarrollo de un kit o sistema validado no puede basarse en muestras de sueros de pacientes ya que la estandarización del método con fines comerciales resulta dificultosa por la gran variabilidad entre las IgE de los sueros de pacientes alérgicos. Sin embargo, a día de hoy es posible la producción anticuerpos humanos recombinantes (McCafferty *et al.*, 1990) que permiten una detección *in-vitro* estandarizada de β -Lg gracias a su homogeneidad y especificidad (Jylhä *et al.*, 2009).

A la hora de desarrollar un método analítico para alérgenos basado en el reconocimiento por IgE, se han de tener en cuenta diversos factores. Por un lado, la composición de la matriz alimentaria (proteínas, grasas, sales,...), ya que puede tener un gran impacto en la estimulación de reacciones alérgicas (Orruño y Morgan, 2006). Se ha visto que pacientes alérgicos al huevo lo toleran mejor en una matriz rica en trigo, como puede ser un producto de bollería, que en su ausencia (Sopo *et al.*, 2016), así como una menor respuesta alérgica al cacahuete en una matriz rica en grasa frente a un producto con la misma receta baja en grasa Grimshaw *et al.* (2003). Por otro lado, el procesado de los alimentos es otro factor a considerar ya que puede dar lugar a alteraciones en la estructura de las proteínas que a su vez pueden provocar la destrucción, modificación, enmascarado o desenmascarado de epítomos y, así, reducir, aumentar o no tener ningún efecto en la alergenidad de la proteína

(Sathe *et al.*, 2005; Mills *et al.*, 2009; Bu *et al.*, 2009b). Concretamente, el tratamiento térmico, uno de los procesos más empleados en la industria láctea y alimentaria en general (Shriver y Yang, 2011, Bu *et al.*, 2013), puede inducir la desnaturalización de proteínas (pérdida de configuraciones secundaria y terciaria), formación de nuevas uniones intra- e intermoleculares, agregación, y/o reorganizaciones por enlaces disulfuro (S-S) por otras modificaciones conformacionales que dan lugar a cambios en la reactividad del alérgeno (Bu *et al.*, 2013; Besler *et al.*, 2001; Shriver y Yang, 2011). Por tanto, además de la disparidad entre los puntos de reconocimiento para IgG e IgE comentada anteriormente, las alteraciones en los epítomos inducidas por el procesado o la interacción con otras moléculas presentes en la matriz alimentaria, reafirman la necesidad del desarrollo de métodos analíticos de reconocimiento basados en IgE ya que la detección y la alergenicidad pueden verse alteradas de distinta manera.

El objetivo de este estudio fue por tanto implementar una técnica analítica que permitiese poner en evidencia y medir los cambios en la inmunoreactividad de la β -Lg provocados por el impacto de diferentes procesos tecnológicos con el fin de poder evaluar posibles soluciones tecnológicas para producir β -Lg con potencial alergénico reducido y, a su vez, ver la validez de dicho método para ser utilizado con matrices alimentarias que presentan β -Lg de forma natural, leche y lactosuero, también tras ser procesadas.

4.2. Resultados y Discusión

En este trabajo se ha desarrollado, optimizado y empleado una metodología tipo *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* competitivo indirecto (ciELISA), empleando inmunoglobulinas E recombinantes (IgEr) monoclonales. La selección del método se ha hecho en base a la disponibilidad de estos anticuerpos específicos para la β -Lg: la implementación de un Sandwich ELISA, típicamente empleado en los kits de detección, requiere al menos dos sitios diferentes de unión y, por tanto, el uso de dos tipos diferentes de anticuerpos para detectar la proteína. En nuestro caso, al trabajar con anticuerpos monoclonales, no era posible trabajar en Sandwich ELISA y, por ello, se seleccionó el método competitivo, simplificando el análisis al reducir el uso de anticuerpos. El ciELISA desarrollado se basa en la competición en placa entre la β -Lg nativa (sin procesar) unida a la base de los pocillos y la misma proteína nativa (control, sin procesar) o la proteína modificada (procesada) presente en las muestras a estudiar, por unirse con los anticuerpos IgEr anti- β -Lg. Así, las diferencias en estructura y unión del anticuerpo causadas por los tratamientos pueden ser fácilmente determinadas con tan solo un anticuerpo anti- β -Lg.

A continuación, se detalla el procedimiento seguido en el desarrollo del método inmunoenzimático tipo ciELISA que permite detectar cambios en la β -Lg.

Primeramente, se puso a punto la metodología para el análisis de la inmunoreactividad de la β -Lg nativa (sin procesar), tanto purificada como en matrices alimentarias, empleando diferentes concentraciones de β -Lg, inmunoglobulinas E recombinante (IgEr) y de anticuerpo secundario (Ac_s) anti-kappa-HPR, en un mismo ELISA directo. El objetivo de esta fase fue determinar las concentraciones óptimas de estos reactivos, así como establecer los tiempos de incubación, de forma que el resultado fuera igual que el control negativo del método competitivo (el control sin β -Lg, sólo IgEr). Es decir, conocer aquellos parámetros que ofrezcan mayor absorbancia dentro del rango lineal de detección.

Después, se procedió al desarrollo del método ciELISA para confirmar el rango de concentraciones de muestras y reactivos donde la relación con la absorbancia fuese lineal y cuantificable.

Por último, se procedió a evaluar con el ciELISA desarrollado el efecto del tratamiento térmico sobre la inmunoreactividad de la β -Lg en diferentes matrices que difieren por su pH o por su composición. Las muestras fueron diluciones de β -Lg purificada (2000 μ g/mL) en tampón acetato a pH 4,6 (pH del suero ácido) y en tampón fosfato a pH 6,8 (pH similar a la leche), lactosuero obtenido por acidificación de leche de vaca con HCl 4M (pH 4,6), y leche desnatada (pH 6,6).

4.2.1. Ensayos Inmunoenzimáticos para Muestras No Procesadas

4.2.1.1. ELISA directo para β -Lactoglobulina purificada

La metodología del ELISA directo para β -Lg purificada nativa se detalla en el *apartado 3.2.4.1*. En la **Figura 17** se muestra la Densidad Óptica a 450 nm (DO_{450nm}) obtenida en distintas condiciones de ELISA, para diferentes valores de dilución (su inverso, $1/X_i$) representándose en la figura su inverso, es decir, los niveles de dilución de la IgE recombinante (IgEr). Las barras de error representan la desviación estándar (de). Según muestra la **Figura 17**, las condiciones que dan valores de absorbancia mayor a dos unidades ($DO_{450nm} > 2$) presentaron alta variabilidad. Esto puede ser debido a trabajar con el espectrofotómetro empleado (lector de microplacas) en condiciones de no linealidad en este rango de absorbancias, no pudiéndose aplicar la Ley de Lambert-Beer (como se recoge en [Penner, 2014](#)). Por este motivo, las condiciones que dan absorbancias superiores a 2 fueron descartadas en los siguientes ensayos. Teniendo en cuenta que en el método competitivo a desarrollar (ver apartado siguiente), la relación entre la concentración y la absorbancia es indirecta, es decir, inversamente proporcional y, por tanto, a mayor concentración de β -Lg la señal de absorbancia será menor, las condiciones aquí seleccionadas se referirán a la muestra con mayor absorbancia dentro del rango lineal de detección. Del mismo modo, una absorbancia demasiado baja ($DO_{450nm} < 0,6$) en el ELISA directo podría no permitir una adecuada cuantificación de las diferentes concentraciones de β -Lg en el método competitivo por la baja señal de las muestras.

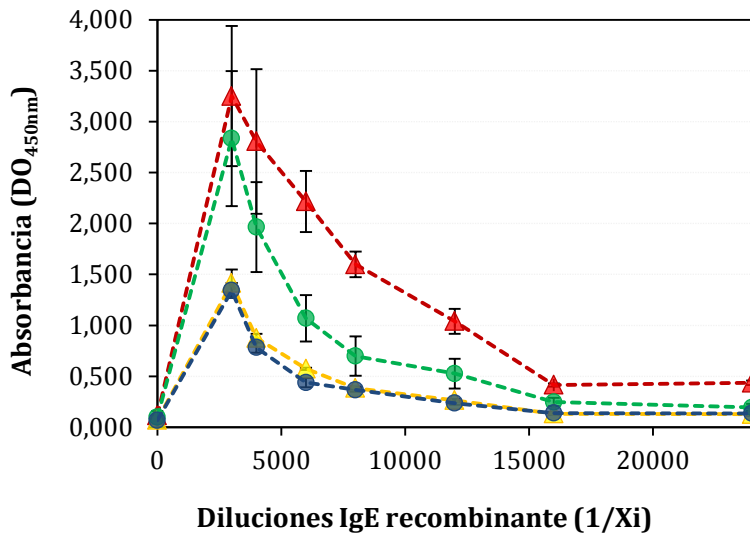


Figura 17. Absorbancias de diluciones seriadas de IgEr en distintas condiciones de ELISA directo: tapizado con 5 µg/mL β-Lg, incubado con 1/4000 (---▲---), y con 1/8000 (---★---) de anti-IgE Kappa-HRP; y tapizado con 10 µg/mL β-Lg, incubado con 1/4000 (---●---) y con 1/8000 (---○---) anti-IgE Kappa-HRP - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

Por consiguiente, atendiendo a los valores de absorbancia situados en el rango de 0,600 a 2,000, las incubaciones con 1/4000 de IgEr (símbolos rellenos) presentaron mayor variabilidad que a 1/8000 (símbolos vacíos), y por tanto fueron descartadas. Esto redujo las condiciones de estudio a diluciones de IgEr entre 1/2000 y 1/4000 para incubaciones con 1/8000 de IgEr. La concentración de β-Lg en el tapizado no afectó a la medida pero como se tuvo en cuenta un uso racional de los reactivos a la hora de seleccionar unas condiciones de estudio óptimas (el uso de la menor cantidad de reactivo que permita obtener los mejores resultados), se seleccionó 0,5 µg/mL de β-Lg para el tapizado y 1/4000 (dilución final) de IgEr.

4.2.1.2. ELISA competitivo indirecto para β-Lactoglobulina purificada

Fijadas las concentraciones de los reactivos (apartado anterior) así como el resto de condiciones (tiempos de incubación, temperatura, lavados,... Ver *apartado 3.2.4.1.*), se llevó a cabo un ciELISA para conocer el rango de concentraciones de β-Lg purificada donde la relación entre la concentración de β-Lg y la absorbancia fuera lineal y cuantificable. El resultado se muestra en la **Figura 18** e indica que la linealidad ($r^2 = 0,9801$) se consiguió para aquellas concentraciones de β-Lg comprendidas entre Log 2,49 ng/mL y Log 3,70 ng/mL, es decir, entre 0,31 µg/mL y 5 µg/mL de β-Lg. Estos resultados han sido contrastados con los obtenidos por *Jylhä et al. (2009)* para β-Lg nativa empleando la misma IgEr. En dicho trabajo se estudiaron diluciones decimales de β-Lg (10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 µM) y, aparentemente, la linealidad para la cuantificación de proteína competidora en el ciELISA se obtuvo a

concentraciones de β -Lg comprendidas entre 0,01 y 0,1 μ M (0,18 – 1,80 μ g/mL). Sin embargo, en nuestro trabajo hemos obtenido un rango de detección lineal más amplio, hasta 5 μ g/mL. Además, [Jylhä et al. \(2009\)](#) no analizaron más concentraciones intermedias entre estos dos valores y la regresión lineal no fue establecida. En nuestro estudio, sin embargo, se comprobó la linealidad integrando concentraciones de β -Lg intermedias (**Figura 18**), donde la relación con la absorbancia fue lineal, para una detección y cuantificación fiables, y se estableció el límite de detección del método con IgEr en 0,31 μ g/mL.

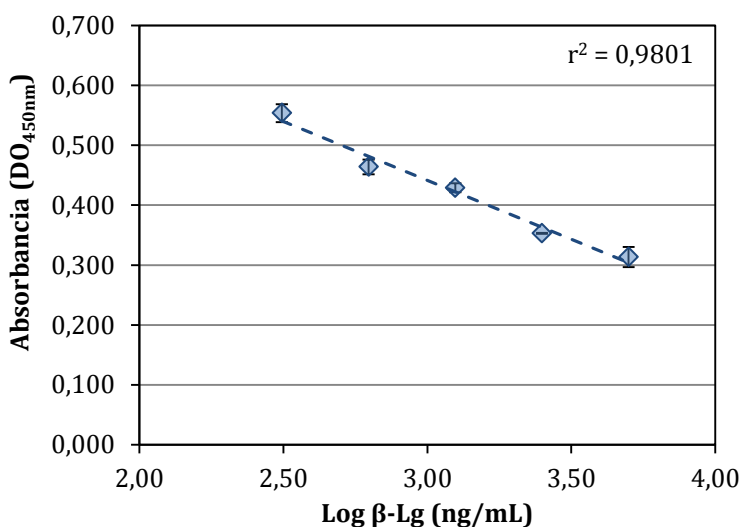


Figura 18. Recta de calibrado obtenida por ciELISA para determinar el límite de detección de β -Lg por soluciones estándar de IgEr con β -Lg purificada en PBS (◆, $r^2 = 0,9801$) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

El método aquí desarrollado permite por tanto la detección con inmunoglobulinas tipo E, principal responsable de las reacciones de hipersensibilidad tipo I, al contrario que la gran parte de los métodos de detección más convencionales que están basados en las interacciones de los alérgenos con IgG policlonales ([Monaci y Visconti, 2010](#)). Gracias al método desarrollado en este trabajo, sería posible establecer una mejor relación entre la detección y la alergenicidad de la β -Lg presente en los alimentos.

4.2.1.3. Manejo del ciELISA con matrices alimentarias

A pesar de que la IgEr empleada tiene una alta especificidad ([Jylhä et al., 2009](#)) y con objeto de desarrollar un inmunoensayo fiable, es necesario comprobar si la presencia de otros componentes alimentarios alteran o enmascaran la detección de la proteína en estudio (la β -Lg), ya que por ejemplo se sabe que en ocasiones los ELISA son sensibles a interferencias de la matriz ([Yeung, 2006](#)). Por ello, el ciELISA desarrollado en esta primera fase fue sometido a estudio con matrices alimentarias más complejas fuentes naturales de β -Lg como son la leche desnatada y el lactosuero ácido (pH 4,6) obtenido por la acidificación de la leche desnatada.

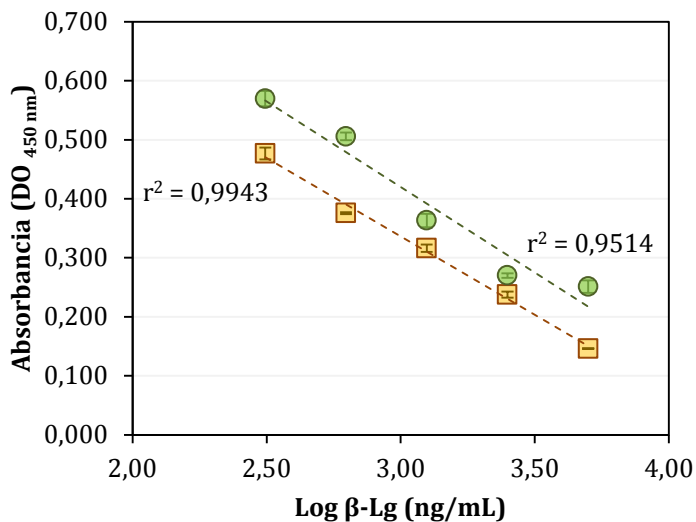


Figura 19. Relación entre la absorbancia y la concentración de β-Lg en leche desnatada (■, $r^2 = 0,9943$) y en lactosuero ácido (●, $r^2 = 0,9514$) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

Los resultados del ciELISA para cada matriz se muestran en la **Figura 19**, los cuales se obtuvieron siguiendo los mismos pasos experimentales que los descritos anteriormente para la β-Lg purificada. Se observó una pequeña diferencia entre las rectas obtenidas para la β-Lg purificada, la leche y el lactosuero ácido que se puede deber al hecho de que la concentración de β-Lg en las matrices alimentarias se ha calculado teóricamente a partir de una concentración estimada de 2000 μg/mL (Wal, 1998). La concentración de β-Lg en leche y lactosuero no fue la misma. En el proceso de obtención de lactosuero por reducción del pH de la leche con un ácido fuerte (HCl 4M) se produjeron pérdidas de otros nutrientes presentes en la leche por precipitación, como las caseínas, aumentando así la concentración de las proteínas séricas en el producto final. Por ello, si nos dirigimos al gráfico de la **Figura 19**, para una misma absorbancia la concentración de β-Lg en leche es inferior que en lactosuero. Como puede observarse en la **Figura 19**, la detección de β-Lg no se ve afectada por la presencia de otras proteínas o componentes alimentarios ya que se mantiene la linealidad ($r^2 > 0,95$ en ambos casos) y la relación entre la concentración de β-Lg detectable y la absorbancia guarda la misma proporcionalidad para la leche desnatada y para el lactosuero ácido que para la proteína purificada.

El reconocimiento de los alérgenos por técnicas inmunoenzimáticas no sólo puede verse afectado por la composición de la matriz, sino también por cambios estructurales en la proteína debido a los procesos tecnológicos a los que los alimentos son sometidos en la industria alimentaria (Mills *et al.*, 2009). Una de las aplicaciones más comunes en la industria láctea es la aplicación de calor para la reducción del riesgo microbiológico y aumentar la vida útil de los productos derivados de la leche. Este procesado térmico puede alterar el poder

alergénico de la β -Lg como se ha demostrado mediante ensayos clínicos (Ehn *et al.*, 2004; Roth-Walter *et al.*, 2008). Por tanto, siguiendo con el desarrollo de un método que pueda poner en evidencia estas modificaciones, queda verificar que la técnica ciELISA con IgEr aquí desarrollada resulta válida para la detección de los cambios en las interacciones alérgeno-anticuerpo resultantes de un tratamiento térmico.

4.2.2. Validación de ELISA Competitivo Indirecto para Muestras Procesadas

Al igual que muchas otras proteínas séricas, la β -Lg es sensible al calor a partir de temperaturas superiores a 60°C. Durante el calentamiento ocurren alteraciones de la conformación de la β -Lg a nivel inter- e intramolecular que llevan a agregaciones proteicas y desnaturalización (alteraciones de la estructura secundaria y terciaria) de la proteína (Roefs y de Kruif, 1994; Rahaman *et al.*, 2015), pudiendo afectar a su alergenicidad. Se ha observado una disminución en el reconocimiento de la β -Lg por parte de las IgE a temperaturas de 75°C, con un efecto mayor según aumentaba la temperatura de procesado a 85°C y 95°C (Ehn *et al.*, 2004; Taheri-Kafrani *et al.*, 2009).

Para la IgEr empleada en este trabajo, específica de β -Lg, se conocía su reducción en la unión con β -Lg procesada térmicamente a 95°C (Jylhä *et al.*, 2009), pero no a temperaturas inferiores, cuando la proteína comienza a desnaturalizarse, ni a temperaturas superiores. Por tanto, para una mejor comprensión de las modificaciones en las interacciones antígeno-anticuerpo que ocurren durante el procesado térmico, y de cómo afecta al reconocimiento del alérgeno con el método ciELISA aquí desarrollado, se llevaron a cabo tratamientos térmicos (20 minutos de exposición a la temperatura de tratamiento) a diferentes temperaturas entre 75°C y 105°C, con distintas muestras de β -Lg que diferían en pH y composición. Los resultados obtenidos se representan en la **Figura 20** como porcentaje de inhibición en la unión de β -Lg con IgEr respecto a la muestra sin tratar (0% de inhibición).

Primeramente, para la β -Lg purificada en medio tamponado ácido, pH 4,6, (**Figura 20.a**), la aplicación de un tratamiento térmico a 75°C aumentó la inhibición hasta un valor cercano al 10% (de: 8,49). La inhibición de la unión antígeno-anticuerpo aumentó linealmente con la temperatura ($r^2 = 0,9868$) entre 75°C y 105°C, observándose un incremento entorno al 20% de la inhibición de la unión entre la β -Lg a pH 4,6 y la IgEr, al subir la temperatura cada 10°C.

En el caso de la β -Lg purificada a pH 6,8 en tampón fosfato (**Figura 20.b**) se observó que el procesado térmico menos intenso aplicado, es decir un tratamiento a 75°C durante 20 minutos, produjo un valor relativo de inhibición IgEr negativo (-4,92%, de: 4,39) debido a un mejor reconocimiento de la β -Lg por parte de las IgEr, que significaría un ligero aumento de la antigenicidad de la β -Lg. La modificación estructural provocada por el proceso pudo haber expuesto algunos epítomos ocultos en el interior de la proteína en su estado nativo, facilitando así su reconocimiento por parte de las IgEr. Para temperaturas superiores se pudo observar

sin embargo, como en el caso anterior, que la inhibición de la unión entre la β -Lg a pH 6,8 y la IgEr aumentó linealmente ($r^2 = 0,9977$) con la temperatura de procesado, siendo la reducción de la antigenicidad de aproximadamente el 17% por cada 10°C de incremento en la temperatura de tratamiento. La inhibición aumentó desde un valor relativo de inhibición IgEr de -4,92% (de: 4,39) (aumento del reconocimiento del antígeno respecto a la muestra sin tratar térmicamente) a 75°C, hasta un 58,05% (de: 13,34) a 105°C.

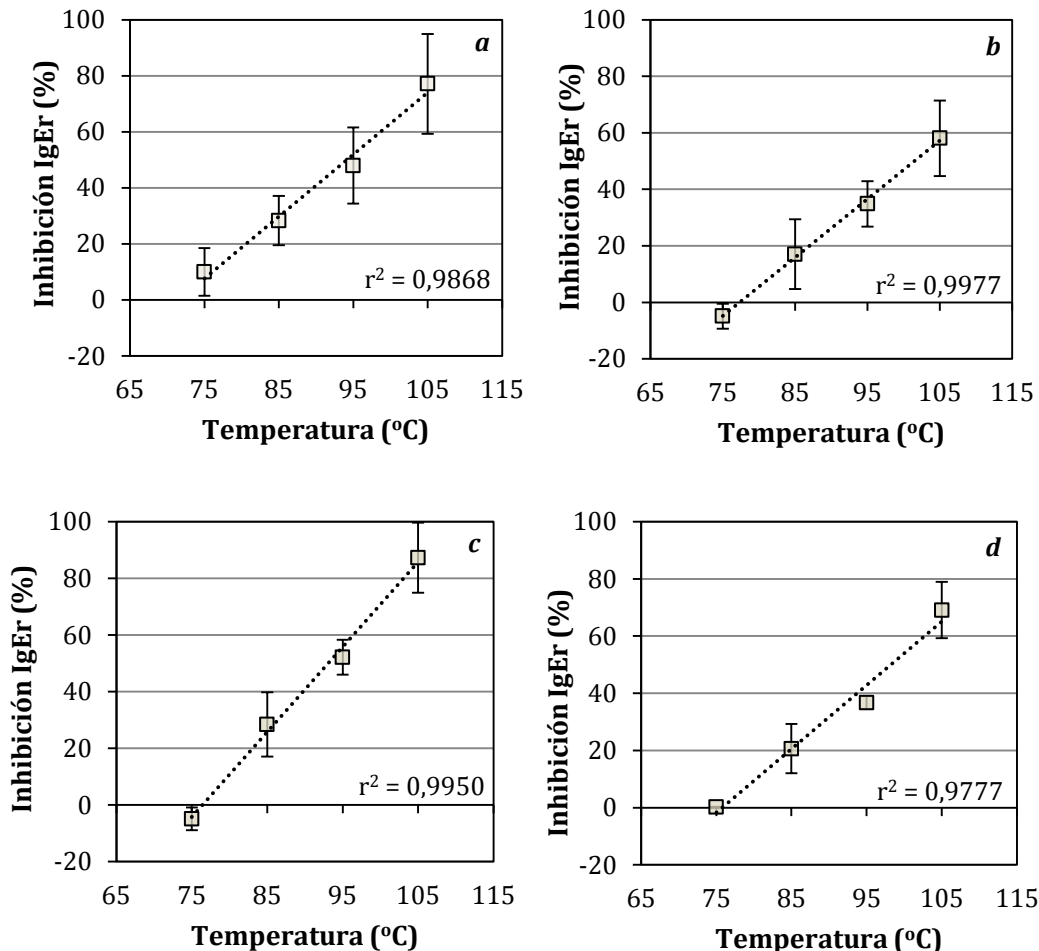


Figura 20. Inhibición del reconocimiento (%) de β -Lg por las IgEr al de 20 minutos de procesado térmico a 75°C, 85°C, 95°C y 105°C para diluciones de 2000 μ g/mL de β -Lg en tampón acetato pH 4,6 (a), tampón fosfato pH 6,8 (b), lactoseruo ácido pH 4,6 (c), y leche desnatada pH 6,6 (d) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

En el caso de lactoseruo obtenido por acidificación de la leche hasta un pH 4,6 (Figura 20.c), el procesado térmico a 75°C provocó un ligero aumento de la antigenicidad de la proteína como en el caso anterior (Figura 20.b), según queda reflejado por un valor relativo de inhibición IgEr de -4,90% (de: 4,03). Para temperaturas de tratamiento superiores se

observó, al igual que en los casos anteriores, un aumento de la inhibición de forma progresiva y lineal ($r^2 = 0,9950$) con el incremento de la temperatura. A 105°C se alcanzó una inhibición antígeno-anticuerpo del 87,30% (de: 12,36) por un aumento en la inhibición del 27% cada 10°C.

Finalmente, cuando se procesó térmicamente la leche desnatada (pH 6,6) (**Figura 20.d**), el reconocimiento por parte de las IgEr a 75°C no se vio modificado. Sin embargo, como en el resto de muestras, para temperaturas superiores de tratamiento la inhibición de la unión de la β -Lg con las IgEr aumentó con la temperatura de procesado, en este caso hasta el 69,09% (de: 9,82) a 105°C. Para la leche desnatada se puede considerar un aumento de la inhibición del 23% cada 10°C de aumento de temperatura ($r^2 = 0,9777$).

En resumen, de forma general para las muestras procesadas térmicamente, el incremento de temperatura por encima de 75°C (hasta 105°C) aumentó progresivamente la inhibición en la unión antígeno-anticuerpo, tanto en las soluciones de β -Lg purificada como en las matrices alimentarias. Sin embargo, a temperaturas más cercanas a la temperatura de desnaturalización (*de Wit, 1981*), el impacto en la inmunoreactividad no fue tan notable y, en algunos casos, la inhibición no aumentó e incluso se vio disminuida (aumento de la antigenicidad). En este sentido, *Kleber et al., (2004)* también observaron un aumento en la antigenicidad de la β -Lg a pH 7,5 (no tamponado) por ciELISA utilizando anticuerpos IgY policlonales de yema de huevo, tras ser expuesta a un tratamiento térmico de 75°C. La reducción en la unión antígeno-anticuerpo observada en esta tesis para temperaturas superiores a 75°C concuerda con estudios previos, en los que se emplearon IgE de suero de pacientes alérgicos, donde vieron que la inmunoreactividad de la β -Lg fue reducida tras tratamientos térmicos entre 80°C y 100°C (*Ehn et al., 2004; Morisawa et al., 2009; Taheri-Kafrani et al., 2009*). Según *Taheri-Kafrani et al. (2009)*, la reorganización de la proteína provocada por el efecto del tratamiento térmico enmascararía bien epítomos lineales o bien conformacionales presentes en el alérgeno, reduciendo así la unión con las IgE. El incremento en la inhibición de la unión entre la β -Lg y la IgEr observada a 105°C con respecto a 95°C va en el mismo sentido que el trabajo publicado por *Bu et al. (2009b)*, en el cual revelaron un descenso de la antigenicidad de la β -Lg purificada frente a anticuerpos de conejo para temperaturas de tratamiento en el rango de 90°C a 120°C (20 minutos de procesado a dichas temperaturas).

En lo que se refiere a los resultados obtenidos para las diferentes matrices empleadas en esta tesis, no se han observado diferencias significativas entre las muestras por lo que parece que no habría una influencia de la matriz (composición y pH) a la hora de estimar la inmunoreactividad de la β -Lg tras un tratamiento térmico en los rangos de temperatura testeados. Estos resultados, que resaltan a su vez la capacidad de la metodología desarrollada para detectar la inmunoreactividad de la β -Lg independientemente de la complejidad de la matriz láctea ensayada, no ponen por tanto en evidencia una posible interacción entre

moléculas que haga que la inmunoreactividad de la β -Lg se vea afectada, contrariamente a estudios previos (Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2008) en los que observaron una reducción de la alergenicidad de la β -Lg por *skin prick test* (SPT) para productos lácteos intensamente calentados (177°C/30 min y 260°/3 min), sugiriendo que en estos productos la β -Lg forma enlaces disulfuro (S-S) con otras proteínas de la matriz alimentaria resultando en una reducción de epítomos disponibles y, por tanto, de la alergenicidad (Thomas *et al.*, 2007).

A la vista de los resultados, se puede confirmar que la metodología ciELISA desarrollada en este trabajo permite conocer, mediante análisis *in-vitro*, los cambios en la inmunoreactividad de la β -Lg debido al procesado, en este caso tratamientos térmicos, así como identificar el potencial alergénico asociado a esta proteína de diferentes matrices lácteas que pueden diferir en cuanto al pH, composición e intensidad de tratamiento (calentamiento) al que han sido sometidas.

4.3. Conclusión

En este capítulo se ha descrito un método inmunoenzimático desarrollado para analizar la antigenicidad de la β -Lactoglobulina (β -Lg). Puesto que como anticuerpo se ha empleado una inmunoglobulina E recombinante (IgEr), el uso de este método podría ayudar a establecer y predecir de forma preliminar el potencial alergénico asociado a la β -Lg de matrices lácteas de diferente composición, hayan sido procesadas o no. Este método sería más simple y rápido que el empleo de sueros humanos los cuales se caracterizan por ser muy variables, no estandarizados y difíciles de obtener.

La técnica desarrollada ha demostrado reconocer los cambios provocados en la β -Lg debido al procesado térmico. La aplicación de calor modificó la inmunoreactividad de la β -Lg de forma que a medida que aumentaba la temperatura de procesado, desde 75°C hasta 105°C, la unión con las IgEr fue menor para todas las muestras, independientemente del pH o de la composición de la matriz o medio líquido. Además, estos factores (pH y composición de la matriz) no dieron lugar a diferencias en el reconocimiento de la proteína sometida a distintas intensidades de procesado térmico, indicando así la especificidad tanto de la IgEr seleccionada como del método desarrollado.

En este estudio, la elección de trabajar con matrices lácteas líquidas y no otras matrices lácteas sólidas o productos alimenticios que contuvieran esta proteína entre sus ingredientes, se debió a que el objetivo era conocer la posibilidad de desarrollar un método de análisis de detección de β -Lg que, aunque pudiese ser validado en el futuro para dichas matrices, pudiese poner en evidencia un cambio del potencial alergénico de la proteína al ser procesada, de tal forma que se pudiese pre-evaluar la adecuación (en cuanto al efecto sobre el potencial alergénico de la matriz) de diferentes tratamientos tecnológicos para procesar productos lácteos o para producir matrices lácteas (más o menos complejas) con potencial alergénico reducido.

A la vista de los resultados, el método desarrollado en este trabajo podría ser por tanto empleado como un *screening* preliminar para investigaciones orientadas por ejemplo a identificar modificaciones producidas en la β -Lg cuando la proteína es sometida a tratamientos tecnológicos (tecnologías térmicas u otras tecnologías de procesado), es decir, pruebas experimentales previas a trabajar con sueros de individuos alérgicos a las proteínas de la leche de vaca y en concreto a la β -Lg si estuvieran clínicamente diferenciados.



5. Impacto de los Pulsos de Luz sobre la Inmunoreactividad de la β -Lg

5.1. Introducción y Objetivo

Del capítulo anterior se deduce que el procesado térmico de los alimentos puede modificar la antigenicidad de la β -Lg y que esta alteración es medible en ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) competitivo mediante el empleo de inmunoglobulinas (Ig) E recombinantes específicas para el alérgeno.

Sin embargo, los tratamientos térmicos, que son ampliamente utilizados en el sector alimentario para garantizar la calidad y seguridad microbiológica de los productos en los diferentes lineales (principalmente refrigeración y temperatura ambiente), pueden provocar según su intensidad modificaciones no deseadas en la matriz alimentaria, alteraciones que pueden tener un impacto negativo en la calidad organoléptica, en las propiedades nutricionales y en otras propiedades físico-químicas de dichas matrices. Por ello, se han realizado grandes esfuerzos durante las dos últimas décadas para desarrollar otras tecnologías para la elaboración de alimentos seguros y con cualidades nutricionales y organolépticas satisfactorias (Barbosa-Cánovas, 1999; Rawson *et al.*, 2011; Stoica *et al.*, 2013).

Entre estas tecnologías emergentes, la luz pulsada o tecnología de pulsos de luz aparece como una alternativa prometedora en los procesos de inactivación microbiana (Rowan *et al.*, 1999; Artíguez *et al.*, 2011; Lasagabaster *et al.*, 2011; Artíguez y Martínez de Marañón, 2015), de degradación de pesticidas (Baranda *et al.*, 2014), e incluso de mejora de la funcionalidad de biomoléculas alimentarias (Davies y Truscott, 2001; Wondraczek *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2012). Esta última propiedad se debe a que diversas moléculas de un alimento son foto-reactivas y presentan cromóforos dentro de la molécula (por ejemplo, residuos de triptófano o fenilalanina) que dan lugar por ejemplo a reacciones de oxidación ante la aplicación de haces de luz. A este respecto, las proteínas son uno de los blancos más importantes para las fotorreacciones y tienen la habilidad adicional de unir cromóforos exógenos y reaccionar rápidamente con otras especies en estado excitado. La absorción de luz desencadena así la oxidación de cadenas laterales, fragmentación del segmento principal, y/o formación de reacciones cruzadas y agregados (Davies y Truscott, 2001; Pattison *et al.*, 2012).

En el caso específico de proteínas lácteas y en función de la intensidad aplicada, los pulsos de luz pueden originar cambios en la estructura de la proteína, induciendo una pérdida de la estructura cuaternaria y terciaria (Fernández *et al.*, 2012; Siddique *et al.*, 2016), que darían lugar a agregados por enlaces disulfuro (Elmnasser *et al.*, 2008) y modificar la funcionalidad de las proteínas, tanto en las propiedades estructurales y mecánicas de las caseínas (Wihodo y Moraru, 2015) como las proteínas séricas, mejorando su solubilidad y capacidad espumante (Fernández *et al.*, 2012; Arboleya *et al.*, 2013; Siddique *et al.*, 2016). Dentro de este último grupo de proteínas, la β -Lactoglobulina (β -Lg), proteína del lactosuero de la leche de mamíferos que no está en la leche humana, tiene gran interés por su potencial uso en la industria alimentaria ante su habilidad en la formación de geles, agregados proteicos, propiedades espumantes y emulsificantes (Renard *et al.*, 1998; Bromley *et al.*, 2006;

Monaci *et al.*, 2006; Zhai *et al.*, 2011). Por ello, el estudio del impacto de la tecnología de pulsos de luz sobre la funcionalidad de la β -Lg ha adquirido gran importancia en los últimos años (Fernández *et al.*, 2012; Arboleya *et al.*, 2013; del Castillo-Santaella *et al.*, 2014).

Basándose en las evidencias descritas, los pulsos de luz podrían ser eficientemente explotados para modificar la estructura de las proteínas alergénicas con el fin de alterar su inmunoreactividad y tratar de reducir su potencial alergénico. En este sentido, el potencial alergénico de la soja, evaluado a través de ELISA indirecto mediado por IgE, se redujo al aplicar tratamientos de pulsos de luz con fluencias desde 117,6 hasta 352,8 J/cm² (Yang *et al.*, 2010). Utilizando la misma metodología con mezclas de sueros de pacientes alérgicos, la reducción de la inmunoreactividad provocada por tratamientos de pulsos de luz se observó igualmente, en gambas expuestas a fluencias desde 194,4 J/cm² hasta 291,6 J/cm² (Shriver, 2011), en almendra tras tratamientos entre 27,6 J/cm² y 386,4 J/cm² (Li *et al.*, 2013) en extractos de trigo al someterlos a intensidades desde 1,9 J/cm² hasta 456,2 J/cm² (Nooji, 2011) y en extracto de cacahuete así como en mantequilla de cacahuete al procesarlos a 220,8 J/cm² (Chung *et al.*, 2008). Sin embargo, a excepción de este último trabajo dónde se empleó un ventilador para disipar el aumento de temperatura en las muestras, todos los trabajos citados anteriormente señalaron que parte de la pérdida de la inmunoreactividad fue debido al aumento de temperatura en las muestras inducido por la aplicación de pulsos de luz. Además, la mayoría de estos tratamientos fueron muy intensos superando el límite máximo de 12 J/cm² de fluencia total establecido por la FDA para el procesado de alimentos. En la bibliografía no se encuentran estudios para bajas fluencias usando IgE, los únicos en el rango de FDA son mediados por otros anticuerpos (Manzocco *et al.*, 2013; Panozzo *et al.*, 2016).

A pesar de la existencia de referencias que demuestran el efecto de los pulsos de luz en la reducción de la inmunoreactividad de numerosas proteínas de origen alimentario no hay datos acerca del impacto de los pulsos sobre la alergenicidad de la β -Lg, a pesar de que estudios previos han demostrado mejorar la digestibilidad de la misma (del Castillo-Santaella *et al.*, 2014). Por tanto, el objetivo del presente estudio fue investigar la viabilidad de los pulsos de luz como tecnología para provocar una modificación en la inmunoreactividad de la β -Lg. Las muestras sometidas a estudio fueron β -Lg comercial purificada diluida en distintos medios tamponados, lactosuero obtenido por acidificación de leche bovina, y lactosuero industrial sobrenadante de la producción quesera. De esta forma se quiso evaluar si el impacto de la tecnología de pulsos de luz sobre la β -Lg es dependiente de la matriz en la que se encuentre la proteína. En el caso que no hubiese efecto de la matriz, como en el caso del capítulo anterior con el tratamiento térmico, se podría considerar la aplicación de pulsos de luz directamente sobre el lactosuero con el fin de descontaminar dicha matriz (alta carga microbiológica) a la vez de producir una modificación en la alergenicidad, lo cual sería de alto interés para la elaboración de productos a partir de lactosuero, matriz que se caracteriza por su bajo precio, versatilidad funcional y alto valor nutritivo (Kim *et al.*, 1981). No obstante, el impacto de los pulsos puede verse a su vez limitada por la restricción de penetración de la luz

a través del lactosuero como ha sido descrito anteriormente (Artíguez *et al.*, 2012). Para acabar, las condiciones aplicadas en la mayoría de los trabajos de inmunoreactividad citados anteriormente conllevan un efecto térmico debido a la alta intensidad de los tratamientos de luz pulsada, por lo que en este trabajo se fijarán condiciones de tratamiento menos severas afín de ver la verdadera potencialidad de la tecnología para reducir el potencial alergénico de la β -Lg e identificar de este modo si se pueden engendrar modificaciones en la inmunoreactividad de la proteína solo por efecto fotoquímico.

5.2. Resultados y Discusión

Para el desarrollo experimental de este estudio se emplearon muestras de β -Lactoglobulina (β -Lg) diluidas en tampón acetato a pH 4,6 (pH del suero ácido); en tampón fosfato a pH 6,8 (pH de la leche); en tampón PBS a pH 7,4 (el tampón típicamente empleado en ensayos ELISA); en agua destilada a pH 7,3 (para estudiar la inmunoafinidad en ausencia de sales); lactosuero obtenido por acidificación de leche bovina (pH 4,6); y lactosuero industrial de quesería (pH 6,4). La preparación de las diluciones de β -Lg se detalla en el **apartado 3.2.2.1** y los lactosueros se obtuvieron siguiendo los procedimientos descritos en los **apartados 3.2.2.3 y 3.2.2.4**, respectivamente. Todas estas muestras fueron tratadas mediante tratamientos de pulsos de luz, exponiéndolas a diferentes fluencias en el rango 2,8-15,95 J/cm², según lo especificado en el **apartado 3.2.3.2**.

5.2.1. Caracterización por Electroforesis

La β -Lg purificada se diluyó en una dilución de tampón acetato pH 4,6 y en otra de tampón fosfato pH 6,8 (2000 μ g/mL) previamente a tratar dichas muestras por pulsos de luz a una fluencia de 8,25 J/cm² y 15,95 J/cm². Con el fin de estudiar el impacto de la tecnología de pulsos de luz en la β -Lg e identificar posibles cambios estructurales en esta proteína, se llevó a cabo una electroforesis nativa. El gel de electroforesis resultante se muestra en la **Figura 21**.

Los carriles control o de proteína no procesada, **L1** y **L2** (β -Lg purificada a pH 4,6 y 6,8, respectivamente), exhibieron una banda correspondiente al monómero de β -Lg (peso molecular estimado de 18,4 kDa). Para las muestras procesadas, es decir del carril **L3** hasta el **L6**, aparecieron en todas ellas unas nuevas bandas difusas sobre las correspondientes a las de β -Lg, independientemente del pH del medio y de la intensidad de tratamiento. Es decir, al comparar los tratamientos de diferente fluencia (8,25 y 15,95 J/cm²), se pudo observar que no existieron diferencias entre éstos tanto para las muestras de β -Lg a pH 4,6 (**L4** y **L6**) como a pH 6,8 (**L5** y **L7**). Un gel similar se obtuvo para las muestras de β -Lg en PBS a pH 7,4 y en agua destilada a pH 7,3, que indicaría por tanto que en estas condiciones los pulsos de luz también provocan la modificación de la proteína (datos no mostrados).

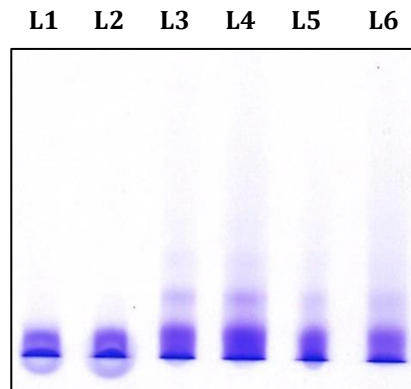


Figura 21. Electroforesis nativa en gel 8-25% del efecto del tratamiento de pulsos de luz a fluencia total 0 J/cm² -controles- (L1 y L2), 8,25 J/cm² (L3 y L4), y 15,95 J/cm² (L5 y L6) en β -Lactoglobulina purificada (2000 μ g/mL), para muestras en tampón acetato a pH 4,6 (L1, L3 y L5), y en tampón fosfato a pH 6,8 (L2, L4 y L6)

La aparición de nuevas bandas sugiere que la aplicación de pulsos de luz pueda favorecer la unión de moléculas de β -Lg dando lugar a la generación de agregados, como se ha demostrado en estudios previos con otras proteínas alimentarias. Cuando las proteínas de la clara de huevo fueron expuestas a distintas intensidades (desde 1,75 J/cm² hasta 31,5 J/cm²) de pulsos de luz, se observó un aumento de los grupos sulfhidrilo (SH) debido a un desplegamiento parcial de las proteínas favoreciendo así la formación de agregados proteicos (Manzocco *et al.*, 2013). Más recientemente, Siddique *et al.* (2016) pusieron en evidencia un desplegamiento parcial de la estructura de las proteínas, presentes en un aislado de proteína sérica (43-48 % del contenido proteico correspondía a β -Lg), inducido por el tratamiento de pulsos de luz, favoreciendo la formación de agregados. Esto refleja la posibilidad de que los pulsos de luz sean capaces de modificar la estructura de la β -Lg con pérdida de parte de las estructuras secundarias y terciarias, y desnaturalizando parcialmente la proteína (Fernández *et al.*, 2012).

Una vez observado que puede haber cambios estructurales en la proteína, éstos podrían tener un efecto sobre la inmunogenicidad de la misma. Por este motivo, los experimentos que se describen a continuación fueron dirigidos a estudiar el impacto de los pulsos de luz en la inmunoreactividad y la digestibilidad de la proteína.

5.2.2. Ensayos Inmunoenzimáticos

5.2.2.1. Detección de β -Lactoglobulina (reactividad IgG)

La detección de alérgenos por métodos tradicionales como es el empleo de kits comerciales, responde a la unión de los anticuerpos, típicamente IgG, con los epítomos de las proteínas. Estas zonas de unión pueden verse alteradas durante el procesado de los alimentos dando lugar a un aumento, disminución o manteniéndose la misma capacidad de unión entre el antígeno y el anticuerpo (Rahaman *et al.*, 2016). Dada la alteración estructural de la β -Lg, observada en el apartado anterior, tras ser expuesta a diferentes fluencias de luz pulsada, resultó interesante conocer si las modificaciones provocadas en la estructura de la proteína también afectan a su detección. Para ello, se aplicaron tratamientos de pulsos de luz con una fluencia total que iba desde 8,25 J/cm² hasta 15,95 J/cm² (la fluencia por pulso fue la misma para todos los tratamientos) sobre muestras de β -Lg purificada diluida en tampón acetato a pH 4,6, tampón fosfato a pH 6,8, agua destilada a pH 7,3 y en PBS a pH 7,4, todas ellas a una concentración de 500 μ g/mL, y se analizó su impacto en la inmunoreactividad de la proteína mediante un kit comercial de detección de alérgenos alimentarios por sándwich ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El resultado se muestra en la **Figura 22** como porcentaje de detección de las muestras procesadas respecto a su control, es decir, la muestra sin procesar en el mismo medio de dilución, correspondiente al 100% de detección.

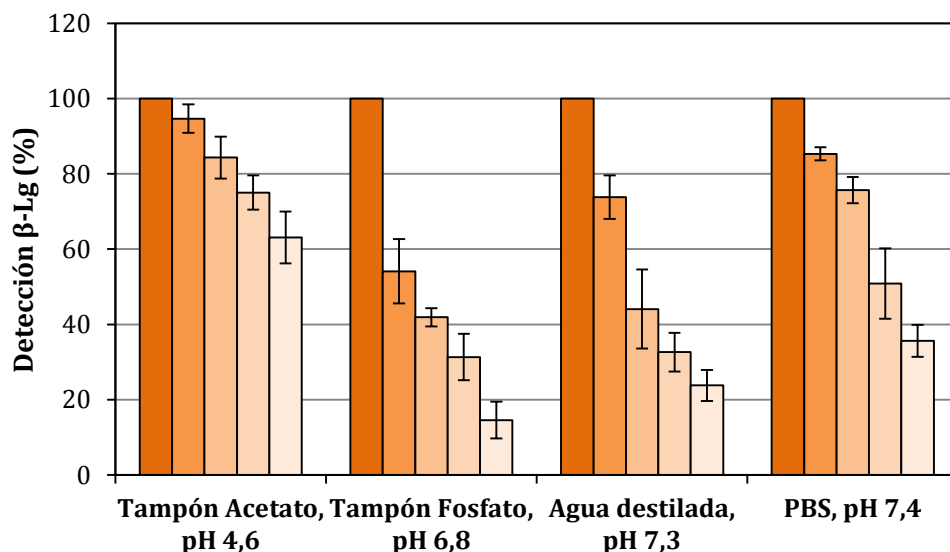


Figura 22. Detección en Sandwich ELISA de β -Lactoglobulina tratada por pulsos de luz. Control 0 J/cm² (■), 3,85 J/cm² (■), 8,25 J/cm² (■), 12,10 J/cm² (■), 15,95 J/cm² (■). La fluencia total es el resultado de aplicar varios pulsos de luz con una fluencia por pulso de 0,55 J/cm² – Las barras de error corresponden a la desviación estándar

Como se muestra en el gráfico, en todos los casos la afinidad con las IgG se vio reducida progresivamente cuanto mayor era la fluencia aplicada. Independientemente de la intensidad del tratamiento de luz pulsada, el menor efecto en la reducción de la detección se dio en el tampón acetato (pH 4,6), ofreciendo la mayor resistencia a los pulsos de luz de entre los medios estudiados. A este pH de 4,6, no se observó apenas una reducción en la detección cuando la muestra fue tratada a 3,85 J/cm², mientras que cuando se aplicó la máxima intensidad estudiada (15,95 J/cm²) se disminuyó la detección hasta un valor de 63,1% -con una desviación estándar (de) del 6,9- respecto a la muestra sin tratar. Por el contrario, el mayor efecto de la luz pulsada en la reducción de la detección de la β -Lg mediada por IgG se dio en el tampón fosfato (pH 6,8) con un descenso de hasta el 54,1% (de: 8,5) tras el tratamiento de menor intensidad estudiado, 3,85 J/cm², alcanzando el 14,6% (de: 4,9) de detección de β -Lg al ser expuesta a 15,95 J/cm². Para un pH similar, la reducción de la detección de la β -Lg provocada por la luz pulsada fue mayor en el caso del agua destilada (pH 7,3) que cuando la proteína fue diluida en PBS (pH 7,4). Esta diferencia entre medios de dilución sobre el efecto de la luz pulsada en la detección de la β -Lg se observó para todas las fluencias aplicadas (3,85-15,95 J/cm²), siendo sin embargo mayor la diferencia para 8,25 J/cm².

Las diferencias en la detección obtenidas en función del medio dilución pueden deberse a la capacidad que tiene esta proteína de formar configuraciones estructurales diferentes en función del pH del medio en el que se encuentre, así como de la presencia de sales en el medio. A pHs inferiores a 3,5 o superiores a 7,5 la β -Lg permanece en forma monomérica; a pHs entre 7,5 y 5,2 forma dímeros; y entre 5,2 y 3,5 forma oligómeros largos (Gottschalk *et al.*, 2003) presentándose en equilibrio entre sus formas dimérica, tetramérica u octamérica (Kumosinski y Timasheff, 1966; McKenzie y Sawyer, 1967; Sakurai *et al.*, 2001). De acuerdo con esto y centrándonos primeramente en los tampones acetato (pH 4,6) y fosfato (pH 6,8), la β -Lg parece ser más susceptible a los pulsos de luz a pH 6,8, donde se encontraría en estado dimérico estabilizado por puentes hidrógeno (Sakurai *et al.*, 2001), que a pH 4,6 donde la proteína forma otras estructuras más complejas además de dímeros (Gottschalk *et al.*, 2003). Aunque aún se desconoce detalladamente la estructura octamérica de la β -Lg, ésta parece ser muy compacta (Gottschalk *et al.*, 2003; Mercadante *et al.*, 2012) y podría estar probablemente implicada en la mayor resistencia al impacto de los pulsos de luz observada a pH 4,6. Por otro lado, a pH neutro la especie dimérica de la β -Lg es predominante en el medio a concentraciones de proteína superiores a 1000 μ g/mL, pero la presencia de monómeros aumenta en el medio cuando las concentraciones de proteína son menores (Sakurai *et al.*, 2001), como en el presente estudio (500 μ g/mL). Además, se ha observado una estructura desordenada de la proteína a valores de pH 7,5 (Sakai *et al.*, 2000), lo que podría explicar esa diferencia de resultados en el nivel de detección de la β -Lg procesada por luz pulsada en tampón fosfato (pH 6,8) frente a cuando se encuentra en PBS (pH 7,4). Por otro lado, la mayor susceptibilidad a los pulsos de luz de la β -Lg en agua frente al PBS, cuyos pHs son muy

cercanos, se podría deber al contenido en sales ya que el estado dimérico de la proteína se estabiliza con la adición de sales, mientras la ausencia de las mismas favorece el estado monomérico (Sakurai *et al.*, 2001).

A la vista de estos resultados, la tecnología de pulsos de luz provocaría alteraciones estructurales en la β -Lg, dependientes del pH y por tanto del estado estructural previo en el que se encuentra la proteína, que influirían en la capacidad de reconocimiento de la proteína por parte de los anticuerpos, afectando así a su detección por las técnicas inmunoenzimáticas tipo ELISA comúnmente empleadas en la industria alimentaria. Estas técnicas de detección mediada por IgG hacen referencia a la capacidad de detección de la proteína, sin embargo no es un reflejo del potencial alergénico de ésta. Por tanto, a continuación se pasó a estudiar si la capacidad de reconocimiento por parte de las IgE, anticuerpos implicados en el desencadenamiento de reacciones alérgicas, también se ve afectada por la aplicación de pulsos de luz, empleando la técnica analítica desarrollada en el capítulo anterior con inmunoglobulinas tipo E recombinantes (IgEr).

5.2.2.2. Afinidad de las IgE recombinantes con β -Lactoglobulina comercial purificada procesada por Pulsos de Luz

Para determinar el impacto de los pulsos de luz sobre la inmunoreactividad de la β -Lg, se llevó a cabo un ELISA competitivo con IgEr. La **Figura 23** muestra los resultados obtenidos cuando la β -Lg 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ purificada y diluida en distintos medios y de apariencia translúcida es expuesta a diferentes intensidades de tratamiento mediante pulsos de luz. En este ensayo se emplearon diluciones de proteína de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para una mayor sensibilidad en la metodología de análisis. Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la unión IgEr con proteína tratada respecto a la unión que ocurre entre la IgEr y la proteína sin tratar (control: 0 J/cm^2).

Como se observa en la **Figura 23**, la afinidad de las IgEr por la β -Lg se vio reducida por el efecto de los pulsos de luz. De forma general, para todas las muestras estudiadas, la inhibición de la unión de las IgEr con la β -Lg fue bifásica. En una primera fase, el porcentaje de inhibición incrementó con la fluencia, alcanzando el mismo grado de inhibición a 3,85 J/cm^2 independientemente del medio utilizado para la dilución de la proteína. A excepción de la proteína en tampón fosfato, pH 6,8, donde sigue aumentando el grado de inhibición hasta una fluencia de 8,25 J/cm^2 , para fluencias superiores a 3,85 J/cm^2 no se produjo un incremento de la inhibición antígeno-anticuerpo en las otras muestras. Esta asíntota también se pudo observar para la proteína en tampón fosfato (pH 6,8) a partir de 8,25 J/cm^2 , manteniéndose constante el nivel de inhibición de la unión IgEr con la β -Lg para fluencias hasta 15,95 J/cm^2 . Estas asíntotas, no observadas en la **Figura 22** utilizando un sistema de detección mediado por IgG, pudieron deberse al empleo de una mayor concentración de la β -Lg presente en las diluciones (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respecto a la concentración empleada en detección (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lo

que podría haber dado lugar al llamado “efecto sombra” que limita la penetración de la luz en las muestras por un mayor contenido de solutos (Artíguez *et al.*, 2015). También es posible que estas diferencias en el reconocimiento de la β -Lg se deban a diferencias en el efecto de los pulsos de luz sobre la estructura de la β -Lg en función de su concentración, como sugirieron Fernández *et al.* (2012). Este grupo reveló que el tratamiento de la β -Lg (pureza \approx 80%) bajo una fluencia de 4 J/cm² (similar a la mínima estudiada en este trabajo, 3,85 J/cm²) de luz pulsada, provocaba un mayor impacto en la estructura cuaternaria de la proteína y no tanto en la secundaria y la terciaria a 1500 μ g/mL de concentración, mientras que la modificación en las estructuras secundarias y terciarias fue notable para 100 μ g/mL de β -Lg, sugiriendo así

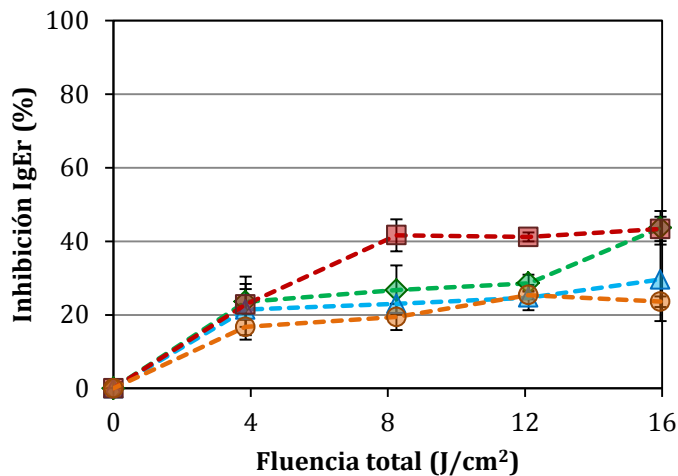


Figura 23. Porcentaje de inhibición en la unión de IgE recombinante con β -Lactoglobulina procesada por pulsos de luz en tampón acetato pH 4,6 (---▲---), en tampón fosfato pH 6,8 (---■---), en agua destilada pH 7,3 (---◆---) y en PBS pH 7,4 (---●---). La fluencia total es el resultado de aplicar varios pulsos de luz con una fluencia por pulso de 0,55 J/cm² - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

que concentraciones altas de la proteína podrían ofrecer un efecto protector en la desnaturalización parcial inducida por los pulsos de luz. A pesar de estas diferencias, se pudo observar que la luz pulsada afectó en mayor grado la unión de la IgEr con la β -Lg cuando ésta última estaba diluida en tampón fosfato (pH 6,8), confirmando modificaciones en la proteína más significativas bajo estas condiciones tal y como se pudo observar previamente en la unión con IgG. Para el tratamiento más intenso aplicado (15,95 J/cm²), se indujo el mismo nivel de inhibición de la unión de la β -Lg con la IgEr cuando la proteína fue diluida en agua destilada (pH 7,3) o en tampón fosfato (pH 6,8), confirmando los resultados obtenidos anteriormente para la unión de la β -Lg con las IgG que indicaban que la proteína en agua destilada (pH 7,3) era la segunda condición más propensa para que fuera modificada ésta mediante luz pulsada. Las variaciones en el grado de inhibición de la unión de las IgEr con la β -Lg entre las distintas muestras podrían ser por tanto el resultado del efecto que tienen los pulsos de luz en las

distintas estructuras moleculares que la β -Lg es capaz de formar en función del medio en el que se encuentre, como se ha indicado previamente para la unión de las IgG con la β -Lg. El pH del medio y el contenido de sales parecen ser factores importantes a considerar para entender el efecto de los pulsos de luz sobre la exposición de los epítomos de reconocimiento de la β -Lg.

De forma general, se podría indicar a partir de estos resultados que la unión antígeno-anticuerpo se vio afectada para las muestras de β -Lg expuestas a pulsos de luz, lo que podría ser debido a cambios en la estructura proteica provocados por esta tecnología, como se ha demostrado anteriormente para las mismas condiciones operatorias (Férrandez *et al.*, 2012), alterando así la disponibilidad de sus epítomos de reconocimiento por parte de las inmunoglobulinas. Los cambios en la inmunoreactividad de la β -Lg podrían deberse tanto a una reducción en el reconocimiento de los epítomos lineales en la formación de nuevas uniones intra- e intermoleculares, agregación, y/o reorganizaciones por enlaces disulfuro (S-S), como de los epítomos conformacionales presentes en el alérgeno (Besler *et al.*, 2001; Shriver y Yang, 2011; Bu, *et al.*, 2013).

Debido a una diferencia de concentración de proteína en los estudios llevados a cabo con IgG respecto a los realizados con IgE, no se puede concluir si la β -Lg es afectada por la luz pulsada en un grado diferente en las zonas de reconocimiento de las IgG o en las zonas de unión de las IgE. Aunque se contempló en un momento dado, replicar los ensayos utilizando la concentración proteica de los estudios realizados con IgG, y debido a que la disponibilidad de IgE era limitada, se decidió realizar únicamente las pruebas de inmunogenicidad a la concentración que se encuentra la β -Lg en su matriz alimentaria originaria, la leche (2000-3000 μ g/mL), con el fin de ver la idoneidad del procesado para producir matrices lácteas con potencial alergénico reducido. De este modo, además, se pudieron comparar los resultados de inmunogenicidad obtenidos con β -Lg purificada con los de una matriz láctea como el lactosuero.

En efecto, reconocido el potencial de alteración que poseen los pulsos de luz en la antigenicidad de la β -Lg purificada, se pasó a estudiar el impacto en matrices donde se puede encontrar esta proteína de forma natural, la leche y el lactosuero, con el fin de conocer el efecto en muestras alimentarias.

5.2.2.3. Afinidad las IgE recombinantes con β -Lactoglobulina en matrices alimentarias procesadas por pulsos de luz

Tras evaluar el efecto de los pulsos de luz en β -Lg purificada, se quiso evaluar si el comportamiento era similar para esta proteína cuando se encuentra en una matriz natural y que no ha sido previamente expuesta a un proceso de purificación. Debido a las condiciones de procesado del lactosuero en el que se empleó un tanque en agitación para una distribución homogénea de la muestra a lo largo de la aplicación de la luz pulsada, la distancia respecto a la lámpara superior fue mayor que para el tratamiento de la β -Lg purificada y por tanto la

fluencia final aplicada fue inferior.

Las matrices seleccionadas fueron leche y lactosuero. Se simuló un posible proceso industrial de la leche y el lactosuero y las muestras se liofilizaron, técnica de secado que tiene el menor impacto en la proteínas (Aalaei *et al.*, 2016), una vez expuestas a los pulsos de luz. De esta forma, se vería si este tipo de tratamientos podría a su vez afectar a la inmunogenicidad de estas matrices.

Al igual que para β -Lg purificada, para evaluar el impacto de los pulsos de luz en la unión entre las inmunoglobulinas y la β -Lg presente en los lactosueros, se llevó a cabo la técnica de análisis ciELISA con IgEr que fue validada en el capítulo anterior para β -Lg presente en la leche y lactosuero.

Se estudió tanto el impacto de los pulsos de luz en leche desnatada como en sueros lácteos; sin embargo, los datos para leche tratada con pulsos de luz no ofrecieron datos relevantes (datos no mostrados), probablemente porque la luz no penetró lo suficiente en la matriz como para actuar sobre la β -Lg y provocar cambios en su configuración y propiedades alergénicas. En este sentido, la eficacia de la aplicación de pulsos de luz para provocar una reducción de la carga microbiana en determinados productos alimenticios se ve también limitada por la restricción de la penetración de la luz, como ha sido demostrado para algunos productos alimenticios líquidos (Hsu y Moraru, 2011; Artíguez *et al.*, 2012), incluido el lactosuero (Artíguez y Martínez de Marañón, 2015). En otros trabajos con pulsos de luz dirigidos a estudiar cambios en la estructura conformacional de las proteínas lácteas tampoco se han visto diferencias significativas en las muestras de leche desnatada procesadas por esta tecnología (Elmnasser *et al.*, 2008). En dicho trabajo probablemente se encontraron con el mismo problema que el indicado en esta tesis ya que dichos autores no vieron modificaciones en la β -Lg de leche desnatada, contrariamente a lo que se observó por parte de Fernández *et al.* (2012) con β -Lg purificada al 80%. Según ha sido previamente sugerido por Gómez-López *et al.* (2005), el alto contenido en grasas y proteínas presentes en la leche podría absorber parte las longitudes de onda de la luz incidente reduciendo la efectividad del tratamiento por pulsos de luz. Por ello, en este trabajo los resultados obtenidos sobre el efecto de pulsos de luz en la β -Lg de la leche han sido descartados ya que no se puede saber con este trabajo si el “no efecto” observado (datos no mostrados) fue debido a la matriz o al hecho de que no llegó la suficiente luz a la proteína para ser modificada. Atendiendo a lo aquí expuesto, se descartó continuar trabajando con leche para la tecnología de pulsos de luz y el estudio se centró en los sueros lácteos que son menos opacos que la leche y que por tanto permitirían una mayor exposición de la β -Lg a los pulsos de luz.

El resultado se muestra en la **Figura 24**, expresándose como porcentaje de inhibición de la unión entre el anticuerpo y el antígeno del lactosuero expuesto a pulsos de luz respecto al del lactosuero sin procesar (control: 0 J/cm²). Según muestra el gráfico, en ambas matrices se apreció un aumento de la inhibición provocada por los pulsos de luz con una tendencia de

la curva similar. El porcentaje de inhibición de la unión entre la IgEr y la β -Lg aumentó significativamente al exponer los lactosueros a 2,8 J/cm², alcanzando valores del 33,5% (de: 3,5) y 25,7% (de: 11,7) para los lactosueros a pH 4,6 y a pH 6,4 respectivamente, para luego, a partir de esta fluencia, no incrementar la inhibición en la unión con las IgEr al aumentar la fluencia manteniéndose más o menos constante en estos valores hasta una fluencia de 11,6 J/cm² (intensidad máxima aplicada).

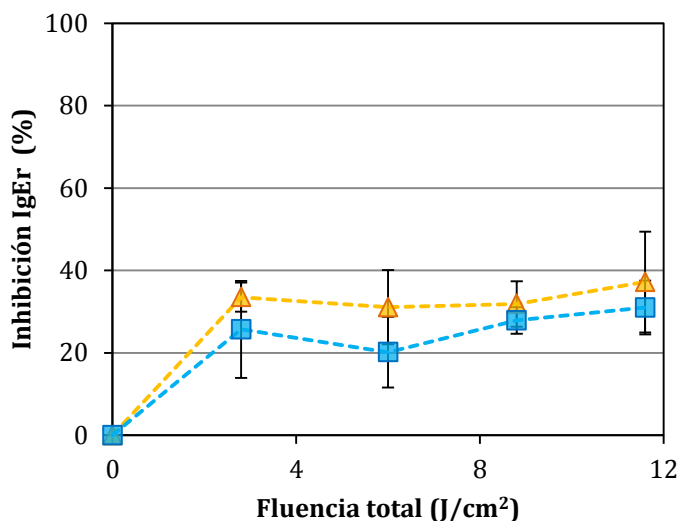


Figura 24. Porcentaje de inhibición en la unión de IgE recombinante con β -Lactoglobulina de lactosuero ácido a pH 4,6 (---▲---), y de lactosuero procedente de quesería a pH 6,4 (---■---), tratados con pulsos de luz. La fluencia total es el resultado de aplicar varios pulsos de luz con una fluencia por pulso de 0,4 J/cm² - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

El tipo de gráfica obtenida con los dos lactosueros fue similar a la observada con β -Lg purificada a pesar de que las intensidades de tratamiento fueron inferiores para el lactosuero, distinguiéndose en todos los casos un comportamiento bifásico. En una primera parte se dio un aumento significativo de la inhibición, y después se mantuvo para el resto de intensidades de fluencia más intensa. Esta curva bifásica podría ocurrir, como se ha comentado en el apartado anterior respecto a la investigación de [Fernández et al. \(2012\)](#) sobre el efecto en las propiedades de la β -Lg de los pulsos de luz a 4 J/cm², debido a la concentración de proteína en el lactosuero que mostraría un efecto protector ante cambios en la estructura secundaria y terciaria frente a la luz pulsada, de forma que los pulsos de luz alcanzarían a modificar principalmente la estructura cuaternaria de la β -Lg presente en el lactosuero a la menor fluencia aquí estudiada, 2,8 J/cm², a partir de la cual no se producirían mayores cambios. Estos resultados respaldarían por tanto la hipótesis de [Fernández et al. \(2012\)](#) sobre la influencia de la concentración de la β -Lg en el impacto de la luz pulsada sobre su inmunoreactividad, y la agitación continuada del lactosuero hasta intensidad de 11,6 J/cm² descartaría el “efecto

sombra”.

En resumen, la luz pulsada presenta una limitación a la hora de reducir la inmunoreactividad de las matrices lácteas con concentración de β -Lg similar a la presente en la leche. Esta limitación viene dada por un lado por el bajo poder de penetración de la luz a través de la matriz, impidiendo por ejemplo observar modificaciones en la leche. Para muestras más traslúcidas (disoluciones de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -Lg purificada), la luz pulsada produjo modificaciones en la unión de las IgE con la proteína, similares tanto en el lactosuero como en la β -Lg purificada diluida, poniéndose también en evidencia una limitación en cuanto a la reducción de la inmunogenicidad mediante esta tecnología relacionada con la concentración de proteína en las muestras, ya que incrementando la fluencia significativamente no se consiguió reducir la inmunoreactividad de la β -Lg. Más allá de la limitación indicada y de poner en evidencia que no parecen existir diferencias significativas en cuanto al efecto que producen los pulsos de luz sobre las matrices simples (β -Lg purificada) y matrices más complejas como el lactosuero, otra característica importante a considerar, común de los alérgenos alimentarios, es su resistencia a la proteólisis (Breiteneder y Mills, 2005). Puesto que los epítomos de la β -Lg son resistentes a la pepsina gástrica (del Castillo-Santaella *et al.*, 2014; Villas-Boas *et al.*, 2015), en el siguiente apartado se ha estudiado si la digestibilidad enzimática de la β -Lg con pepsina gástrica se modifica mediante la aplicación de luz pulsada, lo que indicaría, en el caso de incrementarla, que la tecnología de pulsos de luz podría ser considerada para reducir la inmunoreactividad de muestras lácteas.

5.2.3. Digestibilidad

5.2.3.1. Digestión *In-Vitro* con Pepsina

Los ensayos de digestibilidad gástrica simulada se llevan a cabo como un método de evaluación a la resistencia enzimática que caracteriza a los alérgenos alimentarios (Taylor y Lehrer, 1996; Moreno, 2007). La β -Lg nativa presenta resistencia ante determinadas proteasas, en particular a la pepsina gástrica, dada su peculiar estabilidad estructural a pH bajos (Miranda y Pelissier, 1983; Reddy *et al.*, 1988). Gran parte de los aminoácidos hidrofóbicos de la β -Lg, potenciales sitios de acción para la pepsina, se encuentran escondidos en el núcleo hidrofóbico por lo que no son fácilmente accesibles por el enzima. Algunos tratamientos como la aplicación de calor aumentan la susceptibilidad de la β -Lg a la hidrólisis con pepsina, facilitando así su digestibilidad (Peram *et al.*, 2013). Tras observar en los apartados anteriores cambios en la configuración de la β -Lg por tratamiento con pulsos de luz que afectan a la inmunoreactividad de la misma, se procedió a estudiar si también la resistencia a la pepsina de origen porcino (EC 3.4.23.1) se ve reducida cuando la β -Lg es procesada mediante pulsos de luz.

El protocolo de hidrólisis se detalla en el **apartado 3.2.5.2** y fue adaptado del proceso de evaluación de la alergenicidad según indica la FAO y WHO (2001) para organismos

genéticamente modificados (OGM). En el mismo se establece el análisis de resistencia a la hidrólisis de la pepsina, una endopeptidasa no específica capaz de hidrolizar un enlace peptídico situado en el extremo carboxílico (C-terminal) para liberar péptidos de una proteína o polipéptidos y que es más eficiente en la rotura peptídica de enlaces entre amino ácidos hidrofóbicos, preferiblemente amino ácidos aromáticos tales como fenilalanina, triptófano y tirosina, no actuando en los enlaces que contengan valina, alanina o glicina (Monogioudi *et al.*, 2011).

5.2.3.2. Electroforesis SDS-PAGE de los péptidos de β -Lg purificada

Los perfiles de digestión *in-vitro* de la β -Lg purificada con pepsina porcina se muestran en los geles de electroforesis de la **Figura 25** para la β -Lg en tampón acetato a pH 4,6 y en los de la **Figura 26** para la β -Lg en tampón fosfato a pH 6,8.

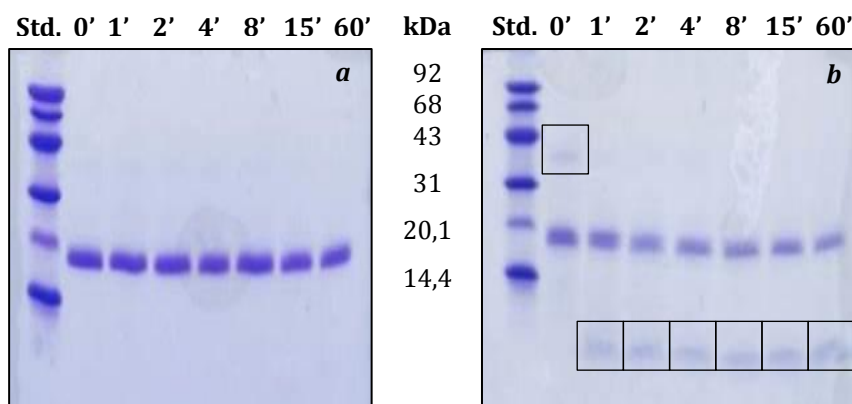


Figura 25. Electroforesis SDS-PAGE en gel 8-25% del efecto del tratamiento de pulsos de luz en la digestibilidad de la β -Lactoglobulina en tampón acetato (pH 4,6) con pepsina, para la proteína sin procesar -control- (0 J/cm²) (a), y proteína tratada bajo 15,95 J/cm² (b), a tiempos de hidrólisis 0 (sin hidrolizar), 1, 2, 4, 8, 15 y 60 minutos. El marcador de peso molecular (Std.): fosforilasa, 97 kDa; albúmina, 66 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 30 kDa; inhibidor tripsina, 20,1 kDa; α -Lactoalbúmina, 14,4 kDa.

En la **Figura 25.a**, donde se representa el perfil peptídico de la β -Lg (pH 4,6) que no fue expuesta a un tratamiento de pulsos de luz (control, 0 J/cm²), puede observarse una banda de 18,4 kDa correspondiente a la β -Lg en su estado monomérico. El perfil fue el mismo para todos los tiempos de digestión enzimática, es decir la proteína se mantuvo intacta durante los 60 minutos de la reacción hidrolítica con pepsina, que sería debido a su gran resistencia tal y como está descrito en la bibliografía (Mandalari *et al.*, 2009; Villas-Boas *et al.*, 2012; Peram *et al.*, 2013; del Castillo-Santaella *et al.*, 2014). Esta resistencia se debe a que a pH ácido la β -Lg presenta una β -hélice altamente estructurada (Molinari *et al.*, 1996), caracterizada por un bolsillo hidrofóbico con alta estabilidad a pH ácido (Reddy *et al.*, 1988; Maldonado-

Valderrama *et al.*, 2005), que le confiere gran rigidez y resistencia frente a la rotura por acción de la pepsina.

Cuando la β -Lg (purificada) a pH 4,6 fue expuesta a 15,95 J/cm² (**Figura 25.b**), a tiempo 0, es decir sin hidrolizar, la banda del monómero de β -Lg fue más difusa respecto a la misma sin procesar, observándose además la aparición de una banda de mayor peso molecular, un dímero de β -Lg de 36,8 kDa. En la **Figura 21** también se observaron agregados de β -Lg pero de menor tamaño molecular que la forma dimérica. Esta diferencia probablemente se deba a las condiciones de electroforesis ya que en la técnica Nativa (**Figura 21**) la carga de la proteína influye en su migración y por lo tanto no se puede determinar de forma certera la masa molecular, mientras que en condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE (**Figura 25**), la β -Lg de estructura globular, pierde su conformación tridimensional y se obtiene un fraccionamiento que obedece a la diferencia de peso. Los pulsos de luz favorecerían por tanto la agregación de la forma monomérica de esta proteína en dímeros, por la formación de puentes disulfuro (S-S), de acuerdo a lo establecido por *Elmnasser et al.*, (2008). Al de 1 minuto de hidrólisis con pepsina, el dímero desapareció y se generaron péptidos de bajo peso molecular presentes en el gel hasta los 60 minutos de tratamiento hidrolítico. En un análisis de repetición de este mismo ensayo se estudiaron también tiempos de digestión más cortos incluyendo los tiempos para 1 segundo (justo después de añadir la enzima), 15 y 30 segundos, y la aparición de péptidos no se dio hasta el minuto 1 (datos no mostrados), al igual que se muestra en la **Figura 25.b**. Esto demuestra que la aplicación de tratamientos de pulsos de luz facilitó la acción digestiva de la pepsina debido a una modificación estructural de la β -Lg apoyando la posibilidad de que la alergenicidad de esta proteína se vea reducida cuando es procesada mediante pulsos de luz. Los enlaces peptídicos sobre los que actúa la pepsina son preferiblemente entre aminoácidos aromáticos tales como fenilalanina, triptófano y tirosina (*Monogioudi et al.*, 2011), que resultan ser también los más fotoreactivos (*Davies y Truscott*, 2001). Al absorber la luz estos aminoácidos, produciría una modificación al menos en estas zonas de la proteína haciéndola más propensa a la acción de la pepsina dando lugar a péptidos de bajo peso molecular.

En este sentido, parece ser que los pulsos de luz producirían un cambio estructural en la proteína que favorecería la agregación de los monómeros de β -Lg y, al mismo tiempo, darían lugar a una estructura más laxa de los monómeros que quedarían libres, así como de los dímeros formados, facilitando la acción de la pepsina gástrica. Cabe por tanto suponer que la modificación de la estructura de la proteína y la formación de dímeros de β -Lg a pH ácido por el tratamiento de pulsos de luz dificultaría a su vez el reconocimiento de los epítomos por parte de las IgG y las IgE, reduciendo la inmunoreactividad de la β -Lg tal y como se ha descrito en las **Figuras 22 y 23**, respectivamente.

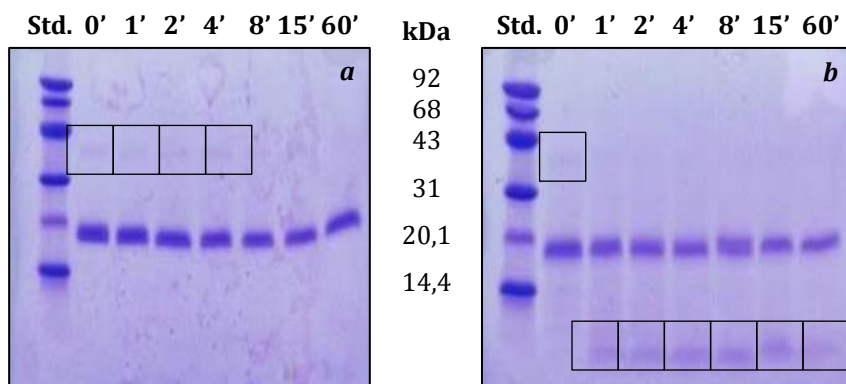


Figura 26. Electroforesis SDS-PAGE en gel 8-25% del efecto del tratamiento de pulsos de luz en la digestibilidad de la β -Lactoglobulina en tampón fosfato (pH 6,8) con pepsina, para la proteína sin procesar -control- (0 J/cm²) (a), y proteína tratada bajo 15,95 J/cm² (b), a tiempos de hidrólisis 0 (sin hidrolizar), 1, 2, 4, 8, 15 y 60 minutos. El marcador de peso molecular (Std.): fosforilasa, 97 kDa; albúmina, 66 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 30 kDa; inhibidor tripsina, 20,1 kDa; α -Lactoalbúmina, 14,4 kDa.

La **Figura 26.a** representa la β -Lg (purificada) control a pH 6,8, es decir la proteína sin ser tratada mediante luz pulsada (0 J/cm²). En estas condiciones se observó la banda correspondiente al monómero de 18,4 kDa que permaneció inalterada a lo largo del proceso hidrolítico, sin generación de péptidos de menor peso molecular. Sin embargo, también apreció una fina banda muy difusa de mayor peso molecular, correspondiente a la conformación dimérica de la proteína. Este dímero también resultó resistente a la acción de la pepsina durante la mayor parte de la digestión, es decir hasta los 15 minutos, no siendo sin embargo visible para una exposición de 60 minutos a la pepsina. Un resultado similar obtuvieron [Maldonado-Valderrama et al. \(2012\)](#) cuando estudiaron la proteólisis de la β -Lg a pH 7 en una emulsión de aceite en agua, aunque en su trabajo el dímero resistió la acción de la pepsina hasta los 60 minutos de digestión.

En el caso de la β -Lg a pH 6,8 expuesta a una fluencia total de 15,95 J/cm² (**Figura 26.b**), se observó la banda del monómero de β -Lg a tiempo 0 de hidrólisis (es decir, sin hidrolizar), siendo sin embargo esta banda más difusa que a 0 J/cm² (**Figura 26.a**), y se pudo ver asimismo una fina banda correspondiente a la conformación dimérica (36,8 kDa). Como en el caso anterior (pH 4,6), el tratamiento de pulsos de luz aplicado a la β -Lg a pH 6,8 favoreció el acceso de la pepsina a las zonas de acción generando péptidos de bajo peso molecular y la desaparición de dímeros desde el minuto 1 de hidrólisis. Tiempos de digestión más cortos (1, 15 y 30 segundos), al igual que a pH 4,6, no permitieron observar la aparición de péptidos de bajo peso molecular para la β -Lg a pH 6,8 (datos no mostrados), así como tampoco la desaparición de la conformación dimérica, requiriéndose un tiempo de acción de la pepsina del orden de un minuto (**Figura 26.b**) para poder ponerlos en evidencia.

Por tanto, bajo las condiciones de estudio empleadas en este trabajo, el tratamiento por pulsos de luz ha demostrado modificar la estructura globular de la β -Lg mejorando su digestibilidad *in-vitro* con pepsina en solución, respaldando los estudios de otros autores (Castillo-Santaella *et al.*, 2014).

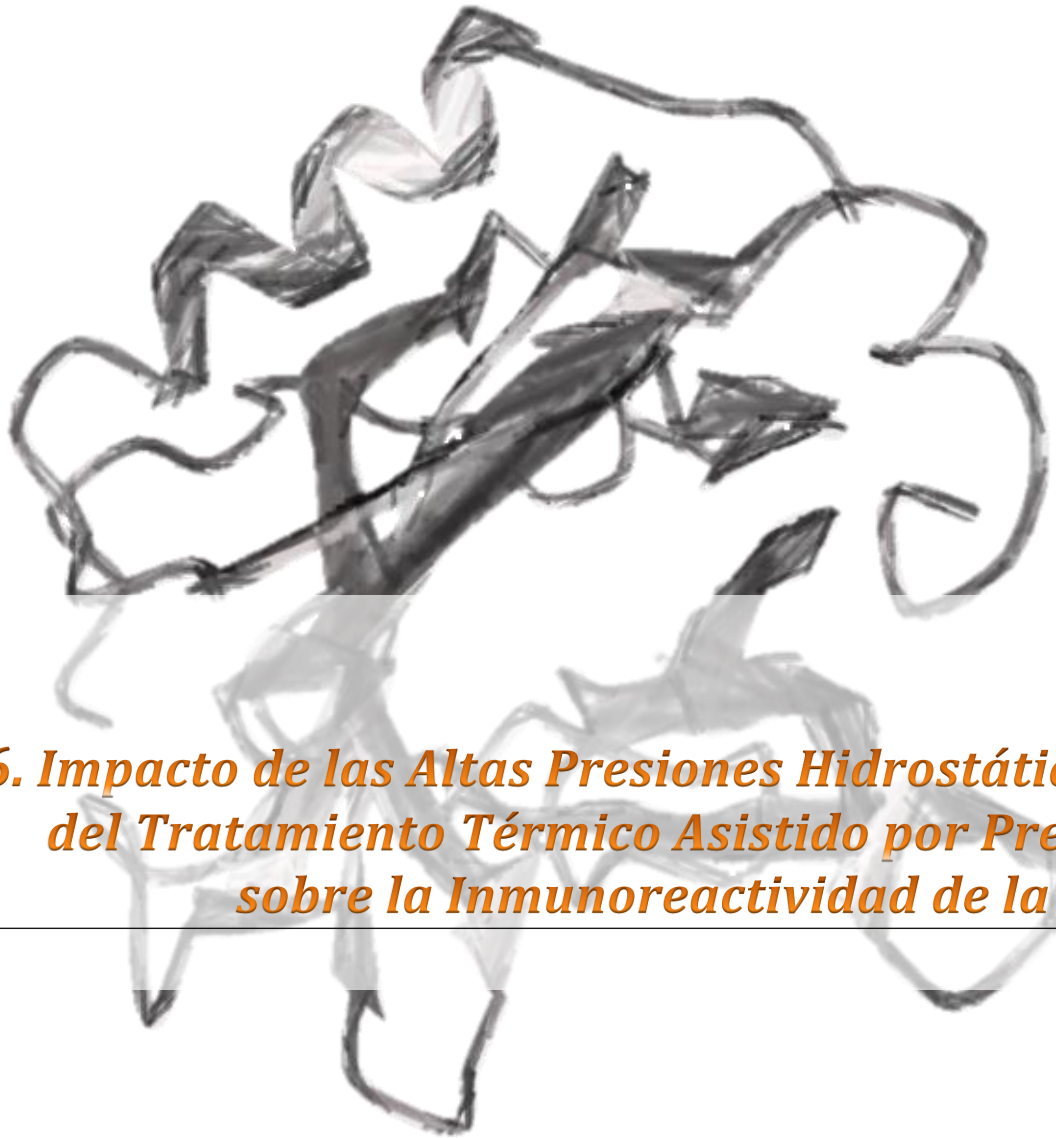
5.3. Conclusión

En este capítulo se ha estudiado el impacto de los pulsos de luz sobre la inmunoreactividad y digestibilidad enzimática de la β -Lactoglobulina (β -Lg). Los pulsos de luz fueron capaces de alterar la configuración de la proteína dando lugar a una estructura más laxa, favoreciendo la agregación de sus monómeros en dímeros, reduciendo la inmunoreactividad de la β -Lg tanto con IgG como con IgEr, y mejorando su digestibilidad con pepsina. Sin embargo, el impacto de los pulsos de luz en la estructura de la β -Lg se vio condicionado por el pH del medio, la presencia de sales, y la concentración de β -Lg.

Los pulsos de luz afectaron de forma diferente a la interacción de la β -Lg purificada con las IgG respecto a las IgEr. La unión antígeno-anticuerpo se redujo de forma progresiva con el incremento de fluencia cuando se utilizó IgG mientras que, con IgEr, no hubo tal dependencia con la fluencia, observándose dos fases: una primera con reducción de la inmunoreactividad hasta en general $3,85 \text{ J/cm}^2$ y una segunda donde no se modificó significativamente la unión antígeno-anticuerpo a pesar de aumentar la fluencia hasta $15,95 \text{ J/cm}^2$. Esta diferencia de comportamiento de las interacciones mediadas por IgG o por IgEr podría deberse a la concentración de β -Lg en el medio, definiendo el grado de alcance de los pulsos de luz en la estructura de la proteína de forma más acusada que la intensidad de tratamiento.

La luz pulsada permitió también modificar la β -Lg cuando esta proteína se encontraba de forma natural en una matriz más compleja como el lactosuero, no observándose diferencias significativas en la inmunoreactividad de la proteína con respecto a la observada para la β -Lg purificada incluso trabajando con fluencias menores. La curva de inhibición de la unión entre la β -Lg y la IgEr en función de la fluencia aplicada fue también bifásica en el lactosuero, reduciéndose la inmunoreactividad hasta una fluencia total de $2,8 \text{ J/cm}^2$, para luego mantenerse invariada aunque se incremente la fluencia hasta $11,6 \text{ J/cm}^2$.

Por otro lado, los tratamientos de luz pulsada hicieron más susceptible a la β -Lg a la acción hidrolítica de la pepsina, generando péptidos desde el minuto 1 de digestión enzimática. Esto sugiere que los pulsos de luz podrían emplearse para favorecer la digestibilidad de al menos la β -Lg, proteína altamente resistente a la digestión gástrica, y ser una alternativa tecnológica prometedora para el control proteolítico, lo que podría contribuir a elaborar productos con potencial alergénico reducido. En resumen, la tecnología de pulsos de luz demuestra ser interesante para disminuir el potencial alergénico de la β -Lg, reduciendo la unión antígeno-anticuerpo e incrementando la susceptibilidad de la proteína para ser hidrolizada enzimáticamente.



6. Impacto de las Altas Presiones Hidrostáticas y del Tratamiento Térmico Asistido por Presión sobre la Inmunoreactividad de la β -Lg

6.1. Introducción y Objetivo

El tratamiento térmico de la leche se emplea comúnmente para aumentar su vida útil a través de la inactivación de los microorganismos y de las enzimas alterantes de su calidad. A pesar de que el tratamiento térmico es un procesado efectivo, económico y ampliamente disponible, en muchos casos tiene un efecto indeseable en la calidad nutricional y propiedades sensoriales de la leche (Singh, 2004).

El aumento en la demanda de productos nutritivos y frescos ha evolucionado en el desarrollo de tecnologías de conservación que reemplazan a los actuales tratamientos térmicos (Butz y Tauscher, 2002). Entre estas tecnologías emergentes, las altas presiones hidrostáticas (APH) son ampliamente investigadas como método alternativo al tratamiento térmico de la leche dada su capacidad de inactivación de microorganismos vegetativos a bajas temperaturas (Rastogi *et al.*, 2007), mientras mantienen el sabor, el color y el balance de minerales y vitaminas originales (Knorr, 1993; de la Fuente *et al.*, 1998; Claeys *et al.*, 2003).

En términos generales, se han observado tres efectos mayoritarios de la presión sobre las proteínas, los cuales son función de la magnitud de la presión aplicada: (a) *efectos elásticos*, a los valores más bajos de presurización, inferiores a 200 MPa, provocando distorsiones reversibles en los enlaces primarios y secundarios (Somkuti y Smeller, 2013); (b) *desestabilización de la estructura terciaria y cuaternaria*, si la presión alcanza los 200 MPa, que interfiere en los procesos de solvatación (Danielewicz-Ferchmin *et al.*, 2011; Ortore *et al.*, 2009), forzando a las moléculas de agua a penetrar en el interior de las proteínas (Masson y Cléry, 1996; Russo *et al.*, 2013); y (c) la *desnaturalización* de la proteína, que varía en función de la proteína en el rango desde 100 MPa hasta 1 GPa, o incluso presiones mayores en casos especiales (Panick *et al.*, 1999; Tolgyesi *et al.*, 2004).

Sabiendo que el procesado de los alimentos, a través de los cambios conformacionales que provocan en las proteínas, puede alterar las propiedades alergénicas por enmascarado, destrucción o aparición de nuevos epítomos (Takagi *et al.*, 2003; Peyron *et al.*, 2006), resulta evidente que un tratamiento por APH es susceptible de modificar el potencial alergénico de la β -Lactoglobulina (β -Lg). La mayoría de las publicaciones científicas dirigidas a modificar las propiedades antigénicas de la β -Lg mediante APH, hacen referencia a parámetros indirectamente relacionados con la alergenicidad, como son la digestibilidad (Knudsen *et al.*, 2002; Olsen *et al.*, 2003; Chicón *et al.*, 2008a; Zeece *et al.*, 2008) y la antigenicidad de los hidrolizados obtenidos durante (Bonomi *et al.*, 2003; Peñas *et al.*, 2006; Chicón *et al.*, 2009, 2008b; López-Expósito *et al.*, 2012) o tras el tratamiento de presurización (Peñas *et al.*, 2006; Chicón *et al.*, 2008b). En este sentido, la tecnología de APH ha mostrado resultados prometedores en la reducción de la alergenicidad por un mejor control en la obtención de hidrolizados de proteína con propiedades reducidas en la antigenicidad y en la unión con IgE de pacientes alérgicos. No obstante, pocos son los estudios sobre la antigenicidad de la β -Lg sometida a APH que trabajen con la proteína sin hidrolizar. Por ejemplo, el grupo de Kleber *et*

al. (2007) estudió la influencia del tratamiento por altas presiones a diferentes temperaturas, en la respuesta antigénica de la β -Lg sin hidrolizar, utilizando para ello un ELISA competitivo con IgY de yema de huevo de gallina monoespecífica de 3 epítomos antigénicos de la β -Lg. En dicho trabajo revelaron un aumento de la antigenicidad de la proteína según aumentaba la intensidad del tratamiento tanto en tiempo -de 0 a 30 minutos-, como en temperatura -de 30 a 68°C- y en presión -desde 200 hasta 600 MPa. Por el contrario, *Chicón et al.* (2008a), mediante ELISA indirecto con sueros de pacientes alérgicos, encontraron una reducción de la inmunoreactividad de la β -Lg al ser sometida a 200 MPa (30°C) durante 30 minutos, no observando sin embargo una modificación de la inmunoreactividad para tratamientos APH combinados con temperatura más intensos (presiones y temperaturas mayores). En estudios de antigenicidad de otros alérgenos sometidos a altas presiones, como los aislados de proteína de sésamo procesados desde 100 MPa hasta 500 MPa, la alergenicidad decrecía a medida que la presión aumentaba (*Achouri y Boye*, 2013). El tratamiento a 600 MPa durante 20 minutos de masa cruda de salchicha también modificó eficazmente la inmunoreactividad IgE de las proteínas de la masa analizada por inmunoblotting (*Hajós et al.*, 2004). En los estudios por altas presiones de otros alérgenos con estructura beta (similar a la β -Lg) también se observó una reducción de la alergenicidad. Por ejemplo, en el mayor alérgeno de la manzana, Mal d 1, se produjo una reducción notable de su efecto inmunológico tras el procesado a 200 MPa, con una disminución del 80% del área en la prueba cutánea *prick test* realizada con pacientes alérgicos (*Meyer-Pittroff et al.*, 2007). No obstante, aunque se incrementó en este trabajo la presión hasta 600 MPa, este tratamiento APH no fue suficiente para eliminar completamente el área (*prick test*) en todos los pacientes. Sin embargo, para el mayor alérgeno de la zanahoria, Dau c 1, también de estructura predominantemente beta, *Heroldova et al.* (2009) no observaron ninguna reducción significativa en la unión de las IgE de plasmas de pacientes, ni por test de activación de basófilos ni en los estudios de *Western blot*, para tratamientos de 500 MPa llevados a cabo a temperaturas entre 30°C y 50°C.

Por tanto, ante la búsqueda de nuevas alternativas de procesado que permitan reducir la alergenicidad de las proteínas alimentarias, y en concreto de β -Lg, y la falta de estudios suficientes aplicando la tecnología de alta presión con este fin, el objetivo de este trabajo fue estudiar la viabilidad de las APH, del tratamiento térmico (TT) y la combinación de ambas variables, presión y temperatura, de forma simultánea aplicando para ello un tratamiento térmico asistido por presión (TTAP), como posibles tecnologías en la obtención de productos de inmunoreactividad reducida. Para ello, se empleó la metodología desarrollada con IgE recombinante en ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) competitivo indirecto para muestras de β -Lg purificada.

6.2. Resultados y Discusión

Para el desarrollo experimental de este estudio se emplearon muestras de β -Lg purificada diluidas (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en tampón acetato a pH 4,6 (pH del suero ácido), y en tampón fosfato a pH 6,6 (pH de la leche). Desafortunadamente no se pudieron llevar a cabo los ensayos para las matrices alimentarias trabajadas en capítulos anteriores, leche y lactosuero, por limitación en la disponibilidad de anticuerpos IgE recombinantes para los ensayos de inmunoreactividad *in-vitro* y el estudio se centró en las muestras de β -Lg purificada al pH de las matrices alimentarias.

Las curvas de temperatura y presión correspondientes al tratamiento de presurización menos intenso en presión y temperatura, APH 500 MPa/22°C/6 min, y más intenso, TTAP a 600 MPa/115°C/6 min, empleados en este trabajo se muestran en la **Figura 27** y la **Figura 28**, respectivamente. Los tratamientos de TTAP, como se muestra en la **Figura 28**, fueron precedidos de la etapa de precalentamiento del producto hasta que se alcanza la presión deseada. Tanto en el tratamiento por APH como en los TTAP se produjo un incremento adiabático de temperatura, debido al aumento de presión, durante los primeros 3,5 minutos aproximadamente. La temperatura alcanzada en cada uno de los tratamientos se mantuvo después estable (variación de $\pm 1^\circ\text{C}$) durante los 6 minutos de tratamiento y bajó rápidamente (en segundos) junto con la despresurización hasta las condiciones de partida.

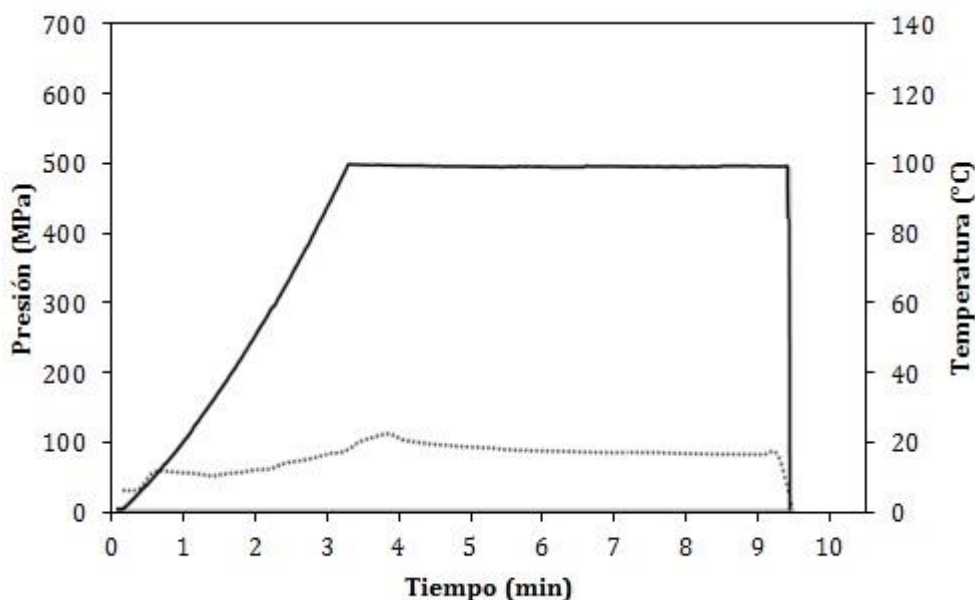


Figura 27. Perfil de presión y temperatura para el tratamiento por APH a 500 MPa, 22°C y 6 minutos de procesado. Línea continua: Presión (MPa); Línea discontinua: Temperatura (°C)

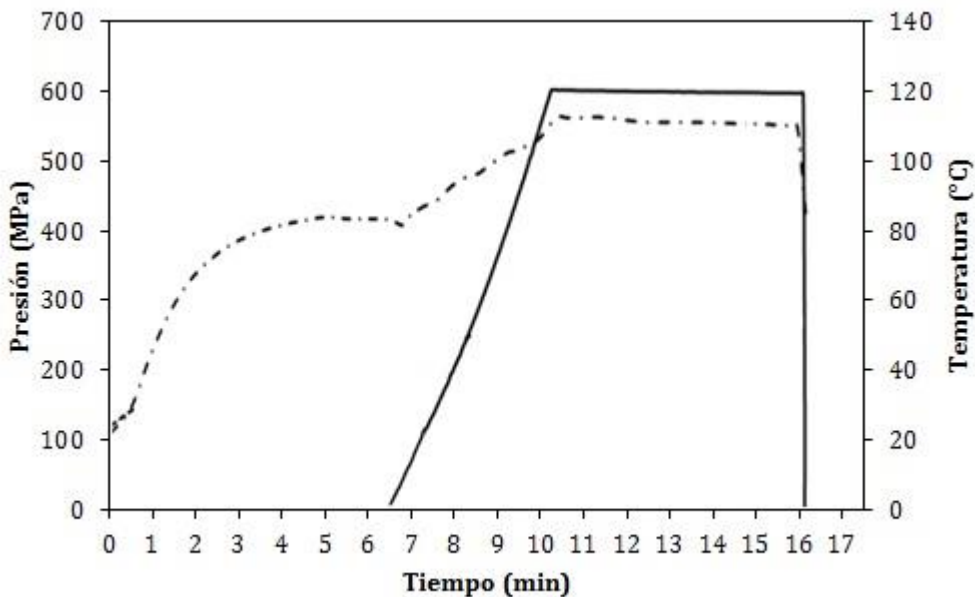


Figura 28. Perfil de presión y temperatura para el tratamiento por TTAP a 600 MPa, 115°C y 6 minutos de procesado, incluido el precalentamiento (86°C) a presión atmosférica.
Línea continua: Presión (MPa); Línea discontinua: Temperatura (°C)

6.2.1. Caracterización por Electroforesis

Para estudiar las interacciones entre proteínas, producidas por el efecto de las altas presiones hidrostáticas (APH) con y sin aplicación simultánea de temperatura, algunas muestras de β -Lactoglobulina (β -Lg) procesadas se llevaron a electroforesis nativa.

En la **Figura 29** se muestra el perfil de electroforesis de disoluciones de β -Lg purificada (2000 μ g/mL) a pH 4,6 y 6,8 nativa (sin procesar), procesadas por APH sin aplicación de calor (APH: 600 MPa/22°C/6 min) y con aplicación simultánea de calor (TTAP: 600 MPa/75°C/6 min). El control de β -Lg nativa a pH 4,6 (**L1**) presentó una única banda, al igual que tras ser procesada a 600 MPa/22°C durante 6 minutos (**L3**). En el caso de aplicar un TTAP a 600 MPa/75°C/6 minutos, no se apreció presencia proteica en el gel (**L5**). Al tratarse de una electroforesis tipo nativa, donde la proteína se puede desplazar en el gel en función de su tamaño molecular o bien según su carga, durante el procesado TTAP probablemente se produjeron determinados cambios en la estructura de la proteína afectando al tamaño molecular e incluso a la carga proteica influyendo en su migración a través del gel, lo que podría haber conllevado un rápido desplazamiento a través de éste escapándose del mismo.

Para la β -Lg a pH 6,8 en su estado nativo (sin procesar), **L2**, se observó una sola banda, mientras que una vez tratada por APH a 600 MPa durante 6 minutos (**L4**), se identificó una segunda banda que no aparecía en la muestra control sin procesar (**L2**). Esta banda puede deberse a la generación de agregados ya que la agregación de la β -Lg se ve favorecida por las altas presiones a temperatura ambiente (Funtenberger *et al.*, 1997).

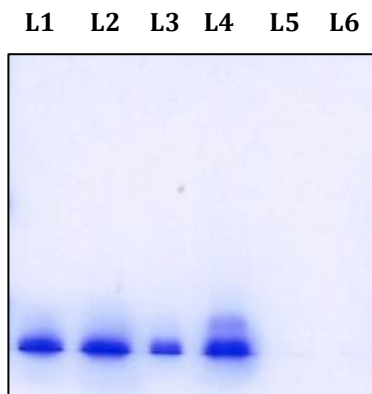


Figura 29. Electroforesis nativa en gel 8-25% del efecto de la presurización sobre la β -Lactoglobulina para proteína nativa - sin procesar (**L1** y **L2**), procesada bajo altas presiones hidrostáticas a 600 MPa/22°C/6 min (**L3** y **L4**) y por tratamiento térmico asistido por presión a 600 MPa/75°C/6 min (**L5** y **L6**), para β -Lactoglobulina a pH 4,6 (**L1**, **L3** y **L5**) y a pH 6,8 (**L2**, **L4** y **L6**)

La oligomerización se corresponde con los mecanismos propuestos en estados iniciales de modificación de la proteína al ser presurizada, esto es, la liberación de monómeros, la asociación de monómeros modificados e interacciones a través de enlaces tiol (SH) y disulfuro (S-S) (Iametti *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 2000), u oxidación de los grupos tiol (SH) (Tanaka *et al.*, 1996; Funtenberger *et al.*, 1997). En este sentido, Knudsen *et al.* (2002) observaron que tras el tratamiento a 450 MPa durante 15 minutos de la β -Lg en medio tamponado a pH 7,5 (cerca a la neutralidad), el nivel de oligómeros y polímeros fue superior comparado con el resto de tratamientos a presiones inferiores. Chicón *et al.* (2008a) en electroforesis bajo condiciones no reductoras para muestras de β -Lg (2500 μ g/mL) sometidas a 400 MPa de presión durante 30 minutos, también observaron cambios para la proteína a pH 6,8 y no a pH 2,5, con aparición de nuevas bandas relacionadas con agregados correspondientes a la estructura dimérica (\approx 36 kDa) y reducción de las bandas de la forma monomérica de la proteína. El desplegamiento de la β -Lg inducido por presión es más extenso e irreversible a pH 7,0 que a pH ácido y en el caso de no ser irreversible, la recuperación de la estructura se alcanza más lentamente cuando la proteína es procesada a pH neutro frente a un pH ácido (Belloque *et al.*, 2007; Ikeuchi *et al.*, 2001). También hay que considerar que, según Funtenberger *et al.* (1997), la formación de oligómeros de β -Lg es promovida a pH neutro, debido a una reactividad mejorada de los grupos sulfhidrilo (SH). Por tanto, nuestros resultados confirmarían de nuevo

que la estabilidad de las proteínas tratadas bajo presión depende en gran medida del pH del medio.

Finalmente, tras el procesado por TTAP a 600 MPa/75°C/6 min (**L6**) no se apreciaron bandas a lo largo del carril, al igual que para la β -Lg a pH 4,6 sometida a las mismas condiciones de TTAP (**L5**), probablemente por el mismo motivo; desnaturalización proteica (parcial o total), por ser sometida a un tratamiento más intenso al combinar la alta presión con calor, afectando a ambas muestras independientemente del pH.

Debido a la desnaturalización de la β -Lg al ser procesada mediante un TTAP a 600 MPa/75°C/6 min, se procedió a la realización de nuevas electroforesis esta vez en SDS para conocer la formación de agregados de muestras de β -Lg procesadas con tratamientos TTAP a 600 MPa/75°C. Al observarse una desaparición total de la banda correspondiente a esta proteína al ser sometida durante 6 minutos a 600 MPa/75°C, se procedió también a aplicar tratamientos más cortos para identificar el momento en el que se produce dicha desnaturalización y en qué medida. A continuación, en la **Figura 30**, se muestran los perfiles de electroforesis SDS correspondientes a las muestras de β -Lg a pH 4,6 (**Figura 30.a**) y pH 6,8 (**Figura 30.b**) sometidas a un TTAP a 600 MPa/75°C, durante distintos tiempos de procesado.

Como puede observarse en la **Figura 30**, el resultado obtenido fue muy similar para las dos muestras. En ambos geles de electroforesis se pudo apreciar una banda de 18,4 kDa correspondiente a la β -Lg nativa (**L2**), la cual apareció de forma más difuminada al ser sometida a un TTAP de 600 MPa/75°C/0 min (**L3**), es decir, a un tratamiento en el que en el momento en que se alcanza la presión programada de 600 MPa (y consecuentemente una temperatura de 75°C) se procede inmediatamente a la despresurización hasta presión atmosférica, fase que dura unos 2 segundos (durante esta despresurización, la temperatura disminuye adiabáticamente hasta la temperatura inicial de 53°C; posteriormente, ya fuera del equipo de altas presiones la muestra se enfrió hasta 4°C por inmersión en agua con hielo). Al mantener 1 minuto el TTAP a 600 MPa/75°C antes de la despresurización, la banda resultante en el gel de electroforesis fue aún más débil (**L4**). A mayores tiempos de procesado de TTAP a 600 MPa/75°C, 3 y 6 minutos (**L5** y **L6**, respectivamente), la banda de β -Lg desapareció. En el caso de la β -Lg a pH 6,8 (**Figura 30.b**) se observó, además de lo descrito anteriormente, una banda difusa de mayor peso molecular en la muestra sin tratar (**L2**), correspondiente a su forma dimerica, con un peso molecular de 36,8 kDa, que también fue visible a 0 minutos de TTAP bajo 600 MPa/75°C (**L3**). A tiempos superiores de procesado, 1, 3 y 6 minutos (**L4**, **L5** y **L6**, respectivamente), esta banda de mayor peso molecular desapareció, por lo que la estructura dimerica pudiera igual ser más sensible a las condiciones del TTAP aplicado que la forma monomérica.

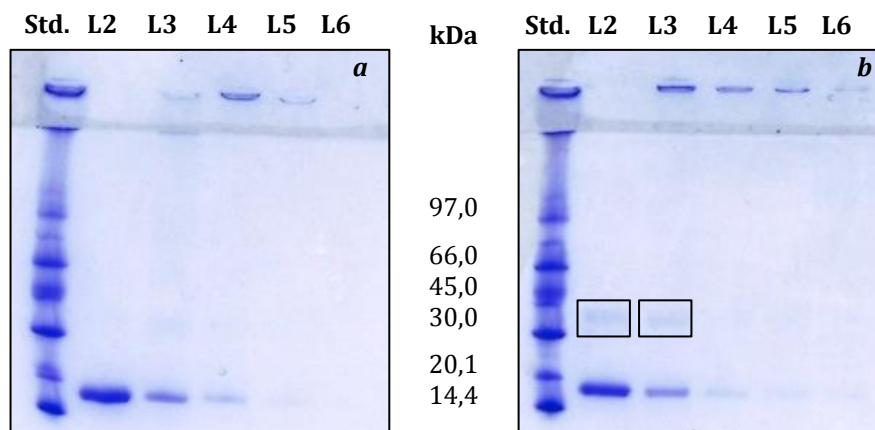


Figura 30. Efecto del tratamiento térmico asistido por presión a 600 MPa/75°C y tiempos 0, 1, 3 y 6 minutos (L3, L4, L5 y L6, respectivamente) para diluciones de β -Lactoglobulina a pH 4,6 (a) y a pH 6,8 (b) analizado por electroforesis SDS en comparación con β -Lactoglobulina nativa -sin procesar- (L2). El marcador de peso molecular (Std.): fosforilasa, 97 kDa; albúmina, 66 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 30 kDa; inhibidor tripsina, 20,1 kDa; α -Lactoalbúmina, 14,4 kDa

En la parte superior de ambos geles (**Figura 30**) se pudieron apreciar agregaciones proteicas que por su alto peso molecular no llegaron a entrar en el gel de electroforesis. Estos agregados que fueron inducidos por el TTAP a 600MPa/75°C, no existen en la proteína sin procesar (L2), y requirieron de un cierto tiempo para formarse el cual dependió del pH en el que se encontraba la proteína: mientras que no se necesitó apenas exposición a 600 MPa/75°C para observar una banda bien definida (**Figura 30.b. L3: 0 minutos**) a pH 6,8, se requirió de un tratamiento TTAP (600 MPa/75°C) de 1 minuto para obtener una banda bien marcada (L4) cuando la β -Lg se encontraba a pH 4,6 (**Figura 30.a**) aunque a tiempo 0 ya se pudo observar una banda menos neta (L3). Para tiempos de TTAP (600 MPa/75°C) más largos, estas agregaciones fueron desapareciendo progresivamente con la duración del tratamiento. La desaparición de esta banda parece producirse antes en la β -Lg a pH 4,6 que a pH 6,8. La formación de estructuras más complejas también fue puesta en evidencia por [Chicón et al. \(2008a\)](#), quienes llegaron a detectar, con tinción sensible de plata, agregados de β -Lg en forma de trímeros cuando la proteína diluida en un medio a pH 6,8 era presurizada a 400 MPa/30-50°C/30 min.

Estos resultados sugieren por tanto que el procesado por TTAP puede desnaturalizar la estructura de la β -Lg y formar agregados de alto peso molecular en su reconfiguración. Dicha desnaturalización proteica, tal y como demuestran nuestros resultados y otros autores ([Hinrichs y Rademacher, 2004, 2005](#); [López-Fandiño y Olano, 1998](#); [Hinrichs y Kessler, 1997](#)), es mayor cuanto mayor es la intensidad del tratamiento por TTAP tanto en tiempo como en temperatura.

Una vez demostrado que se pueden generar cambios estructurales en la β -Lg cuando es procesada tanto por APH como en TTAP, cabe suponer que estos tratamientos podrían tener también un efecto sobre la inmunogenicidad de la misma. Por este motivo, los experimentos que se describen a continuación fueron dirigidos a evaluar el efecto de dichas tecnologías en la inmunoreactividad de la β -Lg.

6.2.2. Ensayos Inmunoenzimáticos

Para determinar el impacto de las altas presiones hidrostáticas (APH) y de los tratamientos térmicos asistidos por presión (TTAP) sobre la inmunoreactividad de la β -Lactoglobulina (β -Lg) purificada, se llevó a cabo un ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) competitivo indirecto con inmunoglobulinas (Ig) E recombinantes. También se realizaron tratamientos térmicos (TT) para evaluar el impacto de éstos y poder así, por la misma, caracterizar el efecto de la temperatura en los tratamientos TTAP. Los tiempos de estudio para las tres tecnologías fueron 1, 3 y 6 minutos y, además, para APH y TTAP, 0 minutos que implica la finalización del ciclo cuando la presión programada de tratamiento es alcanzada. Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la unión IgEr con la proteína tratada respecto a la unión que ocurre entre la IgEr y la proteína nativa (sin procesar).

6.2.2.1. Afinidad de las IgE recombinantes con la β -Lg purificada procesada por APH y TTAP

A continuación, se muestran los resultados de inhibición en la unión de las IgEr con la β -Lg tras ser expuesta a diferentes intensidades de tratamiento de APH y TTAP, comparando así los resultados obtenidos al aplicar TTAP con aquellos resultantes de aplicar un tratamiento térmico a presión atmosférica (TT). Previamente a cada tratamiento, la β -Lg purificada se diluyó (2000 μ g/mL) en distintos medios, un tampón acetato a pH 4,6 y un tampón fosfato a pH 6,8, y se mantuvo en refrigeración hasta su estudio.

➤ 22°C, Altas presiones hidrostáticas:

En la **Figura 31** se muestran los datos de inhibición para el procesado por APH. Como se observa en la **Figura 31.a**, el tratamiento por APH a 500 MPa/22°C de la β -Lg apenas provocó alteraciones relevantes en la inmunoreactividad de la proteína para los tiempos estudiados. No hubo cambios significativos en su capacidad de unión con las IgEr para los diferentes pH en el que se encontraba la β -Lg al ser tratada a 500 MPa.

Para tratamientos APH a 600 MPa/22°C, es decir sin aplicación de calor (**Figura 31.b**), tampoco se produjeron modificaciones relativamente importantes en la unión antígeno-anticuerpo. La mayor inhibición en dicha unión se dio para la β -Lg a pH 4,6, en la cual se produjo, tras 6 min de tratamiento, una inhibición relativa de 17,9% (de: 8,56) respecto a la proteína sin procesar. Por el contrario, en la β -Lg a pH 6,8 parece ser que podría igual haber

un ligero aumento en la unión antígeno-anticuerpo (entre el 3,13% -de: 9,50-, y el 6,26% -de: 7,11- de unión) con respecto a la unión que se da entre la IgEr y la proteína control (no procesada). Probablemente este ligero aumento en la unión podría estar relacionado con la formación de pequeños agregados solubles a pH 6,8 observados en la **Figura 29 (L4)** para los tratamientos APH. Estos resultados concuerdan con el estudio de [Kleber et al. \(2007\)](#) para aislados de proteína a pH 7,5 en medio no tamponado, en el que obtuvieron un ligero aumento de la antigenicidad de la β -Lg tras 10 y 30 minutos de tratamiento a presiones de 400 MPa y 600 MPa.

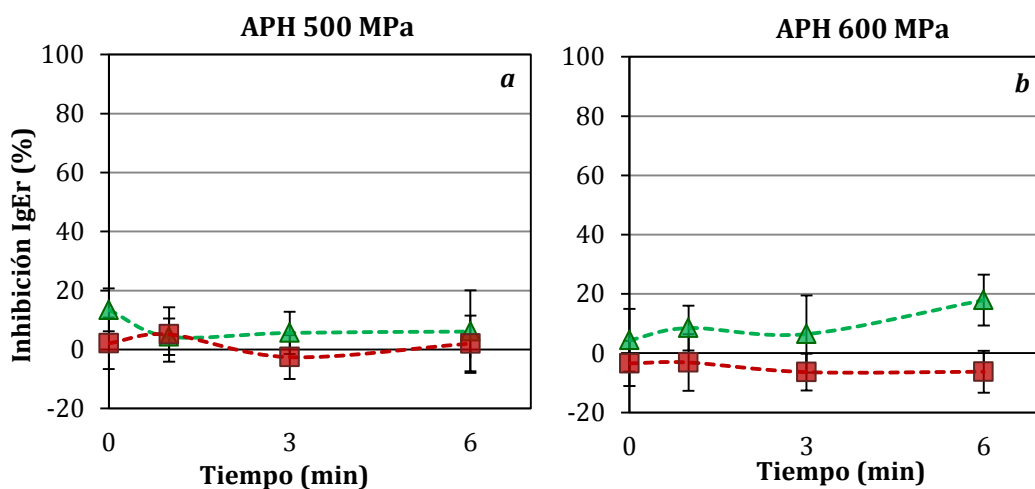


Figura 31. Porcentaje de inhibición en la unión de IgE recombinante con β -Lactoglobulina purificada diluida en tampón acetato a pH 4,6 (--- \blacktriangle ---) y en tampón fosfato a pH 6,8 (--- \blacksquare ---) procesada por altas presiones hidrostáticas a 500 MPa (a) y 600 MPa (b) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

Por otro lado, en nuestro estudio los cambios en la inmunogenicidad son en general mínimos al igual que en el trabajo de [Mazri et al. \(2012\)](#). Estos autores, utilizando la técnica de inmunodifusión radial, observaron sin embargo que la presurización de la β -Lg en tampón fosfato aumentaba el grado de desnaturalización con el tiempo de tratamiento y con la presión aplicada, alcanzando una pérdida final de la concentración de proteína inmunoreactiva no superior al 20% para a 600 MPa/6 min. Todas estas diferencias en resultados entre los diferentes estudios pueden atribuirse a las distintas condiciones del procesado por presión, así como a las diferentes técnicas de análisis de la inmunoreactividad empleadas.

El bajo impacto del tratamiento de presurización sin calor en la inmunoreactividad de la β -Lg confirma también estudios previos con proteínas séricas procesadas por APH desde 100 hasta 600 MPa, frente a los hidrolizados de las mismas muestras una vez sometidas a altas presiones cuyos fragmentos apenas presentaron alergenicidad residual ([Bonomi et al., 2003](#); [Peñas et al., 2006](#)). Sin embargo, a pesar del bajo impacto de las APH en la inmunoreactividad

de la proteína sin hidrolizar, estudios recientes han demostrado que la aplicación de altas presiones a temperatura ambiente (20°C) promueve la desnaturalización de la β -Lg a pH 7,0 hasta el 90% cuando es sometida a 500 MPa por períodos largos de hasta 2 horas (Saalfeld *et al.*, 2015). En este sentido, aunque las APH no serían adecuadas para reducir por si solas la inmunoreactividad de la β -Lg, podrían resultar interesantes para mejorar el proceso de hidrólisis en la obtención de hidrolizados de alergenicidad reducida.

➤ **75°C, Tratamiento térmico vs. Tratamiento térmico asistido por presión:**

Cuando se procedió al tratamiento de las muestras por TT a 75°C (**Figura 32.a**), la temperatura de desnaturalización de la β -Lg (de Wit, 1981), no se mostraron cambios relevantes en el potencial alergénico de la β -Lg. Para ambas muestras, β -Lg a pH 4,6 y a pH 6,8, no se superó el 20% de inhibición, manteniéndose constante hasta 6 min de procesado térmico. A tiempos mayores la inhibición tampoco se vio afectada ya que como se mostró en los TT a 20 minutos (**Figura 20**), a 75°C los valores de inhibición para las muestras de β -Lg purificada se mantenían en estos niveles. En el trabajo de Taheri-Kafrani *et al.* (2009), estos autores también observaron que la β -Lg procesada a 75°C era menos reconocida que la proteína nativa (sin procesar) por las IgE de una mezcla de sueros de pacientes alérgicos. Dichos autores sugirieron que esta reorganización de la proteína provocada por el efecto del tratamiento térmico enmascararía bien epítomos lineales o bien conformacionales presentes en el alérgeno, reduciendo así la unión con las IgE. Los estudios de inhibición de Ehn *et al.* (2004) para β -Lg a pH 7,4 procesada a 74°C durante 15 minutos y 60 minutos también mostraron una ligera reducción en la unión con anticuerpos IgE de sujetos sensibilizados a la leche.

En el caso de procesados TTAP a 75°C, concretamente 500 MPa/75°C (**Figura 32.b**) y 600 MPa/75°C (**Figura 32.c**), se observó un aumento importante en la inhibición de la unión antígeno-anticuerpo para la mayoría de las muestras. Para los dos niveles de presión, a tiempo 0, todas las muestras de β -Lg mostraron una inhibición de entre el 10% y el 15%, ligeramente superior a los valores obtenidos en APH (**Figura 31**) a ese mismo tiempo y similar o ligeramente superior a las obtenidas mediante TT a 75°C. La exposición térmica de las muestras, hasta alcanzar la presión de trabajo, por encima de la temperatura de desnaturalización de la proteína y más concretamente de la de modificación de los epítomos responsables de su inmunoreactividad, podría provocar un aumento de la inhibición en el reconocimiento de la β -Lg por parte de las IgE. Sin embargo, la temperatura inicial y el tiempo de exposición a dicha temperatura en el momento de iniciar la presurización no sería responsable de la modificación en la β -Lg ya que, para alcanzar adiabáticamente 75°C en los TTAP aplicados, se precalentó inicialmente el medio (agua de presurización) a 56°C y 53°C (temperatura inicial a presión atmosférica) para los procesados a 500 MPa y 600 MPa respectivamente.

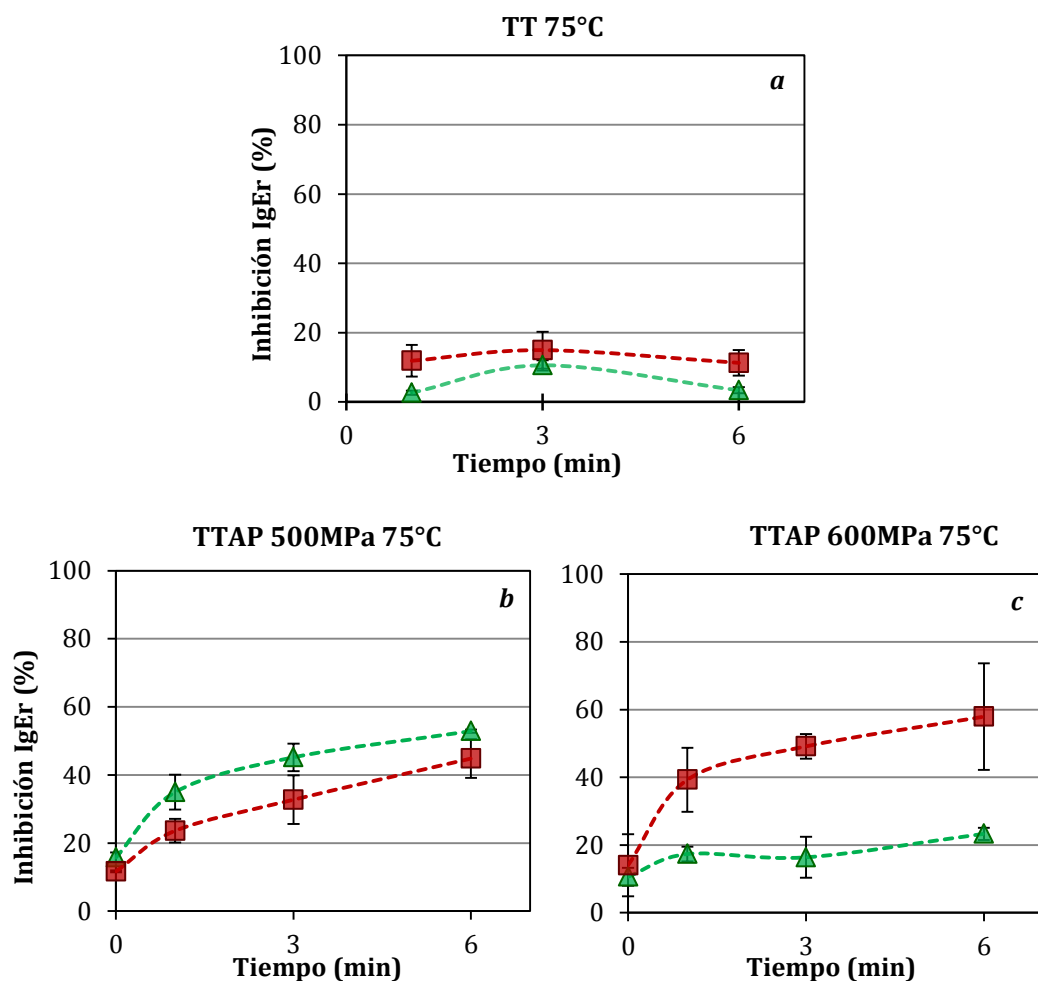


Figura 32. Porcentaje de inhibición en la unión de IgE recombinante con β -Lactoglobulina purificada diluida en tampón acetato a pH 4,6 (--- \blacktriangle ---) y en tampón fosfato a pH 6,8 (--- \blacksquare ---) procesada por tratamiento térmico a 75°C (a), y por tratamiento térmico asistido por presión a 75°C y 500 MPa (b) y 600 MPa (c) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

La Figura 32 muestra así mismo que una vez alcanzadas las presiones de estudio, tanto a 500 MPa como 600 MPa, la inhibición aumentó con el tiempo de procesado, que indicaría por un lado el efecto sinérgico de la presión y de la temperatura para estas intensidades de TTAP y por otro lado que los mecanismos de desnaturalización por TT y TTAP serían diferentes para la misma temperatura final (75°C) y mismos tiempos de exposición a dicha temperatura. Como se ha mostrado previamente (Tedford y Schaschke, 2000), la estructura terciaria de la β -Lg a pH 7,0 se pierde completamente al ser tan sólo tratada a 100 MPa/75°C. En relación a nuestros resultados, este efecto explicaría el que las modificaciones estructurales provocadas en la β -Lg a pH 6,8 a 500 MPa/75°C (Figura 32.b) y a 600 MPa/75°C (Figura 32.c) influirían sobre el potencial alérgico por alteración de los epítomos, los cuales

serían menos reconocidos por las IgEr. Además, la reactividad de grupos sulfhidrilo (SH) que a pH neutro y alcalino se ven fortalecidos (Funtenberger *et al.*, 1997; Famelart *et al.*, 1998), lograrían un desplegamiento irreversible de la proteína (Ikeuchi *et al.*, 2001) una vez finalizado el proceso de presurización, favoreciendo el mantenimiento de estos cambios estructurales que modifican el potencial alergénico de la proteína.

Como se observa en la **Figura 32.c**, se alcanzaron valores de inhibición de la unión de la proteína a la IgEr cercanos al 50% a los 6 minutos del procesado TTAP, excepto para la β -Lg a pH 4,6 sometida a un TTAP a 600 MPa/75°C que mostró retener la misma capacidad de unión con la IgEr que sin aplicación de calor (**Figura 31.b**). A pesar de que resulte extraño que la inhibición sea superior a la presión más baja para pH 4,6 (**Figura 32.b**), podría indicar por un lado que los mecanismos implicados en la desnaturalización mediante TTAP de la β -Lg son diferentes en función del pH en el que se encuentra ésta y por otro lado que existirían efectos antagónicos entre la presión y la temperatura, al menos para la proteína a pH 4,6, prevaleciendo el efecto de la presión en el caso de TTAP a 600 MPa. Aunque el TTAP a 600 MPa/75°C desnaturalizó la proteína tanto a pH 4,6 como a pH 6,8, cabiendo esperar un aumento de la inhibición en ambos casos por destrucción o enmascarado de los epítomos de la proteína, según mostró el gel de electroforesis en la **Figura 30**, las modificaciones estructurales así como las cinéticas de aparición y desaparición de agregados proteicos difirieron para los dos pH lo que podría explicar el comportamiento diferente de la proteína según el pH para el TTAP 600 MPa/75°C (no se realizaron geles de electroforesis SDS a 500 MPa/75°C).

➤ **95°C, Tratamiento térmico vs. Tratamiento térmico asistido por presión:**

Los resultados relativos a la inhibición de la unión de la β -Lg a la IgEr cuando la proteína es expuesta a 95°C se muestran en la **Figura 33**. En el procesado por TT a 95°C (**Figura 33.a**), la disminución en la unión IgE con β -Lg fue mayor que a temperaturas más bajas, 75°C (**Figura 32.a**). La inhibición de la unión entre la proteína y la IgEr tras un TT a 95°C fue en general menor para pH 6,8 con respecto a pH 4,6. Para la β -Lg a pH 4,6 el valor de inhibición fue entorno al 45-50% manteniéndose a tiempos mayores, incluso tras 20 minutos de TT a 95°C como se mostró anteriormente en la **Figura 20**. En tampón fosfato a pH 6,8, la inhibición de la unión entre β -Lg y la IgEr aumentó ligeramente con el tiempo de TT (**Figura 33.a**), alcanzando un grado de inhibición al de 6 minutos similar (30-35%) al observado tras 20 minutos de tratamiento (**Figura 20**).

La pérdida de inmunoreactividad de la β -Lg a 95°C con respecto a 75°C también fue observado previamente en otros estudios (Kleber *et al.*, 2004; Ehn *et al.*, 2004; Taheri-Kafrani *et al.*, 2009) en los cuales se evidenció una disminución en el reconocimiento de la β -Lg -por parte de las IgE de mezclas de plasmas de pacientes alérgicos y/o de IgY de yema de huevo- a temperaturas de 75°C, con un efecto máximo a 85°C y 95°C (temperaturas más elevadas testeadas). En un estudio más reciente, Morisawa *et al.* (2009) observaron una reducción en la

liberación histamínica de los basófilos de pacientes alérgicos a la β -Lg tras ser procesada térmicamente a 100°C a tiempos desde 15 minutos hasta 120.

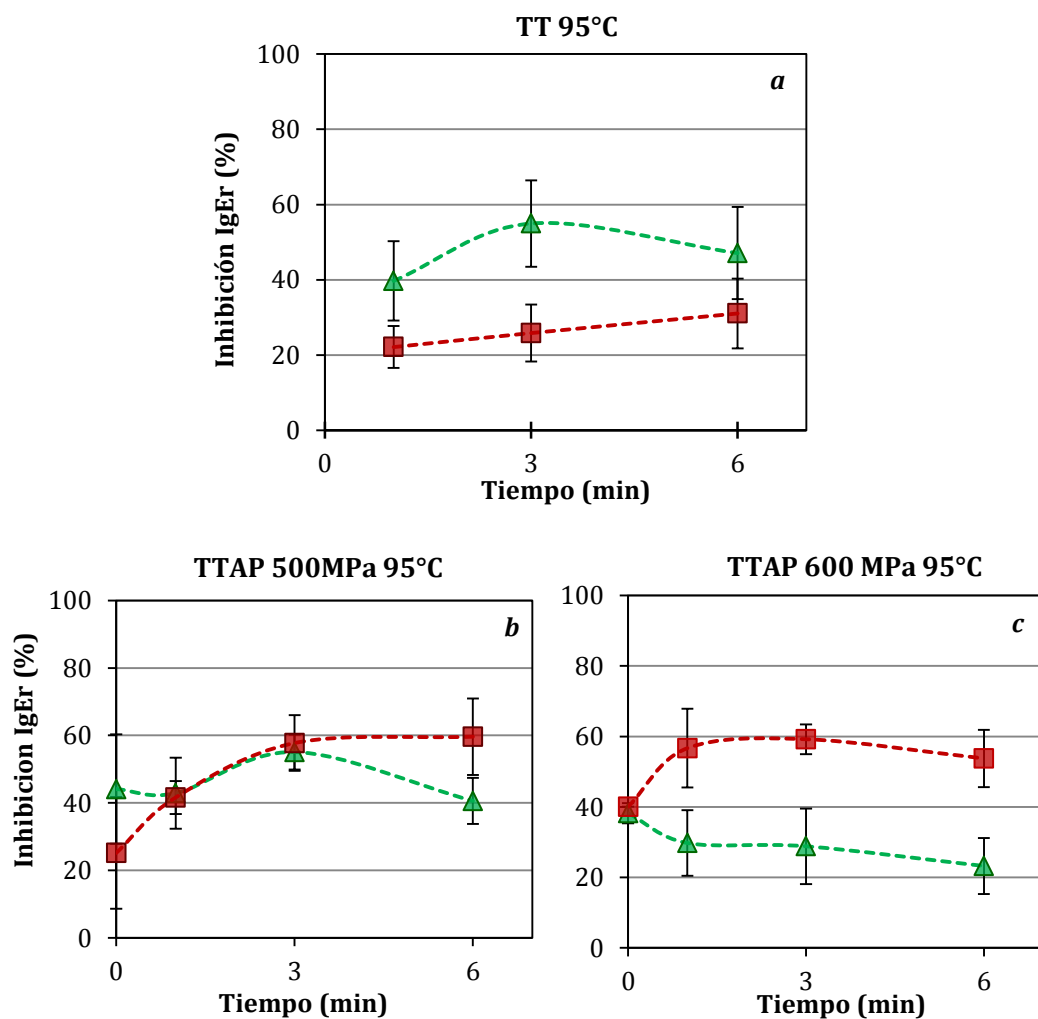


Figura 33. Porcentaje de inhibición en la unión de IgE recombinante con β -Lactoglobulina purificada diluida en tampón acetato a pH 4,6 (---▲---) y en tampón fosfato a pH 6,8 (---■---) procesada por tratamiento térmico a 95°C (a), y por tratamiento térmico asistido por presión a 95°C y 500 MPa (b) y 600 MPa (c) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

Con el fin de alcanzar 95°C como temperatura final de consigna en el procesado TTAP, se precalentó el medio (agua) de presurización hasta 73°C y 69°C (temperaturas a presión atmosférica) para los tratamientos de 500 MPa y 600 MPa, respectivamente. En el TTAP 500 MPa/95°C (Figura 33.b) y 600 MPa/95°C (Figura 33.c) la inhibición de la unión de la β -Lg a pH 4,6 con la IgEr a tiempo 0 (despresurización inmediata hasta presión atmosférica en el momento en que se alcanza la presión programada de tratamiento) fue de entorno al 40%.

Teniendo en cuenta que las temperaturas iniciales del medio de presurización (a presión atmosférica, antes de empezar el ciclo de presurización-despresurización) se encontraban a 69°C y 73°C, y que a 75°C la inhibición de la unión a este pH no supero el 20% a pesar de mantener la proteína a esta temperatura durante 20 minutos (**Figura 20**), los valores de inhibición encontrados a tiempo 0 para los TTAP a 95°C serían principalmente debidos a las temperaturas alcanzadas y al tiempo de residencia a dichas temperaturas durante la fase de presurización hasta la presión final de consigna (500 ó 600 MPa). Hay que tener en cuenta que un TT a 95°C produce una inhibición en la unión de la proteína a la IgEr de 45-50% a pH 4,6 (**Figura 33.a**). Este mismo fenómeno ocurriría a pH 6,8, tanto para 600 MPa/95°C (**Figura 33.c**) como para 500 MPa/95°C (**Figura 33.b**), aunque para este último tratamiento la inhibición a tiempo 0 fue la más baja, 25% aproximadamente, que concordaría con el hecho que a pH 6,8 la inhibición para un proceso TT de 95°C/1 min fue cercano al 20% (**Figura 33.a**). Una vez alcanzada la presión y temperatura de consigna, se puede ver que el comportamiento difiere en función del pH en el caso de tratamientos a 600 MPa (**Figura 33.c**) mientras que a 500 MPa (**Figura 33.b**) no parece haber una influencia tan significativa del pH. Esto mismo se pudo observar para TTAP a 75°C. Para pH 6,8, a medida que el tiempo de procesado fue mayor, la inhibición aumentó hasta aproximadamente el 60% (de: 11,35) tanto para TTAP de 500 MPa/95°C (**Figura 33.b**) como para 600 MPa/95°C (**Figura 33.c**). Por el contrario, en el caso de pH 4,6, la inhibición fue descendiendo ligeramente con el tiempo de tratamiento hasta el 23,25% (de: 7,92) cuando se aplicó un TTAP de 600 MPa/95°C (**Figura 33.c**), alcanzándose los niveles de inhibición observados a este pH en TTAP 600 MPa/75°C (**Figura 32.c**). Esto indicaría, como se ha comentado anteriormente para TTAP a 75°C, un efecto antagónico entre la presión y la temperatura en el caso de la β -Lg a pH 4,6, prevaleciendo el impacto de la presión en el mecanismo de reducción de la inmunoreactividad de esta proteína a 600 MPa/95°C. Para TTAP de 500 MPa/95°C (**Figura 33.b**), al aumentar el tiempo de tratamiento, salvo a 6 minutos, la proteína tanto a pH 6,8 como a pH 4,6 fue reconocida de forma muy parecida por las IgEr dando lugar a niveles de inhibición similares.

A la vista de los resultados obtenidos, parece que existe un efecto sinérgico de la presión y de la temperatura en el procesado mediante TTAP de la β -Lg a pH 6,8, produciéndose una reducción mayor en la inmunoreactividad de la proteína que cuando solo se aplica un tratamiento térmico, mientras que a pH 4,6 los resultados muestran justo lo contrario, que no existe un efecto sinérgico y que a 600 MPa éste puede ser antagónico, siendo el mejor tratamiento para reducir la inmunoreactividad de la β -Lg el tratamiento térmico tradicional, es decir no asistido por presión.

➤ **115°C, Tratamiento térmico vs. Tratamiento térmico asistido por presión:**

Finalmente, los resultados para la máxima temperatura estudiada, 115°C, se muestran en la **Figura 34**. En el procesado por TT a 115°C (**Figura 34.a**) se obtuvieron valores altos de inhibición de la unión de la β -Lg a la IgEr, entre el 70% y el 80%, tanto para la β -Lg a pH 4,6 como a pH 6,8, desde 1 hasta 6 minutos. A esta temperatura de TT no se llevaron a cabo tratamientos a 20 minutos, como para las otras temperaturas (**Figura 20**); sin embargo, en base a los resultados obtenidos a temperaturas inferiores y según la tendencia observada en el gráfico de la **Figura 34.a**, se puede presuponer que a tiempos mayores el nivel de inhibición se mantendría constante.

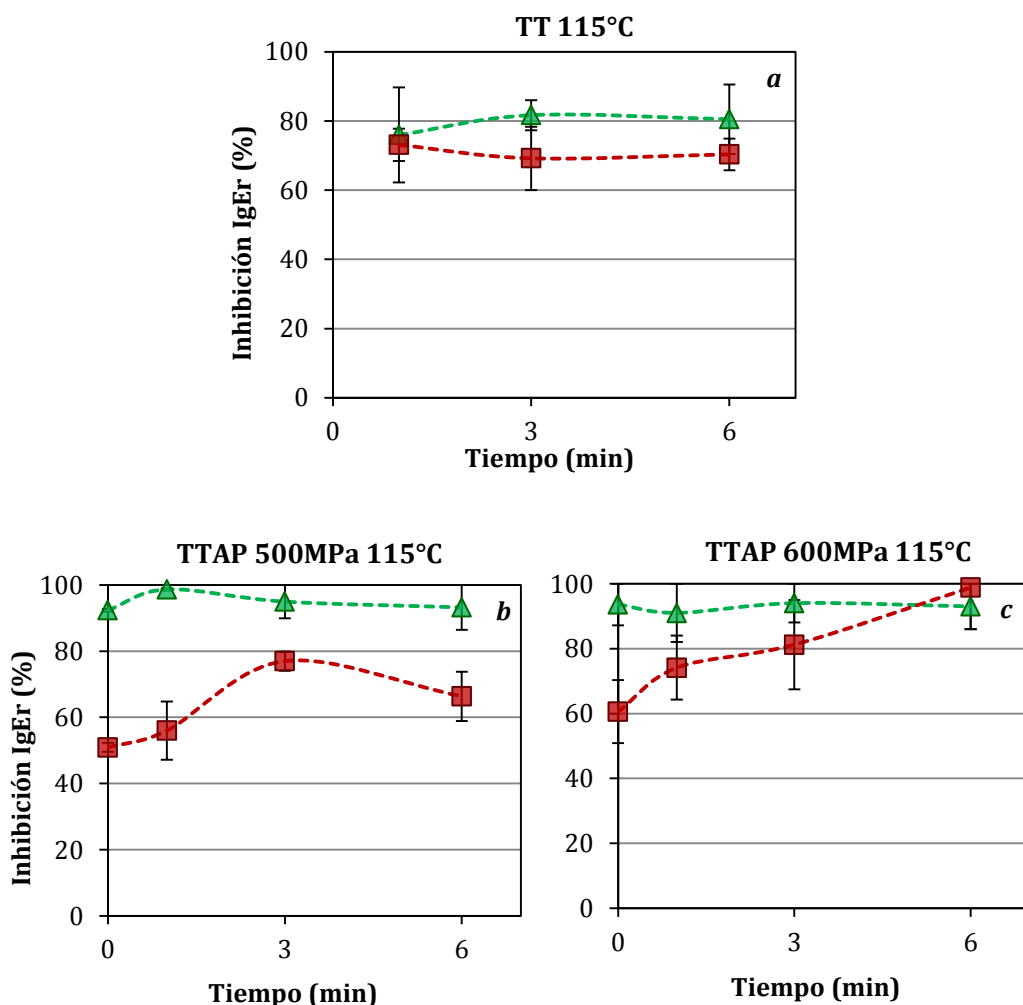


Figura 34. Porcentaje de inhibición en la unión de IgE recombinante con β -Lactoglobulina purificada diluida en tampón acetato a pH 4,6 (---▲---) y en tampón fosfato a pH 6,8 (---■---) procesada por tratamiento térmico a 115°C (a), y por tratamiento térmico asistido por presión a 115°C y 500 MPa (b) y 600 MPa (c) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

Para lograr un procesado TTAP a 115°C, se precalentó la temperatura del medio (agua) de presurización hasta 90°C para el TTAP 500 MPa/115°C y hasta 86°C para el tratamiento a 600 MPa/115°C. Puesto que la temperatura de desnaturalización de la β -Lg es en torno a 75°C (de Wit, 1981), durante el periodo de precalentamiento de la muestra a presión atmosférica por encima de la temperatura de desnaturalización de la proteína se puede producir una desnaturalización de la β -Lg, contrariamente a los tratamientos comentados en los apartados anteriores donde la temperatura inicial (temperatura al final de la fase de precalentamiento, es decir la temperatura al inicio del ciclo de presurización) siempre fue inferior a la temperatura de desnaturalización de esta proteína. En el caso del TTAP a 115°C, además de la probable desnaturalización térmica parcial de la β -Lg que pueda darse en dicho periodo de precalentamiento, el incremento de la temperatura durante toda la fase de presurización en los TTAP a 115°C (toda la fase de presurización se lleva a cabo a temperaturas superiores a la temperatura de desnaturalización de la β -Lg) sería en gran medida responsable de los niveles importantes de reducción de la inmunoreactividad de la β -Lg a tiempo 0 de TTAP (despresurización inmediata una vez alcanzada la presión de consigna), tanto a 500 MPa/115°C (**Figura 34.b**) como a 600 MPa/115°C (**Figura 34.c**). La sensibilidad de la proteína durante esta fase de presurización fue mayor a pH 4,6 que a pH 6,8 (una inhibición de la unión proteína-IgEr 20% superior aproximadamente a pH 4,6), produciéndose una pérdida de inmunoreactividad casi total en el caso de la β -Lg a pH 4,6. Para tiempos de exposición más largos de TTAP a 115°C, se pudo observar también un comportamiento diferente en función del pH, que en parte podría quizás ser debido a que a pH 4,6 se alcanzó casi una inhibición total de la unión al alcanzar la presión y temperatura de consigna (tanto para 500 MPa/115°C como para 600 MPa/115°C). Mientras que a pH 4,6 el nivel de inhibición se mantuvo constante, en el caso de pH 6,8 aumentó al incrementar el tiempo de exposición hasta alcanzar, para 600 MPa/115°C, valores de inhibición similares a los observados a pH 4,6, es decir una pérdida casi total de la inmunoreactividad para 600 MPa/115°C/6 min. En el caso de 500 MPa/115°C, el incremento de inhibición de la unión proteína-IgEr en función de la duración del TTAP fue menor alcanzándose valores máximos de inhibición de alrededor del 77% a pH 6,8. Los niveles de inhibición alcanzados en TTAP 600 MPa/115°C fueron superiores a los observados en TT a 115°C (tiempo de tratamiento muy largo para alcanzar los 115°C, y por tanto exposición importante de la proteína a altas temperaturas) tanto para la β -Lg a pH 4,6 como a pH 6,8, revelando la potencialidad de la combinación de calor y presión para reducir de forma casi total la inmunoreactividad de la β -Lg. Además, se observa en general un efecto sinérgico de la presión y de la temperatura, en particular para pH 4,6 y para TTAP llevados a cabo a 600 MPa. Por tanto, los mecanismos implicados en reducciones tan importantes de la inmunoreactividad como las observadas mediante TTAP a 115°C parecen diferir de aquellos que ocurren en TTAP a temperaturas más bajas.

6.3. Conclusión

En este capítulo se ha estudiado el impacto de las altas presiones hidrostáticas (APH), del tratamiento térmico (TT) y del tratamiento térmico asistido por presión (TTAP) sobre la antigenicidad de la β -Lactoglobulina (β -Lg).

El tratamiento mediante APH (aplicación de presión a temperatura ambiente) provocó modificaciones en la β -Lg, favoreciendo la presencia de la estructura dimérica de la proteína.

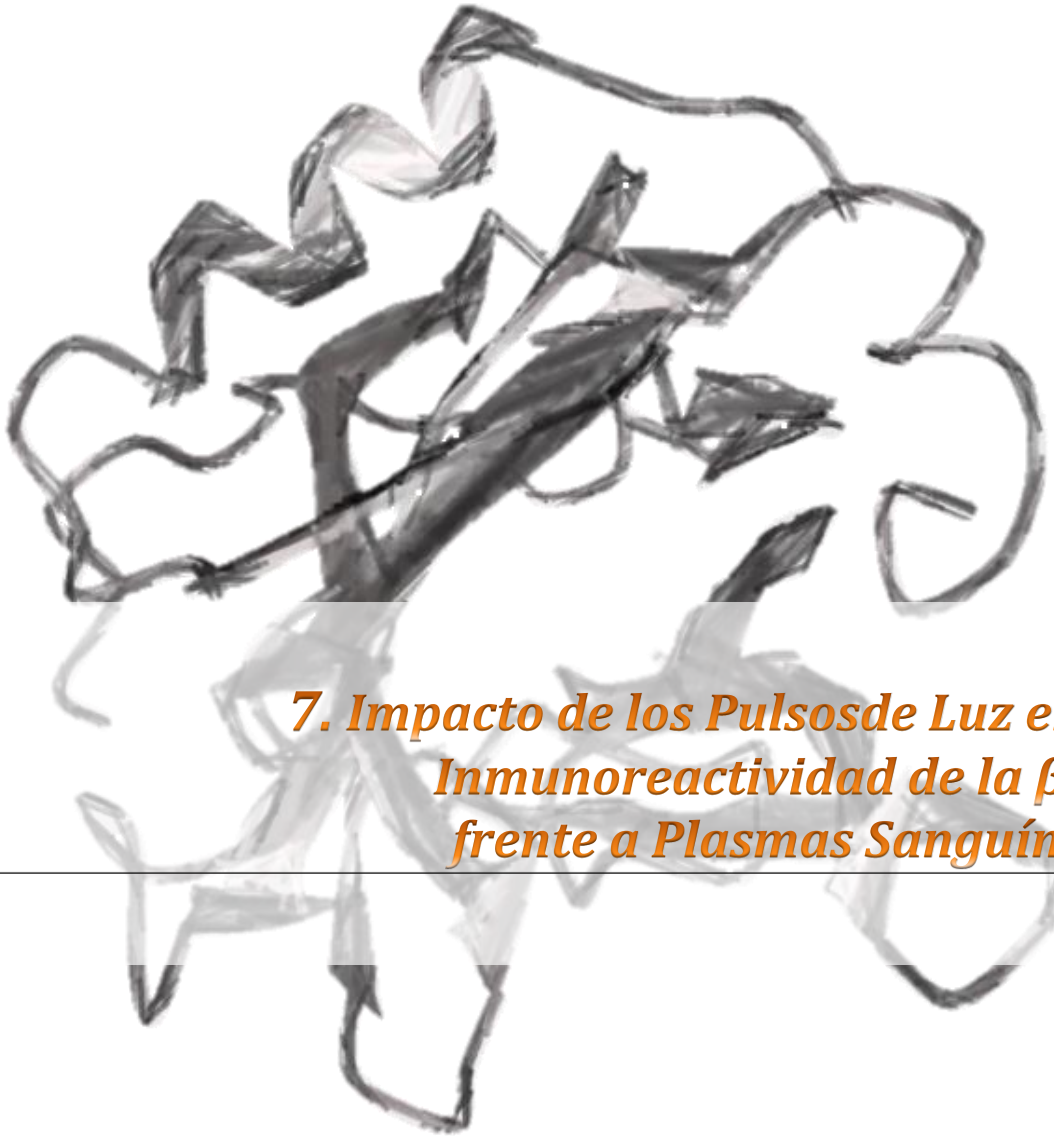
Sin embargo, en los ensayos de antigenicidad de la β -Lg purificada procesada por APH a 500 MPa y 600 MPa (sin aplicación de calor), así como en aquellos referidos al procesado exclusivamente térmico llevado a cabo a la temperatura más baja estudiada (75°C), no se observaron cambios importantes en la unión de la β -Lg procesada con las IgEr respecto a la proteína sin tratar.

En lo que se refiere al procesado por TTAP, éste produjo alteraciones en la β -Lg induciendo su desnaturalización a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento, con formación inicial de agregados que también se fueron degradando a mayor tiempo de procesado.

La aplicación simultánea de altas presiones con calor, es decir, el empleo de un procesado TTAP, favoreció notablemente la reducción en la inmunoreactividad de la β -Lg. En la mayoría de los casos estudiados, se observó un efecto sinérgico de la combinación presión y temperatura en los TTAP, produciéndose una mayor reducción del reconocimiento de la proteína por parte de las IgEr que en TT. Sin embargo, en algunos tratamientos TTAP, en concreto en aquellos que se llevaron a cabo a más bajas temperaturas sobre la β -Lg a pH 4,6, parece existió un efecto antagónico de la presión y la temperatura sobre la inmunoreactividad de la β -Lg, alcanzando valores de inhibición de la unión proteína-IgEr inferiores al obtenido mediante el TT correspondiente.

El impacto del TTAP en la inmunoreactividad de la β -Lg se vio influenciado por el pH del medio así como por la presión de tratamiento, el tiempo de procesado y, en mayor medida, por la temperatura del TTAP. El tiempo necesario para alcanzar la máxima inhibición se vio reducido a medida que la temperatura de tratamiento era más alta, llegando a alcanzar casi el 100% de inhibición a tiempo 0 de TTAP (500 y 600 MPa) a 115°C con la β -Lg a pH 4,6.

Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la idea de que la tecnología de TTAP podría resultar prometedora en la reducción del potencial alergénico de la β -Lg. Estos trabajos se deberían corroborar con matrices alimentarias más complejas y extender la validación final de la tecnología mediante el desarrollo de estudios con plasmas sanguíneos de pacientes alérgicos a las proteínas de leche de vaca.



***7. Impacto de los Pulsos de Luz en la
Inmunoreactividad de la β -Lg
frente a Plasmas Sanguíneos***

7.1. Introducción y Objetivo

A lo largo de esta tesis se ha hablado de los métodos tradicionalmente empleados en la industria alimentaria para la detección de alérgenos, los cuales se basan en el empleo de inmunoglobulinas (Ig) G. Estos métodos difieren de aquellos ensayos clínicos que permiten diagnosticar alergias en pacientes con hipersensibilidad hacia una o varias proteínas alimentarias, los cuales miden tanto la IgE total como la IgE específica en el plasma del paciente. Por eso, en este trabajo se ha desarrollado una técnica *in-vitro* inmunoenzimática tipo ELISA competitivo indirecto (ciELISA) que permitiera identificar alteraciones en la unión de la β -Lactoglobulina (β -Lg) con IgE recombinantes (IgEr) basados en sueros humanos que permiten una detección *in-vitro* estandarizada de β -Lg gracias a su homogeneidad y especificidad (Jylhä *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en el ciELISA podrían servir como un *screening* preliminar en la predicción del potencial alergénico de un alimento; sin embargo, debido a la gran variabilidad y especificidad de los anticuerpos humanos, los resultados no son directamente equiparables, es decir, una reducción observada en la inmunoreactividad frente a las IgEr no es garantía de obtener el mismo resultado en un estudio clínico. Por ello, resulta necesario conocer el efecto de las tecnologías en la reactividad de las proteínas mediante ciELISA con plasmas de pacientes alérgicos a las proteínas de la leche de vaca (APLV).

Las IgE de pacientes se miden por una unidad común: kilounidades/litro (kU/L). Los niveles de IgE sérica total de un paciente deben compararse siempre con los intervalos de referencia de una población estratificada por edad, sana y no atópica. En caso de ser elevados pueden servir de confirmación, pero un valor normal o bajo no elimina la posibilidad de una patología mediada por inmunoglobulinas tipo E. Es por ello que la IgE sérica total debe interpretarse con sumo cuidado en el contexto clínico de cada paciente. A diferencia de la IgE total sérica, la presencia de una IgE en suero que reacciona de forma específica con un alérgeno determina si un paciente está sensibilizado, e identifica la propensión a una reacción alérgica tras la exposición de nuevo al alérgeno (López, 2012).

No obstante, los ensayos de unión con IgE específica también tienen algunas limitaciones considerando la importancia clínica. Aunque para algunos alérgenos la concentración absoluta en plasma de IgE específica para ese alérgeno se correlaciona al menos aproximadamente con la probabilidad de reacciones clínicas, y especialmente con los alérgenos alimentarios en niños, esta relación es en el mejor de los casos aproximada. La presencia de IgE específica indica sensibilización pero no necesariamente que los pacientes sensibilizados vayan a manifestar síntomas a la exposición del alérgeno.

Por consiguiente, se han establecido asociaciones entre una cierta concentración sérica de IgE específica y la probabilidad de reacción alérgica tras una exposición antigénica. En concreto, un estudio de Sampson (2001), estableció distintos niveles diagnósticos de IgE específica frente a la clara de huevo (7 kU_A/L), leche de vaca (17 kU_A/L), cacahuete (14 kU_A/L)

y pescado (20 kU_A/L) (la “A” indica que es específico de alérgeno). La detección de niveles por encima de esos puntos predecía la reactividad clínica con una especificidad > 95 %. Este estudio establecía que la cuantificación de IgE específica frente a esos alérgenos podía sustituir a las pruebas de provocación, ya que pueden ser peligrosas y precisan mucho tiempo.

Así, cada individuo alérgico presenta una sensibilidad diferente ante la presencia de la misma dosis de alérgenos alimentarios y, como se ha demostrado tanto en la literatura (Houska *et al.*, 2013; Verhoeckx *et al.*, 2015; Rahaman *et al.*, 2016) como en las investigaciones llevadas a cabo en esta tesis, la inmunoreactividad de estas proteínas puede verse alterada por el procesado al que sea sometido el alimento. El uso de anticuerpos tipo IgE humano aportaría un elemento de especificidad al ensayo dado que detecta proteínas alérgicas clínicamente relevantes. Sin embargo, dada la variable y heterogénea respuesta de las IgE humanas, se deben realizar pruebas de confirmación con sueros de pacientes APLV para confirmar la variación en la inmuoafinidad hallada por el método aquí desarrollado. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la aplicabilidad del ciELISA desarrollado en esta tesis para analizar los cambios provocados en la inmunoreactividad de la β -Lg procesada empleando plasmas de pacientes APLV.

A la vista de los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, se consideró interesante trabajar con muestras de β -Lg procesadas por pulsos de luz, ya que es una tecnología novedosa que en la industria alimentaria permite su empleo como sistema continuo del procesado de los alimentos. Además, los datos aquí obtenidos se podrán contrastar con aquellos mostrados sobre la inmunoreactividad de la β -Lg presente en matrices alimentarias complejas –lactosuero– frente a IgE recombinantes (IgEr), que no se pudieron llevar a cabo para los tratamientos con altas presiones hidrostáticas y tratamiento térmico asistido por presión por la falta de disponibilidad de IgEr.

7.2. Resultados y Discusión

En ensayos anteriores (ver capítulos precedentes) se trabajó con inmunoglobulina (Ig) E recombinante monoclonal específica frente a β -Lactoglobulina (β -Lg). Sin embargo, los plasmas sanguíneos de pacientes alérgicos suelen presentar diferentes tipos de anticuerpos específicos para una misma proteína, o hacia varias proteínas. Para adaptar el test de alergenicidad *in-vitro Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) competitivo indirecto a los plasmas de pacientes alérgicos a las proteínas de la leche de vaca (APLV), se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1º. Inmunodotting: permite estudiar los reactivos óptimos a emplear, principalmente bloqueante y anticuerpo secundario anti-IgE (Ac_s).

2º. ELISA directo: para conocer las concentraciones de β -Lg en el tapizado, de IgE (dilución de antisueros), y de Ac_s óptimas a utilizar en el ELISA competitivo indirecto (ciELISA).

3º. ciELISA con muestras de β -Lg purificada de concentración conocida y en matrices alimentarias sin procesar: para determinar el rango de concentraciones/diluciones donde la relación con la absorbancia fuese cuantificable.

4º. ciELISA con muestras de β -Lg purificada y en matrices alimentarias procesadas por pulsos de luz: estudio final del impacto de los pulsos de luz en la inmunoreactividad de la β -Lg.

7.2.1. Inmunodotting

La sensibilidad y especificidad de los ELISAs y los inmunodotting dependen del tipo de anticuerpos que utilicen para detectar los distintos antígenos y a pesar de que los resultados no siempre coinciden entre ambos ensayos (López *et al.*, 2009), el inmunodotting puede servir para predecir y descartar condiciones de ensayo en ELISA. Dado que el estudio de inmunoreactividad de la β -Lg nativa con plasma de pacientes APLV resulta más complejo que con IgE, previo a los ELISAs se han realizado *dottings* como *screening* preliminar para estudiar algunas condiciones, como el tipo de bloqueante o el marcador anti-IgE (conjugado) y evitar el gasto de antisueros (en cantidades limitadas por tratarse de pacientes pediátricos).

El proceso metodológico de un *inmunodotting* es muy similar al de un ELISA directo: incubación del marcador (“tapizado” de la membrana), bloqueo de los sitios libres para evitar falsos positivos, incubación con anti-IgE conjugado (Ac_s), y desarrollo colorimétrico con sustrato, tal y como se ha descrito en el **Capítulo de Materiales y Métodos (sección 3.2.4.4.)**. Sin embargo, de forma preliminar, se estudiaron diferentes condiciones en algunos de los pasos del ensayo, por separado, para establecer aquellas que pudieran resultar más adecuadas para el reconocimiento del antígeno de interés (β -Lg).

Así, en primer lugar, se estudió la idoneidad de los bloqueantes disponibles, estudiando su capacidad para bloquear la unión inespecífica de los Ac_s (anti-IgE). Para ello, se incluyeron en la membrana de nitrocelulosa los plasmas sanguíneos de pacientes APLV (**Plasmas 43, 44, L1 y L2**) como controles “positivos” del reconocimiento por parte del Ac_s y la propia proteína β -Lg como control “negativo” (no debe ser reconocida por los anticuerpos secundarios anti-IgE). Dentro de las condiciones de ensayo, se estudiaron cuatro tipos de bloqueantes: BSA (Albúmina sérica bovina) 1%, OVO (Ovoalbúmina) 1,5%, BLQ (Bloqueante comercial de Pierce) y BLQ (Bloqueante comercial de Sigma), y dos diluciones del marcador anti-IgE (Sigma): 1/200 y 1/1000 en PBS. El resultado se muestra en la **Figura 35**.

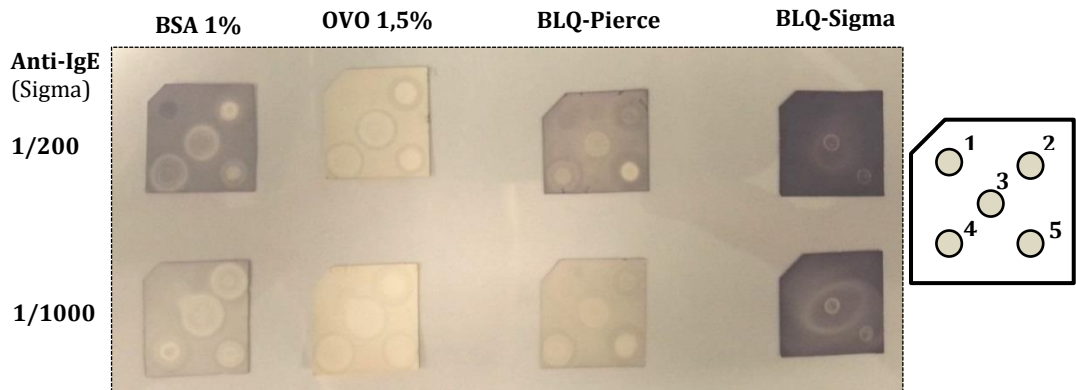


Figura 35. Immunodotting de estudio de cuatro bloqueantes –columnas-, de izquierda a derecha en la imagen: BSA (1%), OVO (1,5%), BLQ-Pierce (comercial), BLQ-Sigma (comercial); y con dos diluciones de anticuerpo secundario Anti-IgE-Sigma (preparado comercial) –filas-, de arriba abajo en la imagen, 1/200 y 1/1000. Los cinco marcadores en cada membrana fueron, de izquierda a derecha y de arriba abajo: β -Lg (1), plasma L1 (2), plasma 44 (3), plasma L2 (4), plasma 43 (5)

Como se muestra en la **Figura 35**, el bloqueo con BSA (1%) permitió una identificación inespecífica de la β -Lg cuando se empleó el Ac_s a una dilución 1/200; el fondo oscuro indica una fuerte adhesión del anticuerpo secundario en la membrana (probablemente debido a un insuficiente bloqueo de los sitios libre en la misma) que puede dar problemas de lectura en placa (blancos o controles negativos con altas absorbancias) en ensayos posteriores. Esta intensidad de señal inespecífica se perdió con una dilución mayor de Ac_s (1/1000) para el bloqueo con BSA (1%), mientras que dicho bloqueo permitió el reconocimiento de las IgE presentes en los antisueros. La OVO (1,5%) no permitió la identificación inespecífica de la β -Lg con el método utilizado, y no se apreció señal en el punto de colocación de la misma en las membranas bloqueadas con esta proteína, independientemente de la dilución de Ac_s , indicando una fuerte adhesión del bloqueante a la membrana, que enmascaró también la presencia de IgE de los antisueros. En cuanto a los bloqueantes comerciales, ambos permitieron una adhesión considerable del Ac_s a las membranas representado por una tonalidad oscura de las zonas no incubadas con marcador. Atendiendo a estos resultados, y a la concentración de anticuerpo secundario recomendado según el proveedor para ensayos ELISA (mayor de la 1/1000 probada en estas pruebas preliminares), se decidió seguir estudiando las condiciones óptimas de ensayo empleando como bloqueantes únicamente BSA (buen bloqueo a diluciones de Ac_s altas) u OVO (buen bloqueo en cualquier condición), y diluciones del Ac_s superiores a 1/200.

Así, con estas condiciones de partida, a continuación se estudió el comportamiento de los bloqueantes seleccionados en el potencial de reconocimiento de la β -Lg por parte de los antisueros, colocando en la membrana la propia β -Lg, los plasmas (diluidos 1/100 en PBS) de pacientes codificados como **L1** por su alta disponibilidad, y **44** por ser aquel de mayor especificidad hacia la β -Lg (**Tabla 3**) como controles "positivos", y la proteína utilizada como bloqueante como control "negativo", realizándose el ensayo para ambos bloqueantes BSA (1%) y OVO (1,5%), y diluciones de Ac_s (anti-IgE, Southern) 1/500, 1/1000 y 1/2000. El resultado se muestra en la **Figura 36**.

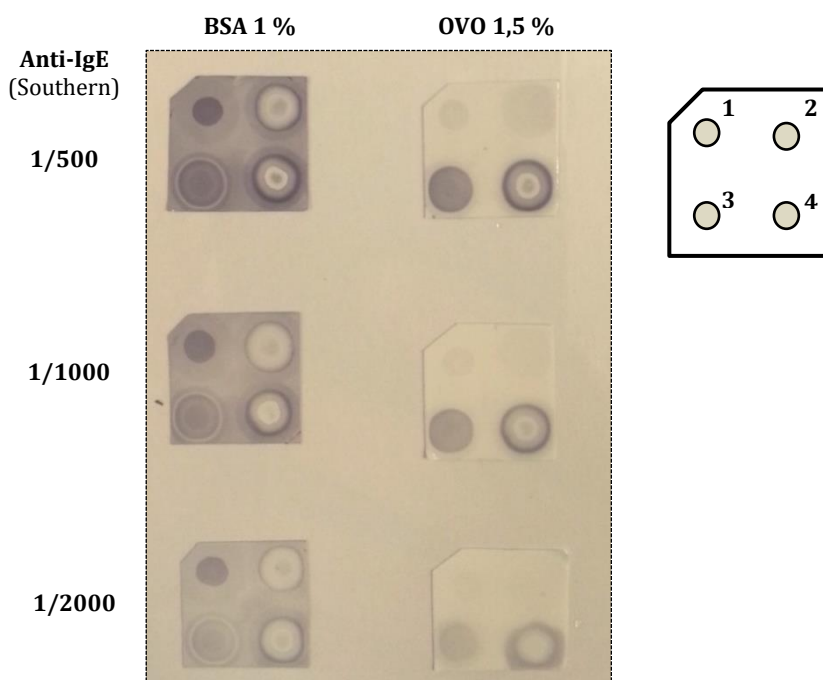


Figura 36. Inmunodotting para dos bloqueantes –columnas-, de izquierda a derecha en la imagen, BSA al 1%, OVO al 1,5%; y para tres diluciones de anticuerpo secundario Anti-IgE-Southern (preparado comercial) –filas-, de arriba abajo en la imagen, 1/500, 1/1000 y 1/2000. Los cuatro marcadores en cada membrana fueron, de izquierda a derecha y de arriba abajo: β -Lg (1), BSA u OVO –según el bloqueante, el contrario- (2), plasma 44 (3), plasma L1 (4)

En la **Figura 36** se aprecia, de forma general para todas las diluciones de Ac_s estudiadas, una mayor adherencia inespecífica a la membrana con bloqueante BSA (1%) que con la OVO (1,5%). Respecto a las muestras bloqueadas con OVO (1,5%), se observa una menor reacción inespecífica, y a mayor dilución de Ac_s, menor resolución de los spots. Sin embargo, con el bloqueo de OVO también se inhibió completamente la identificación por parte de los antisueros de la β -Lg (β -Lg, spot 1), proteína de interés.

En consecuencia, aunque estos resultados nos permitieron reducir el número de condiciones a estudiar, éstos no fueron completamente concluyentes ni decisivos, por lo que al pasar a trabajar con ELISA tipo directo, se decidió estudiar de nuevo ambos bloqueantes, tanto el bloqueante OVO (1,5%) por ofrecer una visión más clara en los *immunodotting* (menor “ruido de fondo”), como BSA (1%) puesto que fue el bloqueante empleado en los análisis con IgE_r y en las pruebas anteriores no bloqueó el reconocimiento de la β -Lg por parte de los antisueros. En cuanto al Ac_s, se seleccionó el anticuerpo Anti-IgE (Southern) ya que permitió una identificación más clara de los marcadores (**Figura 36**) en comparación con el Anti-IgE (Sigma) (**Figura 35**).

7.2.2. Estudio de las Condiciones Óptimas de Análisis por ELISA directo

Primeramente se llevaron a cabo inmunoensayos tipo ELISA directo para dos tipos de plasmas de pacientes alérgicos, **L1** y **44**. Se estudiaron dos concentraciones de tapizado: 0,5 y 1 μ g por pocillo de β -Lg (5 y 10 μ g/mL de β -Lg en la solución original, 100 μ L por pocillo); dos tipos de bloqueantes: OVO (1,5%) y BSA (1%) y dos diluciones de conjugado anti-IgE (Southern): 1/4000 y 1/8000 en solución salina fisiológica (SSF), pH 7,4. Una vez tapizadas las placas, se realizaron diluciones seriadas de los plasmas de APLV, **L1** y **44**, desde 1/100 (Log₁₀: 2,00) hasta 1/6400 (Log₁₀: 3,8). Tras la incubación con el conjugado y la adición de sustrato, los resultados se muestran en la **Figura 37**, donde se representan en diferentes gráficas los valores de absorbancia (DO_{450nm}) de las combinaciones tapizado/bloqueante/conjugado. La selección de diluciones de Ac_s mayores a las estudiadas en el *immunodotting* se estableció atendiendo a las necesidades en placa donde no se requieren tan altas concentraciones por ser un método más sensible, como se pudo observar en los anteriores ELISA (directo y competitivo), correspondientes a previos capítulos, empleando el mismo tipo de Ac_s.

Para todas aquellas curvas representadas en la **Figura 37**, se aprecia que según aumentó la dilución de los plasmas, la absorbancia (DO_{450nm}) disminuyó significativamente. Cuando la placa se bloqueó con OVO (1,5%) y se empleó una dilución de anti-IgE 1/8000 (**Figura 37.a**), se obtuvieron valores de absorbancia más bajos que a las mismas condiciones con anti-IgE 1/4000 (**Figura 37.c**), especialmente para el *plasma L1*. Lo mismo ocurrió cuando se bloqueó con BSA (1%) para la misma dilución de anti-IgE (**Figura 37.b**), pero además con una diferencia relevante entre los dos tipos plasmas estudiados. Esta diferencia entre los plasmas también apareció de forma notable cuando la placa se bloqueó con BSA (1%) para una dilución del marcador 1/4000 (**Figura 37.d**), aunque los valores de absorbancia obtenidos fueron más elevados. Las condiciones que mejores lecturas dieron en absorbancia (DO_{450nm}) fueron el bloqueo de la placa con OVO (1,5%) e incubación anti-IgE 1/4000 (**Figura 37.c**). No se mostraron diferencias importantes por el tapizado en ninguna de las distintas combinaciones estudiadas, por lo

que se prosiguió trabajando con la mínima concentración de β -Lg, 0,5 μ g/mL, para un uso racional de los reactivos.

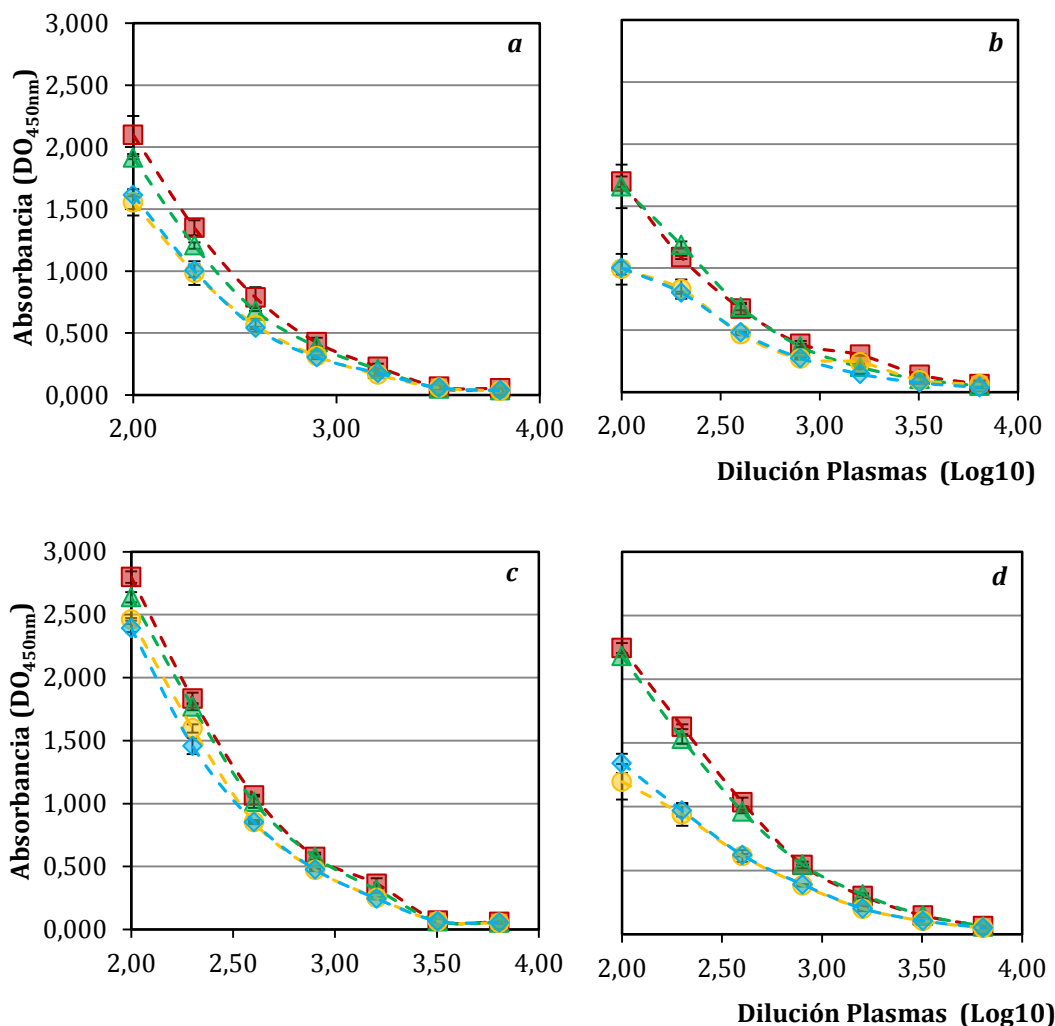


Figura 37. Absorbancias (DO_{450nm}) en ELISA Directo para las condiciones de bloqueante y de conjugado anti-IgE, respectivamente: OVO y 1/8000 (a); BSA y 1/8000 (b); OVO y 1/4000 (c); BSA y 1/4000 (d). Para cada ELISA los sueros de pacientes incubados y el tapizado de β -Lg fueron respectivamente: plasma 44 y tapizado 1 μ g/mL (-■-); plasma 44 y tapizado 0,5 μ g/mL (-▲-); plasma L1 y tapizado 1 μ g/mL (-○-); plasma L1 y tapizado 0,5 μ g/mL (-◇-) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

Una vez determinadas las condiciones de ensayo para el trabajo por técnicas inmunoenzimáticas tipo ELISA con los *plasmas L1 y 44*, se evaluaron el resto de plasmas (*L2, 39, 41, 42 y 43*). Así, se realizaron diluciones seriadas de los plasmas desde 1/200 (Log₁₀: 2,30) hasta 1/3200 (Log₁₀: 3,50). El objetivo de este ensayo fue determinar la dilución óptima de cada plasma para pasar a la siguiente fase del estudio, es decir al desarrollo del ELISA

competitivo indirecto (ciELISA) con plasmas de pacientes. El resultado se muestra en la **Figura 38**.

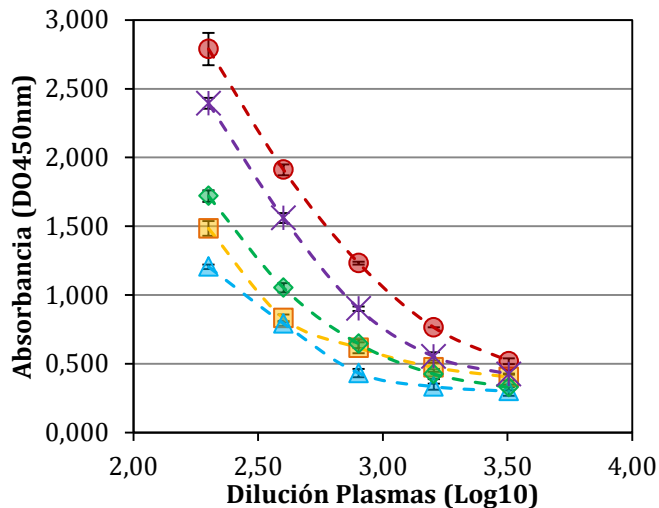


Figura 38. Absorbancias (DO_{450nm}) en ELISA directo tapizado con 0,5 µg/mL de β-Lg, bloqueado con OVO (1,5%), incubación de sueros de pacientes APLV: plasma L2 (□), plasma 39 (▲), plasma 41 (●), plasma 42 (◆), plasma 43 (✱), y anti-IgE 1/4000 (○). Las barras de error corresponden a la desviación estándar

De forma general en la **Figura 38** correspondiente a un ELISA directo con diluciones seriadas de los plasmas de pacientes APLV, se aprecia que para todos ellos, según fue aumentando la dilución, la absorbancia (DO_{450nm}) disminuyó significativamente. A altas diluciones, por lo tanto, podría no permitirse una adecuada cuantificación de la concentración de β-Lg en el método competitivo, debido a que con bajas absorbancias en el control, no se permitiría observar diferencias entre las absorbancias de las muestras. A la vista de los resultados, para proceder con el estudio de confirmación en ciELISA con β-Lg nativa se seleccionaron las diluciones de antisueros más concentradas, correspondientes a 1/200 (Log10: 2,30) y 1/400 (Log10: 2,60).

7.2.3. ELISA competitivo para Muestras No Procesadas

Una vez establecido por ELISA directo el rango de diluciones de los plasmas de pacientes a estudiar a continuación, en los siguientes ensayos tipo ELISA competitivo indirecto (ciELISA) se acabó de determinar la dilución más apropiada para cada uno de ellos. Las diluciones a estudiar en ciELISA para cada plasma están descritas en la **Tabla 6**. Como se puede observar, además, se procedió a trabajar con una dilución más concentrada que las estudiadas anteriormente (**Figura 38**) para los *plasmas L2, 39 y 42*, concretamente a 1/100 (Log10: 2,00), por las bajas absorbancias obtenidas a diluciones más altas.

Según la **Tabla 3**, el **plasma 43** que presenta una alergenicidad específica hacia la β -Lg similar a los **plasmas 39** y **42**, podría requerir también una dilución más concentrada. Sin embargo, los niveles de IgE específica no están directamente relacionados con la inmunoreactividad y como se observa en la **Figura 38**, el **plasma 43** a 1/200 (Log10: 2,30) ofreció buena señal. Puede deberse a que también presenta alergenicidad hacia otras proteínas lácteas, dotándolo de un mayor carácter reactivo que los otros plasmas con la misma alergenicidad específica frente a la β -Lg, proporcionando así una señal más alta en la medida.

Tabla 6. Diluciones de plasma de pacientes a estudiar en ciELISA

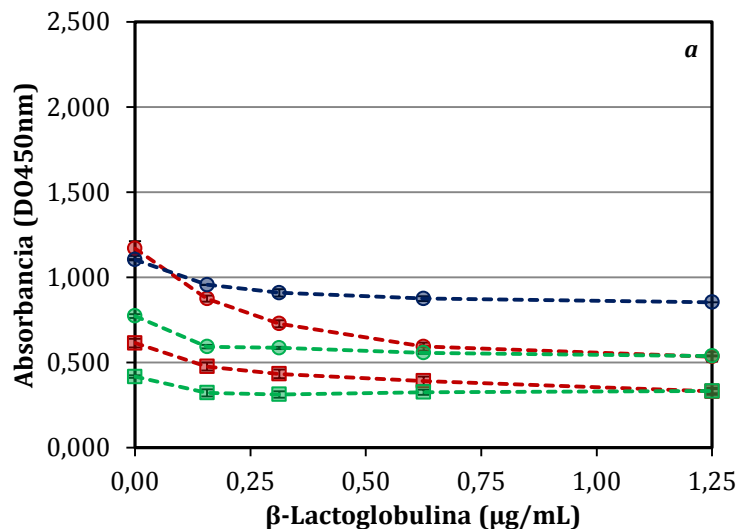
| | D 1/100 | D 1/200 | D 1/400 |
|-----------|---------|---------|---------|
| L1 | | ✓ | ✓ |
| L2 | ✓ | ✓ | |
| 39 | ✓ | | |
| 41 | | | ✓ |
| 42 | ✓ | ✓ | |
| 43 | | ✓ | ✓ |
| 44 | | ✓ | ✓ |

En una primera fase, se estudió la reactividad de los plasmas en el método competitivo frente a la proteína nativa (sin tratar) β -Lg purificada y, después, se procedió al estudio con lactosuero.

7.2.3.1. ELISA competitivo para β -Lactoglobulina purificada

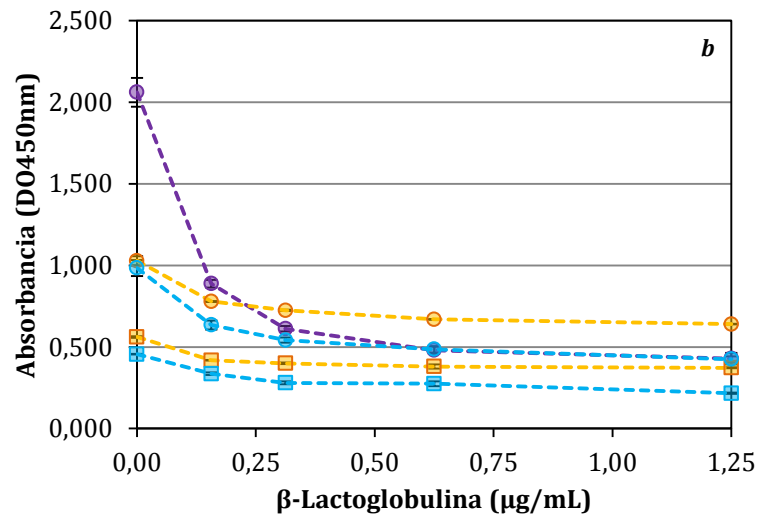
Para la β -Lg purificada, se emplearon diluciones seriadas en solución salina fisiológica (SSF) a pH 7,4 a concentraciones desde 1,25 hasta 0,15 μ g/mL, lo cual permitió conocer el rango de valores de β -Lg donde la relación entre la concentración de β -Lg y la absorbancia (DO_{450nm}) era cuantificable y proporcional (rango lineal) para cada tipo de plasma. Los resultados se muestran por separado para su mejor visualización, **Figura 39** y **Figura 40**.

Como se observa en las **Figuras 39** y **40**, el **plasma 41** (**Figura 40**) destacó frente al resto en su capacidad de competición por el antígeno a distintas concentraciones de β -Lg. La diferencia de absorbancia en ausencia y a la máxima concentración de antígeno estudiada fue de 1,633. En segundo lugar, el **plasma L1** (**Figura 39**), cuya alergenicidad específica hacia la β -Lg es desconocida, presentó una diferencia entre los valores máximos y mínimos de absorbancia de 0,635 a una dilución 1/200. Después, el **plasma 44** (**Figura 40** a 1/200) comprendió valores de absorbancia en un rango de diferencia de 0,559. Para el resto de plasmas (**Figuras 39** y **40**), independientemente de su grado de dilución, la diferencia entre el valor máximo y mínimo de absorbancia no supera el 0,500, reflejando todos ellos una unión al antígeno de la placa (tapizado) muy similar para las distintas diluciones, independientemente de la concentración de β -Lg del medio.



| β -Lg ($\mu\text{g/mL}$) | L1 - 1/200 | L1 - 1/400 | L2 - 1/100 | L2 - 1/200 | 39 - 1/100 |
|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0 | 1,170 \pm 0,04 | 0,614 \pm 0,02 | 0,774 \pm 0,01 | 0,417 \pm 0,00 | 1,104 \pm 0,00 |
| 0,156 | 0,875 \pm 0,01 | 0,477 \pm 0,02 | 0,593 \pm 0,01 | 0,322 \pm 0,02 | 0,957 \pm 0,00 |
| 0,313 | 0,728 \pm 0,02 | 0,433 \pm 0,02 | 0,587 \pm 0,00 | 0,313 \pm 0,01 | 0,910 \pm 0,02 |
| 0,625 | 0,594 \pm 0,02 | 0,392 \pm 0,02 | 0,558 \pm 0,00 | 0,326 \pm 0,01 | 0,876 \pm 0,01 |
| 1,25 | 0,535 \pm 0,02 | 0,331 \pm 0,02 | 0,539 \pm 0,00 | 0,332 \pm 0,01 | 0,854 \pm 0,00 |

Figura 39. Absorbancias ($\text{DO}_{450\text{nm}}$) resultado de la afinidad en ELISA competitivo para distintas concentraciones de β -Lactoglobulina purificada en SSF pH 7,4 con los plasmas sanguíneos de pacientes APLV: plasma L1 - 1/200 (---●---), plasma L1 - 1/400 (---■---), plasma L2 - 1/100 (---●---), plasma L2 - 1/200 (---■---), plasma 39 - 1/100 (---●---) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar



| β -Lg ($\mu\text{g/mL}$) | 41 - 1/400 | 43 - 1/200 | 43 - 1/400 | 44 - 1/200 | 44 - 1/400 |
|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0 | 2,062 \pm 0,08 | 1,028 \pm 0,02 | 0,561 \pm 0,00 | 0,984 \pm 0,05 | 0,456 \pm 0,00 |
| 0,156 | 0,888 \pm 0,02 | 0,779 \pm 0,00 | 0,418 \pm 0,00 | 0,635 \pm 0,02 | 0,336 \pm 0,00 |
| 0,313 | 0,611 \pm 0,01 | 0,725 \pm 0,00 | 0,399 \pm 0,00 | 0,542 \pm 0,01 | 0,280 \pm 0,00 |
| 0,625 | 0,480 \pm 0,02 | 0,669 \pm 0,00 | 0,380 \pm 0,01 | 0,485 \pm 0,01 | 0,275 \pm 0,01 |
| 1,25 | 0,429 \pm 0,03 | 0,640 \pm 0,00 | 0,372 \pm 0,00 | 0,425 \pm 0,01 | 0,216 \pm 0,00 |

Figura 40. Absorbancias ($\text{DO}_{450\text{nm}}$) resultado de la afinidad en ELISA competitivo para distintas concentraciones de β -Lactoglobulina purificada en SSF pH 7,4 con los plasmas sanguíneos de pacientes APLV: plasma 41 - 1/400 (---●---), plasma 43 - 1/200 (---●---), plasma 43 - 1/400 (---■---), plasma 44 - 1/200 (---●---), plasma 44 - 1/400 (---■---) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

En esta etapa, ajustar la cantidad de plasma resultó más complicado que para las IgE recombinantes ya que los plasmas de pacientes alérgicos pueden presentar distintos anticuerpos con diferentes zonas de unión con el antígeno. Debido a que se desconocen los sitios de reconocimiento a la β -Lg por parte de los anticuerpos presentes en los plasmas, era probable que la efectividad del método (y por lo tanto, las concentraciones de cada suero para el mismo análisis) difiriese en relación a los trabajos con IgEr que al ser monoclonal y unirse en tan solo un punto a la proteína diana, es más fácilmente estandarizable. Además, tal y como se describe la **Tabla 3**, no todos estos sueros son específicos exclusivamente de la β -Lg por lo que su especificidad alérgica hacia otras proteínas de la leche puede interferir en futuros resultados (con lactosuero completo).

En cualquier caso, en las **Figuras 39 y 40** se aprecia que para cada plasma sanguíneo estudiado, a menor dilución, es decir, a muestra de plasma más concentrada, mejor resultado. Probablemente muestras de plasma aún más concentradas hubieran ofrecido una mayor señal en los resultados. Sin embargo, debido a la disponibilidad de los plasmas (poco volumen por tratarse de pacientes pediátricos), esto no fue posible. De hecho, al comienzo del estudio se trabajó con todos los plasmas indicados en la **Tabla 3**, pero llegados a este punto no se pudieron realizar las pruebas con el **plasma 42**. Tampoco se logró llegar hasta el final de la investigación con el **plasma 43** por no disponer de cantidad suficiente para realizar toda la experimentación. En el momento de recepción de los plasmas sanguíneos se recogieron distintos volúmenes de cada plasma, y como puede verse cada uno de ellos exige diluciones más o menos concentradas para una correcta lectura en placa. Por tanto, si un plasma del que se dispone una cantidad reducida requiere una alta concentración para obtener datos fiables, resulta muy complicada su utilización ya que difícilmente se podrán realizar duplicados o repeticiones, y es lo que ocurrió en estos dos casos.

Una vez estudiadas las condiciones óptimas a emplear en el ciELISA para muestras de β -Lg purificada con plasmas de pacientes APLV, y en vista a los resultados de las **Figura 39 y 40**, se estableció 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de β -Lg purificada como concentración teórica de estudio para ensayos inmunoenzimáticos de competición en placa en los siguientes ensayos. A continuación, se procedió a determinar los mismos parámetros para productos derivados lácteos.

7.2.3.2. ELISA competitivo indirecto para lactosuero

Se procedió a evaluar los parámetros de análisis en ciELISA con plasmas de pacientes APLV para dos tipos de lactosueros, un lactosuero ácido obtenido por reducción del pH de la leche con HCl 4M hasta alcanzar un valor de pH 4,6, y un lactosuero industrial de quesería que presentó un pH 6,8. Atendiendo a los resultados previos y a la disponibilidad de los plasmas, primeramente se ensayaron el **plasma L1** en una dilución 1/200 y el **plasma 41** en 1/400. Los resultados se muestran en la **Figura 41** y la gráfica representa las absorbancias obtenidas en el ELISA competitivo entre la β -Lg

purificada que tapiza la placa frente a la β -Lg presente en los lactosueros, que se diluyeron desde una dilución 1/1600 (1,25 $\mu\text{g/mL}$ β -Lg, teóricamente) hasta 1/25600 (0,078 $\mu\text{g/mL}$ β -Lg teórica). La concentración de proteína en el lactosuero fue previamente analizada por el método Bradford (datos no mostrados). A dilución "0" no hay presencia de lactosuero, es decir, corresponde al control exclusivamente de plasma, por lo que al no haber competición, todas las IgE disponibles se unen a la β -Lg de la placa ofreciendo, por lo tanto, el mayor valor de absorbancia. Con diluciones de lactosuero más concentradas a la 1/1600 (1,25 $\mu\text{g/mL}$ β -Lg), no se observaron cambios en la medida de absorbancia ($\text{DO}_{450\text{nm}}$) con respecto a las muestras control (datos no mostrados) y por lo tanto, dichas concentraciones mayores de proteína en la muestra se descartaron en futuros análisis, quedándonos con el rango de concentración teórica citado anteriormente.

Según muestra la **Figura 41**, para ambos lactosueros el **plasma 41** mostró una gran especificidad de unión hacia la β -Lg con una alta capacidad de reconocimiento destacada en la muestra control (sólo plasma, sin alérgeno en competición) donde se unió a la β -Lg tapizada en la placa dando valores de absorbancia mayores a la unidad ($\text{DO}_{450\text{nm}} > 1$); valor no alcanzado con el **plasma L1**. Además, las curvas del **plasma 41** con los lactosueros se asemejaron a la curva obtenida para aislado de β -Lg (**Figura 40**). De la misma manera, el **plasma L1** también siguió una tendencia similar en ambos lactosueros, a pesar de que prácticamente presentó una asíntota para las diluciones estudiadas, sin apenas apreciarse el codo de la curva.

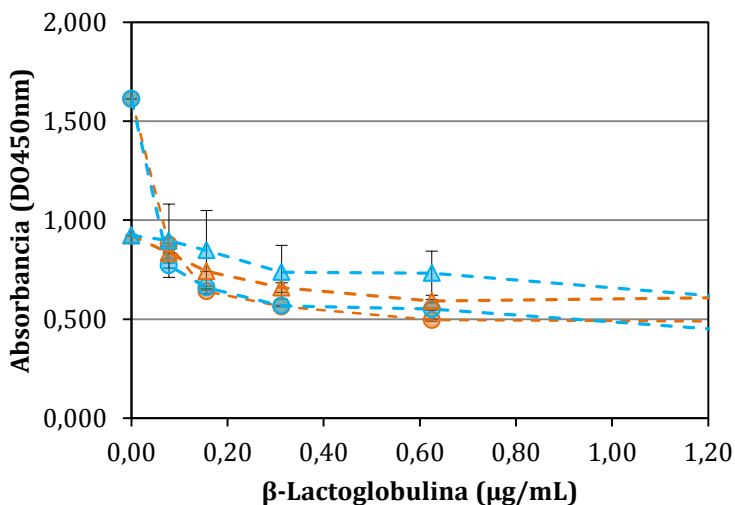


Figura 41. Absorbancias ($\text{DO}_{450\text{nm}}$) resultado de la afinidad en ELISA competitivo de diluciones seriadas de dos tipos de lactosuero con plasmas de pacientes APLV. El lactosuero ácido a pH 4,6 con plasma L1 (-▲-) y con el plasma 41 (-○-); y el lactosuero industrial a pH 6,8 con el plasma L1 (-▲-) y con el plasma 41 (-○-) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

Según los datos cedidos sobre la especificidad de los plasmas de los pacientes APLV (**Tabla 3**), el **plasma 41** no solo era específico de β -Lg (9,89 kU_A/L), sino también de caseínas (0,45 kU_A/L) -a pesar de que éstas no debieran estar presentes en el lactosuero-, y de α -Lactoalbúmina (α -La) (2,93 kU_A/L), lo cual no pareció influir en el reconocimiento de la β -Lg en placa. Tampoco el hecho de que no alcanzase los 17 kU_A/L establecidos en el estudio de [Sampson \(2001\)](#) como nivel de diagnóstico de IgE específica que predeciría una reactividad clínica. Por tanto, queda evidente que no siempre existe una relación directa entre la cantidad de IgE específica y la inmunoreactividad frente al antígeno. En este aspecto, no se pudo realizar valoración para el **plasma L1 al** carecer de los datos de especificidad alérgica.

En este ciELISA no se observaron diferencias en los resultados en función del tipo del lactosuero, sino que los factores que tuvieron más impacto en la evolución de las absorbancias (DO_{450nm}) fueron el tipo de plasma y la concentración de β -Lg en dilución en la fase de competición.

A la vista de estos resultados y puesto que no se apreciaron diferencias en relación al lactosuero a estudiar, para futuros ensayos se decidió trabajar en la misma dilución con ambos lactosueros. Según muestra la **Figura 41**, la mayor diferencia de unión antígeno-anticuerpo en el ciELISA en función de la concentración de proteína se dio entre 0,078 μ g/mL y 0,313 μ g/mL, correspondientes a las diluciones 1/25600 y 1/6400, respectivamente. Por tanto, se seleccionó el valor intermedio, 0,156 μ g/mL representado por una dilución de los lactosueros de 1/12800.

7.2.4. ELISA Competitivo para Muestras Procesadas por Pulsos de Luz

Los resultados presentados hasta ahora mostraron que la metodología desarrollada en esta tesis en el **Capítulo 4** también podría ser adecuada para trabajar con antisueros de pacientes en vez de con IgE recombinante. Una vez definidas las condiciones específicas para trabajar con diferentes tipos de plasmas, así como la caracterización de éstos, se procedió a evaluar la influencia de los pulsos de luz en el reconocimiento de la β -Lactoglobulina (β -Lg) por parte de los anticuerpos de los plasmas de pacientes APLV.

Para este fin, se procesaron a diferentes intensidades de luz pulsada, desde 3,85 J/cm² hasta 15,95 J/cm², muestras de β -Lg purificada en tampón acetato a pH 4,6 y en tampón fosfato a pH 6,8, y desde 2,8 J/cm² hasta 11,6 J/cm² para lactosuero obtenido por acidificación a pH 4,6 y lactosuero industrial de quesería a pH 6,4.

La capacidad de inhibición de la tecnología de pulsos de luz en la unión de la β -Lg con los anticuerpos de plasmas sanguíneos de diferentes pacientes APLV se estudió primeramente utilizando los plasmas de forma individual para conocer el comportamiento de cada uno de ellos y, después, se preparó una mezcla de plasmas

(pool), tal y como se trabaja en diferentes estudios clínico-científicos (Chung *et al.*, 2008).

7.2.4.1. Impacto de los pulsos de luz en la unión entre β -Lactoglobulina purificada y los anticuerpos de pacientes APLV

Atendiendo a los resultados obtenidos en la etapa previa de ciELISA para β -Lg purificada, así como a la disponibilidad de cada plasma, para el estudio del impacto de la tecnología de pulsos de luz en la afinidad entre la β -Lg y los anticuerpos de pacientes APLV se establecieron las siguientes condiciones de ensayo: tapizado con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ β -Lg; bloqueo con ovoalbúmina (OVO) al 1,5 %; competición con 0,15 $\mu\text{g/mL}$ de β -Lg purificada (nativa – control-, o muestra procesada) a diluciones plasmáticas 1/100 para los **plasmas L2 y 39**, 1/200 para los **plasmas L1, 43 y 44**, y 1/400 para el **plasma 41**; y conjugado anti-human Kappa-HPR (Southern) 1/4000.

En la **Figura 42** se muestra el impacto de diferentes intensidades de pulsos de luz sobre la inmunoreactividad de la β -Lg purificada con los plasmas de pacientes APLV. Puesto que de partida, todas las muestras presentaban la misma concentración de β -Lg, los resultados son expresados como porcentaje de inhibición en la unión de β -Lg tratada con pulsos de luz y los anticuerpos de los plasmas, respecto a la proteína sin tratar.

Como se observa en la **Figura 42**, en los **plasmas L1 y 44** se produjo una ligera disminución de la inhibición a una fluencia de tratamiento de 3,85 J/cm^2 , es decir, aumentó la unión antígeno-anticuerpo, y se mantuvo constante a intensidades mayores de tratamiento para ambos medios de dilución de la β -Lg, sin diferencias en función del pH. Efecto similar se produjo para el **plasma L2** a 3,85 J/cm^2 y 8,25 J/cm^2 con un descenso en la inhibición del 13% y desviación estándar (de) de 6,3, pero en este caso a fluencias mayores aumentó la inhibición alcanzando de nuevo el 0% (de: 7,63) para β -Lg a pH 6,8, como la proteína sin procesar; mientras que a pH 4,6 aumentó la reactividad entre la β -Lg y los anticuerpos del plasma para todas las fluencias con un valor medio del 23% (de: 10,59). El efecto más acusado en la inmunoreactividad de la β -Lg se observó con el **plasma 39**, para el que se produjo una reducción progresiva de la inhibición (aumento del reconocimiento del antígeno) con la proteína procesada por pulsos de luz a medida que la intensidad de tratamiento fue mayor, hasta alcanzar el 71% (de: 5,13) a 12,10 J/cm^2 para el pH 6,8 y finalmente hubo un ligero aumento de la inhibición a la máxima fluencia estudiada, 15,95 J/cm^2 ; a pH 4,6 la inhibición decreció un 48% (de: 0,58) respecto a la proteína sin procesar a 8,25 J/cm^2 y se mantuvo relativamente constante a tratamientos más intensos. Al contrario que para estos plasmas, en los que la unión antígeno-anticuerpo se vio modificada en mayor o menor medida en función de la intensidad de pulsos de luz aplicada sobre la proteína y del pH del medio, para el **plasma 41** no se produjeron alteraciones en la inmunoreactividad con la proteína procesada independientemente del tratamiento o del medio.

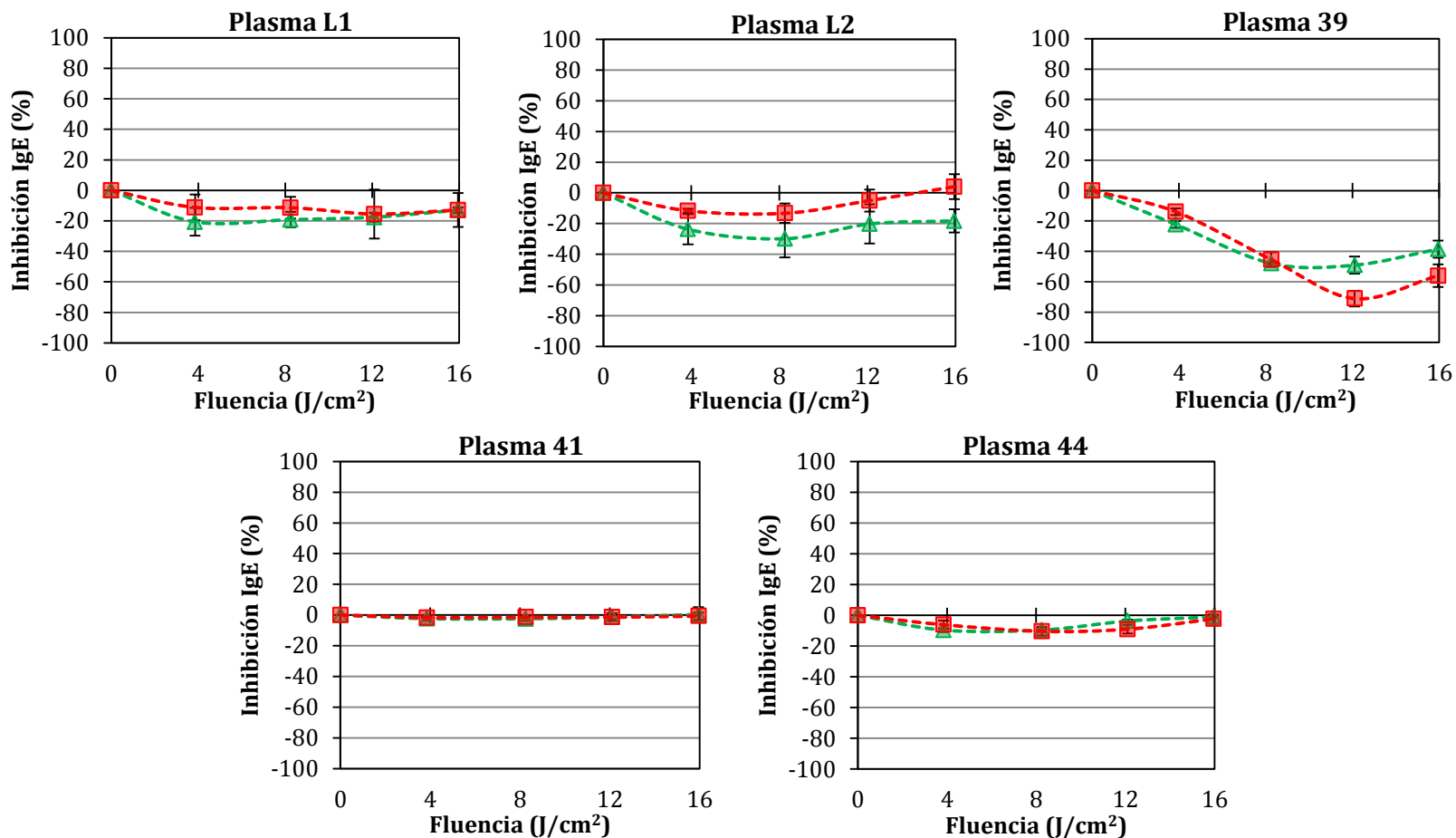


Figura 42. Impacto de los pulsos de luz sobre la inmunoreactividad de la β -Lg en tampón acetato a pH 4,6 ($\text{---}\blacktriangle\text{---}$) y en tampón fosfato a pH 6,8 ($\text{---}\blacksquare\text{---}$) frente a plasmas sanguíneos de pacientes APLV - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

El efecto observado de los pulsos de luz en la inmunoreactividad de la β -Lg purificada cuando se emplean anticuerpos de plasmas de pacientes APLV, llegó a ser nulo, mínimo o contrario al puesto en evidencia con las IgEr. Esta diferencia en los resultados se podría explicar por el hecho que, como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos presentes en los plasmas sanguíneos de pacientes APLV son policlonales. Es decir, habitualmente presentan varias zonas de unión con el antígeno (β -Lg), mientras que la IgEr es específica de una zona de reconocimiento concreta. Los pulsos de luz pueden, por tanto, provocar una modificación de la proteína tal que el epítipo de reconocimiento de la IgEr fuese destruido y por lo tanto, no reconocido por los anticuerpos recombinantes, mientras que, en el caso de múltiples puntos de reconocimiento (utilización de sueros), las modificaciones estructurales inducidas por pulsos de luz, no son suficientes para eliminar todos los puntos de reconocimiento, e incluso, en algunos casos (aumento del reconocimiento), éstos se hacen más accesibles para los anticuerpos o se generan nuevas zonas de reconocimiento. Más concretamente, los pulsos de luz podrían hacer que por un lado, los epítopos conformacionales de reconocimiento se vean destruidos (epítipo reconocido por la IgEr, [Jylhä et al., 2009](#)), pero que otros epítopos lineales que en la forma nativa estaban ocultos en el interior de la proteína, tras el tratamiento por pulsos de luz, queden expuestos en el exterior y por lo tanto, sean más fácilmente reconocidos por los anticuerpos presentes en algunos de los plasmas sanguíneos de los pacientes APLV estudiados. Así mismo, esta diferencia en el comportamiento de los anticuerpos de los plasmas sanguíneos con respecto a la IgEr podría ser debido a la generación de nuevos epítopos conformacionales resultantes de los cambios estructurales. Estas hipótesis deberían refrendarse en trabajos futuros más enfocados a conocer la estructura de las moléculas implicadas y la interacción entre ellas.

Además del cambio en la inmunoreactividad de la β -Lg purificada cuando ésta se expuso a diferentes fluencias, en el **Capítulo 5** se pudo observar que la inmunoreactividad entre las IgEr y la β -Lg también se vio afectada (**Figura 24**) por el tratamiento del lactosuero con pulsos de luz. A la vista de los diferentes resultados en función del anticuerpo empleado, a continuación, se procedió a estudiar la reactividad de los plasmas de pacientes APLV con lactosuero procesado bajo pulsos de luz.

7.2.4.2. Impacto de los pulsos de luz en la afinidad entre la β -Lactoglobulina del lactosuero y los anticuerpos de pacientes APLV

A la vista de los resultados obtenidos en el **apartado 7.2.3.2.** referente a la optimización del ciELISA para lactosuero con plasmas de pacientes APLV, en los siguientes ensayos inmunoenzimáticos con lactosuero tratado bajo pulsos de luz, se empleó una dilución 1/12800 de ambos tipos de lactosuero, lactosuero ácido a pH 4,6 obtenido por la reducción del pH de leche, y lactosuero industrial a pH 6,8.

El resultado en la inmunoreactividad de los lactosueros tratados por pulsos de luz frente a plasmas de pacientes APLV se muestra en la **Figura 43**. Dado que todos los lactosueros (no tratados y tratados) tenían la misma concentración de proteína, los resultados son expresados como el porcentaje de inhibición en la unión entre la β -Lg del lactosiero tratado con pulsos de luz y los anticuerpos de los plasmas, respecto al lactosiero sin procesar.

En la **Figura 43** se observa, de forma similar a lo que ocurría con la β -Lg aislada, que el tratamiento por pulsos de luz de los lactosueros produjo un descenso en la inhibición con los anticuerpos del **plasma L1**, esto es, un aumento de la reactividad debido a un mayor reconocimiento por parte de las IgE del paciente APLV hacia la β -Lg de ambos tipos de lactosiero. En el caso del lactosiero a pH 4,6 la inhibición descendió hasta los 6 J/cm² de fluencia donde alcanzó la asíntota; y para el lactosiero pH 6,8 la asíntota se mantuvo desde una fluencia de 2,8 J/cm² hasta la máxima estudiada, 11,6 J/cm². Para el **plasma L2** también se produjo un descenso de la inhibición del lactosiero pH 4,6 a 2,8 J/cm² y a 6 J/cm², pero fue aumentando a medida que aumentaba la fluencia aplicada hasta alcanzar el valor de la muestra nativa (sin procesar) bajo el máximo tratamiento aplicado, 11,6 J/cm². Sin embargo, con el lactosiero pH 6,8, el procesado de pulsos de luz no produjo alteraciones en su reconocimiento por parte del **plasma L2**. Se observó una disminución mayor de la inhibición con el **plasma 39** para el que, al igual que lo ocurrido con β -Lg purificada, la inmunoreactividad con ambos lactosueros aumentó de manera considerable hasta la fluencia de 6 J/cm² donde alcanzó la asíntota con valores cercanos al 50% hasta los 11,6 J/cm² de tratamiento. Por su parte, el **plasma 41** no ofreció cambios en el reconocimiento de la β -Lg presente en los lactosueros, independientemente de la fluencia aplicada, al igual que lo observado anteriormente con la β -Lg purificada (**Figura 42**). Finalmente, el **plasma 44** ofreció respuestas diferentes en función del lactosiero. Para el lactosiero pH 4,6 descendió ligeramente la inhibición manteniéndose en un rango de valores entre el -12,84% (de: 1,69) y el -19,20% (de: 1,43) para todas las intensidades de tratamiento aplicadas; mientras que para el lactosiero pH 6,8 aumentó ligeramente la inhibición manteniéndose en un 8,5% a 2,8 J/cm² y 6 J/cm², descendió ligeramente a 8,8 J/cm² alcanzando finalmente una inhibición del -3,62% (de: 2,69) bajo 11,6 J/cm².

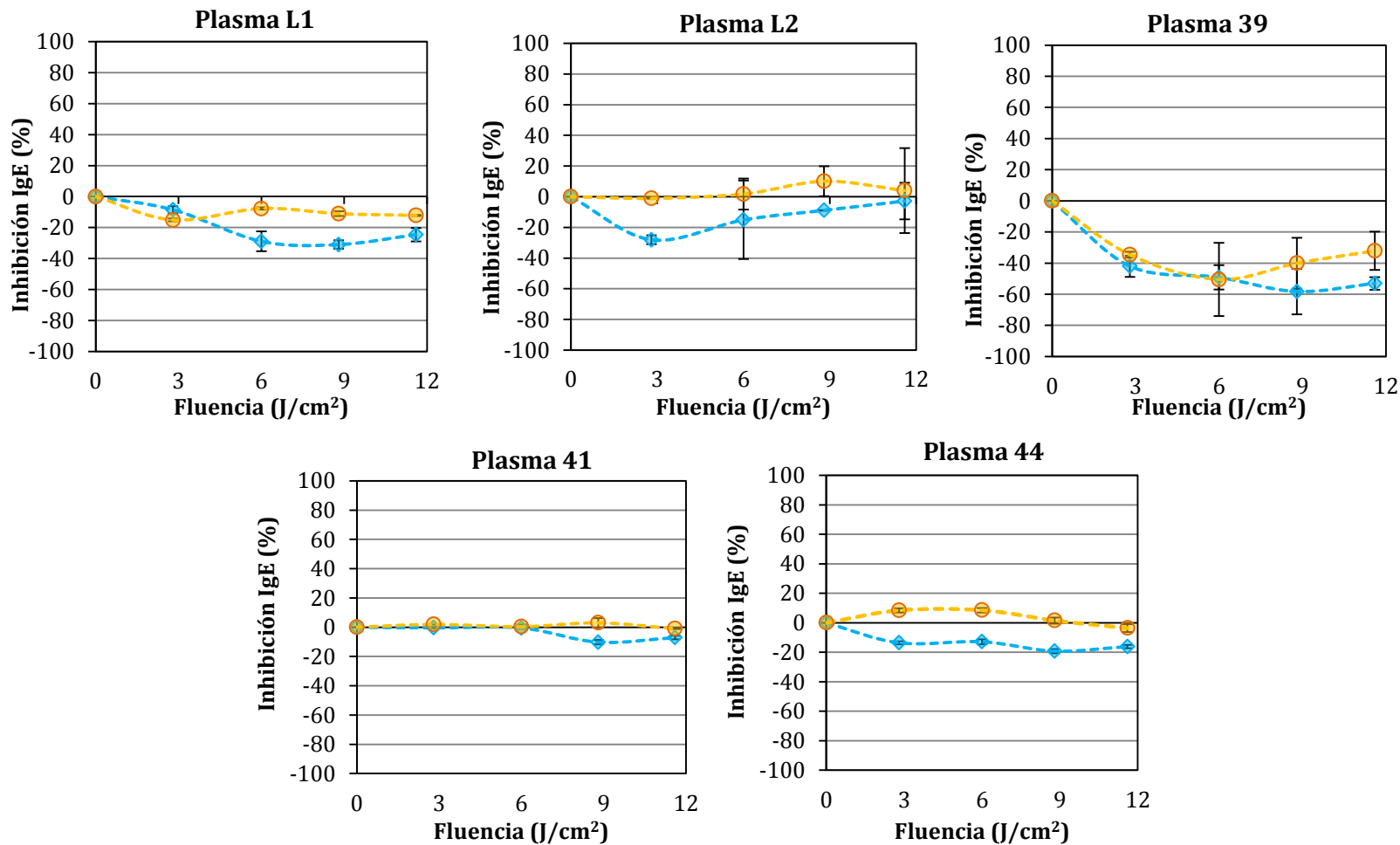


Figura 43. Impacto de los pulsos de luz sobre la inmunoreactividad de la β -Lg de lactosuero ácido a pH 4,6 (---◇---) y lactosuero industrial a pH 6,8 (---○---) frente a plasmas sanguíneos de pacientes APLV - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

El comportamiento observado en la afinidad antígeno-anticuerpo para los lactosueros procesados por pulsos de luz fue muy similar al obtenido en el apartado anterior con β -Lg purificada. Es decir, no se logró un aumento relevante de la inhibición, sino que por el contrario, tan sólo aumentó ligeramente en condiciones muy concretas. La tendencia general fue hacia una mayor reactividad entre los lactosueros y los anticuerpos de los pacientes APLV, en especial con el **plasma 39**. El **plasma 41** fue la excepción, ya que no manifestó alteraciones en el reconocimiento de la muestra procesada, tanto con lactosuero como con la β -Lg purificada. Este plasma presentaba una especificidad alta hacia la β -Lg, 9,89 kU_A/L, al menos superior al **plasma 39** (5,84 kU_A/L) el cual ofreció un aumento significativo en el reconocimiento de las muestras procesadas (**Figura 42** y **Figura 43**), a pesar de que ninguno superaba el umbral establecido por Sampson (2001) de 17 kU_A/L para proteínas de leche de vaca por encima del cual se predeciría una reactividad clínica, poniendo de manifiesto la dificultad en la predicción del desencadenamiento de una hipersensibilidad en función de la cantidad de IgE específica en el plasma sanguíneo.

La respuesta de los anticuerpos humanos ante muestras de lactosuero procesadas por pulsos de luz, al igual que lo observado con β -Lg purificada, resultó muy característica de cada paciente APLV y fue diferente a la observada con las IgEr (**Figura 24**) donde aumentaba la inhibición. Debido a que los plasmas de los pacientes APLV presentan especificidad hacia otras proteínas lácteas presentes en los lactosueros con similitud estructural entre ellas, se podrían haber esperado respuestas no tan similares a las obtenidas con β -Lg purificada. Incluso en otros trabajos se han sugerido algunas reacciones cruzadas entre la α -La y la β -Lg (Adams *et al.*, 1991). Por tanto, esta especificidad hacia la β -Lg mediante el ciELISA desarrollado confirmaría de nuevo la aplicabilidad de la metodología de análisis empleada en el reconocimiento de la β -Lg al no verse influenciada de forma relevante por la presencia de otros compuestos en el lactosuero. Tampoco se produjo una diferenciación de resultados en función de la alergenicidad específica (kU_A/L) de cada plasma hacia la β -Lg. Esto confirmaría estudios previos que indican que la presencia de IgE específica no está directamente relacionada con la alergenicidad hacia un alimento (Poulsen *et al.*, 2006).

Algunos estudios llevan a cabo análisis de inmunoreactividad empleando mezclas de plasmas de pacientes en lugar de estudiar cada caso de forma individualizada (Chung *et al.*, 2008; Shriver *et al.*, 2011; Meinschmidt *et al.*, 2016), a pesar de que pueden dar lugar a diferencias en los resultados por reacciones cruzadas entre los sueros (Ehn *et al.*, 2005). Las mezclas de plasma, cuando se fusionan en cantidades iguales contienen mezclas heterogéneas de anticuerpos de diversos isotipos y especificidades alérgicas. Mientras el objetivo de este procedimiento suele ser obtener la máxima heterogeneidad de IgE de manera que la mezcla mimetice la respuesta inmunitaria humoral de la población general alérgica, en la práctica se obtiene el efecto opuesto. La mezcla de

muchos plasmas tiende a concentrar las especificidades de IgE más comunes y diluir las especificidades de IgE menores. Dado que el empleo de un plasma individual puede sobreexpresar reactividades menores idiosincráticas y una mezcla plasmas diferentes diluye las especificidades menores, lo ideal será usar tanto plasmas individuales como mezclas de plasmas para demostrar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de cualquier ensayo. Por ello, para comprobar y conocer la magnitud de estas interferencias, se llevó a cabo un último ensayo inmunoenzimático con un pool plasmático para muestras de β -Lg procesadas bajo pulsos de luz.

7.2.4.3. Impacto de los pulsos de luz en la alergenidad de la β -Lactoglobulina frente a una mezcla plasmática de pacientes APLV

En este apartado se estudió el impacto de los pulsos de luz en la inmunoreactividad de la β -Lg purificada en tampón acetato a pH 4,6 y en tampón fosfato a pH 6,8, y la β -Lg presente de forma natural en lactosuero ácido a pH 4,6 y en lactosuero industrial a pH 6,8 con una mezcla de plasmas de pacientes APLV. Frente a la indisponibilidad de todos los plasmas estudiados anteriormente, la mezcla se formuló a base de los *plasmas L1, L2 y 44*, respetando la proporción correspondiente a cada uno de ellos. Las variaciones en la inhibición de las muestras tratadas con pulsos de luz respecto a las muestras sin tratar se exponen en la **Figura 44**.

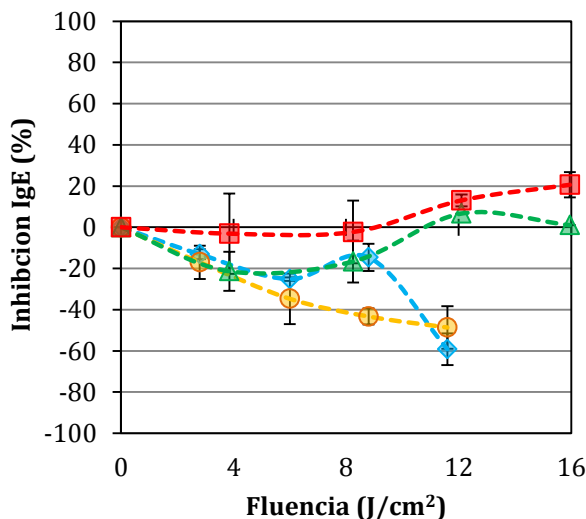


Figura 44. Impacto de distintas fluencias pulsos de luz, desde 3,85 J/cm² hasta 15,95 J/cm², en la inmunoreactividad de una mezcla de plasmas frente a la β -Lg: purificada en tampón acetato a pH 4,6 (---▲---), purificada en tampón fosfato a pH 6,8 (---■---), en lactosuero ácido a pH 4,6 (---◆---), y en lactosuero industrial a pH 6,4 (---○---) - Las barras de error corresponden a la desviación estándar

De nuevo se observa que las IgE de los antisueros de pacientes reaccionaron de diferente manera (aumentando su inmunoreactividad con los tratamientos de pulsos de luz) a las IgEr (reducción del reconocimiento), confirmando resultados anteriores.

Por otro lado, según se muestra en la **Figura 44**, la mezcla plasmática (*pool*) reaccionó reduciendo la inhibición (aumento de la unión) de los anticuerpos con la β -Lg purificada a pH 4,6 a valores de tratamiento de 3,85 J/cm² y 8,25 J/cm², pero la inhibición aumentó a fluencias mayores con una señal similar a la muestra nativa (sin procesar). Para la β -Lg purificada a pH 6,8 no se observaron cambios en la inhibición para los dos tratamientos menos intensos, y aumentó a fluencias mayores alcanzando el 20,61% (de: 6,16) de inhibición a la máxima fluencia estudiada, 15,95 J/cm², lo cual no se observó en el estudio unitario de los plasmas que componen esta mezcla (**Figura 42**). Para el lactosuero pH 4,6 se produjo una reducción casi progresiva de la inhibición (aumento de reconocimiento del alérgeno) con los anticuerpos a medida que la intensidad de tratamiento era mayor hasta llegar al 59,21% (de: 7,64) de unión a la máxima fluencia aplicada respecto a la muestra sin tratar, a pesar de que a 8,8 J/cm² sufrió una reducción de la afinidad (15%, de: 6,63). Del mismo modo, en el lactosuero pH 6,8 la inhibición antígeno-anticuerpo descendió de forma progresiva a medida que la intensidad de procesado aumentaba, hasta llegar al 48,66% (de: 10,38) de afinidad.

No se observaron grandes diferencias de afinidad entre las muestras de β -Lg purificada incubadas con los **plasmas L1, L2 y 44** de forma unitaria y con una mezcla conformada por dichos plasmas. Sin embargo, con los lactosueros sí se mostraron diferencias relevantes. Mientras que a fluencias medias-bajas el reconocimiento del lactosuero pH 4,6 por parte de la mezcla plasmática se mantuvo en los márgenes obtenidos con los **plasmas L1, L2 y 44** de forma individual (**Figura 43**), a la máxima intensidad estudiada el reconocimiento fue mucho mayor respecto a cualquier plasma. Del mismo modo para el lactosuero pH 6,8, se produjo un aumento de la reactividad con el *pool* de plasmas a todas las intensidades de tratamiento estudiadas, frente a los plasmas cuando fueron expuestos de manera individual, que apenas mostraron cambios en su reconocimiento en ninguno de los casos. Esta discrepancia en los resultados en función del modo de presentación de los plasmas en la experimentación también se observó en otros estudios ([Ehn et al., 2004](#); [Taheri-Kafrani et al., 2009](#); [Stanic-Vucinic et al., 2012](#)) donde encontraron que la β -Lg procesada térmicamente redujo la unión con las IgE de una mezcla de plasmas, pero no en los plasmas individuales.

Esto confirma que el empleo de mezclas plasmáticas puede alterar el resultado por reacciones cruzadas entre los plasmas ([Ehn et al., 2005](#)) y la importancia de llevar a cabo estudios de forma individualizada para ofrecer resultados reales.

7.3. Conclusión

En este capítulo se ha estudiado el impacto de la luz pulsada sobre la inmunoreactividad de la β -Lactoglobulina (β -Lg) frente a plasmas sanguíneos de pacientes alérgicos a las proteínas de la leche de vaca (APLV) mediante ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) competitivo indirecto (ciELISA).

Tanto en el estudio con β -Lg purificada como con la proteína presente de forma natural en el lactosuero, no se produjo un aumento de la inhibición como el que se obtuvo con las inmunoglobulinas (Ig) E recombinantes. Por el contrario, con los plasmas de pacientes APLV las uniones antígeno-anticuerpo aumentaron, incluso de manera considerable en determinadas condiciones, o bien se mantuvieron inalteradas. Estas diferencias pueden ser explicadas debido a los diferentes puntos de reconocimiento entre unas IgE y otras.

Esta gran variabilidad entre los puntos de reconocimiento de las diferentes IgE también explicaría por qué la respuesta frente a las muestras procesadas por pulsos de luz fue independiente y específica de cada plasma. Es decir, no se observó una relación directa entre las alteraciones generadas en la inmunoreactividad de la proteína por el tratamiento aplicado y el pH del medio o la intensidad del procesado en todos los casos. Tampoco se apreciaron grandes diferencias entre las distintas muestras de proteína estudiadas, β -Lg purificada y lactosuero, indicando que la presencia de otras proteínas en el medio no interfirió en el reconocimiento del antígeno gracias a la especificidad alérgica de los plasmas y a un adecuado desarrollo metodológico en ciELISA. Sin embargo, el factor determinante de la respuesta fue la capacidad de reconocimiento de cada plasma, dejando entrever la idiosincrasia de cada reacción alérgica (cada paciente reacciona de manera diferente) y la necesidad de estudios casi individualizados para el desarrollo de alimentos hipoalérgicos. Por otro lado, esta capacidad de reconocimiento de los plasmas no estaba ligada a su cantidad de anticuerpos específicos hacia la β -Lg (kU_A/L), puesto que las mayores diferencias en la señal, tanto en muestras sin procesar como para aquellas expuestas a pulsos de luz, fueron protagonizadas por plasmas con valores de especificidad medios-bajos, entre 5 y 10 kU_A/L ; mientras que aquel plasma con un valor considerado por otros autores umbral para predecir la reactividad clínica a proteínas de leche de vaca, 17 kU_A/L , no ofreció un alto reconocimiento del antígeno en ciELISA. Por tanto, la especificidad de los anticuerpos de cada paciente APLV resulta no ser un parámetro que permita predecir la respuesta inmunogénica, añadiendo dificultad a los estudios *in vitro* de la alergenidad cuando éstos se aplican en el estudio de la reducción de la misma en alimentos, haciendo entrever que serían necesarios estudios de provocación oral para llegar a resultados aplicables (más reales de la capacidad de los alimentos tratados de provocar una reacción alérgica en el paciente).

Otro factor importante a considerar en la elaboración de un plan metodológico analítico para la predicción de la respuesta inmunogénica es la presentación de los anticuerpos. En el estudio con los plasmas de forma unitaria se obtuvieron resultados no extrapolables al

empleo de una mezcla plasmática, probablemente a causa de la generación de reacciones cruzadas entre los anticuerpos de los distintos plasmas.

En resumen, hemos demostrado que los pulsos de luz son capaces de modificar la conformación estructural de la β -Lg, bien purificada bien presente en una matriz alimentaria compleja siempre que permita la incidencia de la luz, pudiendo alterar la unión antígeno-anticuerpo en función de los epítomos que queden expuestos al final del tratamiento y la capacidad de reconocimiento de los mismos por parte de cada anticuerpo. Sin embargo, a expensas de trabajos a realizar *in-vivo*, tras los resultados obtenidos en este trabajo, la tecnología de pulsos de luz, aunque podría utilizarse como una tecnología para mejorar la digestibilidad de la β -Lg, no parece adecuada para reducir la alergenicidad de la misma de forma directa.

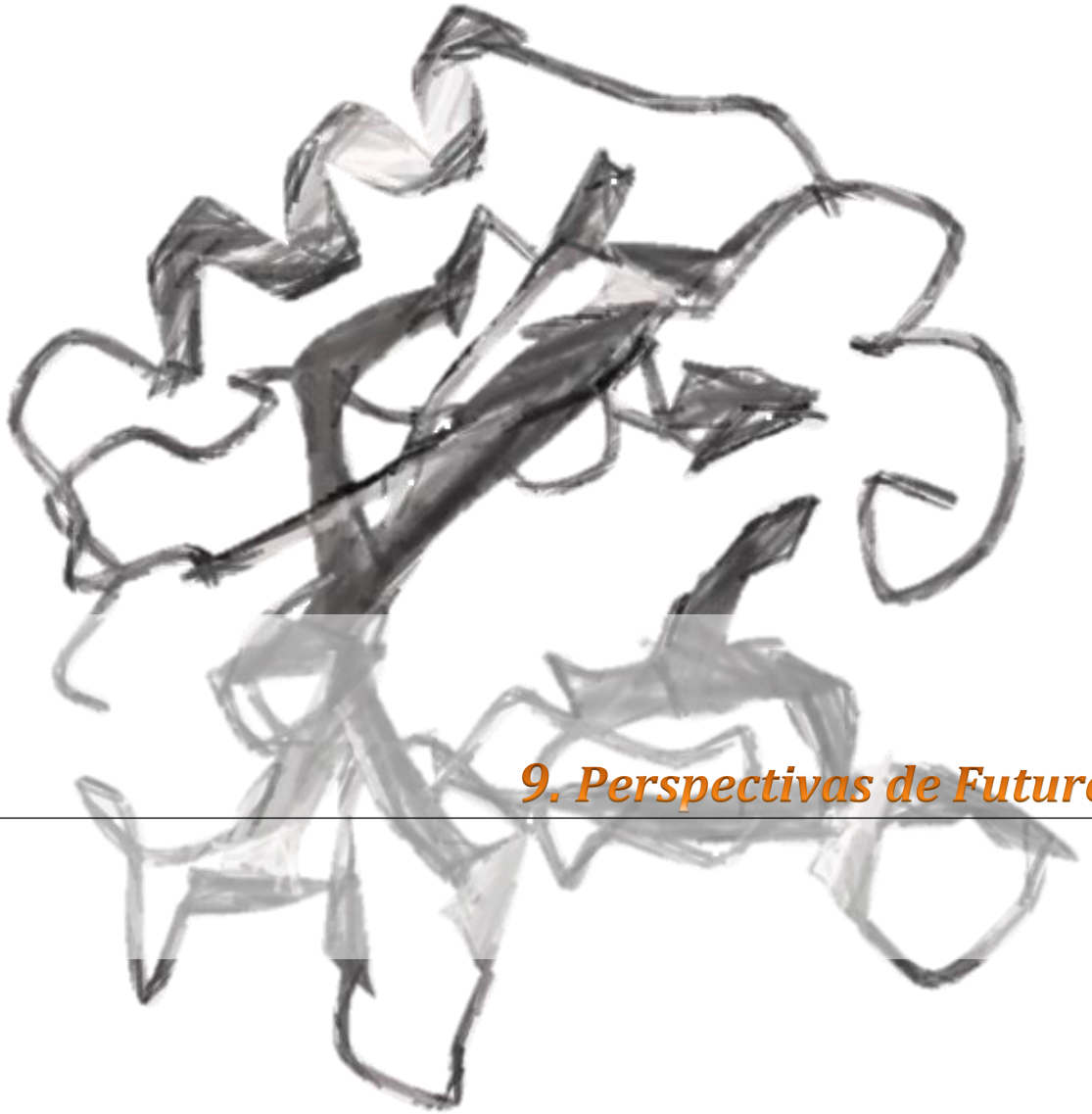


8. Conclusiones Generales

A continuación se recogen las principales conclusiones de esta Tesis Doctoral, que contribuyen a un mayor conocimiento sobre el efecto del procesado mediante tecnologías térmicas (tratamiento térmico “tradicional” y tratamiento térmico asistido por presión) y no-térmicas (luz pulsada y altas presiones hidrostáticas) en la inmunoreactividad de la β -Lactoglobulina (β -Lg):

- ✚ La técnica inmunoenzimática (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) competitivo indirecto (ciELISA) desarrollada, basada en inmunoglobulinas E recombinantes (IgEr), puede ser empleada como un nuevo método de detección de β -Lg que además permite identificar el potencial alergénico de la proteína.
- ✚ La IgEr, previamente identificada como válida para tratamientos térmicos, parece adecuada para ser empleada en ciELISA, independientemente de la matriz láctea (leche, lactosuero o proteína) analizada.
- ✚ La aplicación de altas presiones hidrostáticas provoca cambios estructurales en la β -Lg que dependen en mayor medida de la temperatura a la que se realiza el tratamiento. Si el procesado se desarrolla a temperatura ambiente, provoca ligeros cambios estructurales en la β -Lg con alteraciones mínimas en su potencial alergénico, mientras que si se lleva a cabo a temperaturas moderadas o altas las modificaciones estructurales son importantes conllevando reducciones significativas en la inmunoreactividad de la β -Lg frente a las IgEr.
- ✚ Los tratamientos térmicos asistidos por presión (TTAP) más intensos (500-600 MPa/115°C) provocan una reducción muy importante (aprox. 100%) de la inmunoreactividad de la β -Lg con los anticuerpos recombinantes. Esta pérdida tan importante de inmunoreactividad ocurre en tiempos de tratamiento muy cortos incluso a 0 y/o 1 minuto, en función del pH y la presión aplicada.
- ✚ La combinación simultánea de altas presiones con temperaturas moderadas o altas, es decir, la aplicación de tratamientos térmicos asistidos por presión (TTAP), presenta en general un efecto sinérgico de la presión y de la temperatura, provocando una reducción de la inmunoreactividad de la β -Lg con las IgEr superior a la generada por un procesado térmico equivalente en cuanto a temperatura y tiempo de tratamiento, o por un procesado de alta presión con un ciclo de presurización idéntico. Sin embargo, ciertos TTAP llevados a cabo a temperaturas más bajas pueden dar lugar a un efecto antagónico de la presión y la temperatura en función del pH del medio.

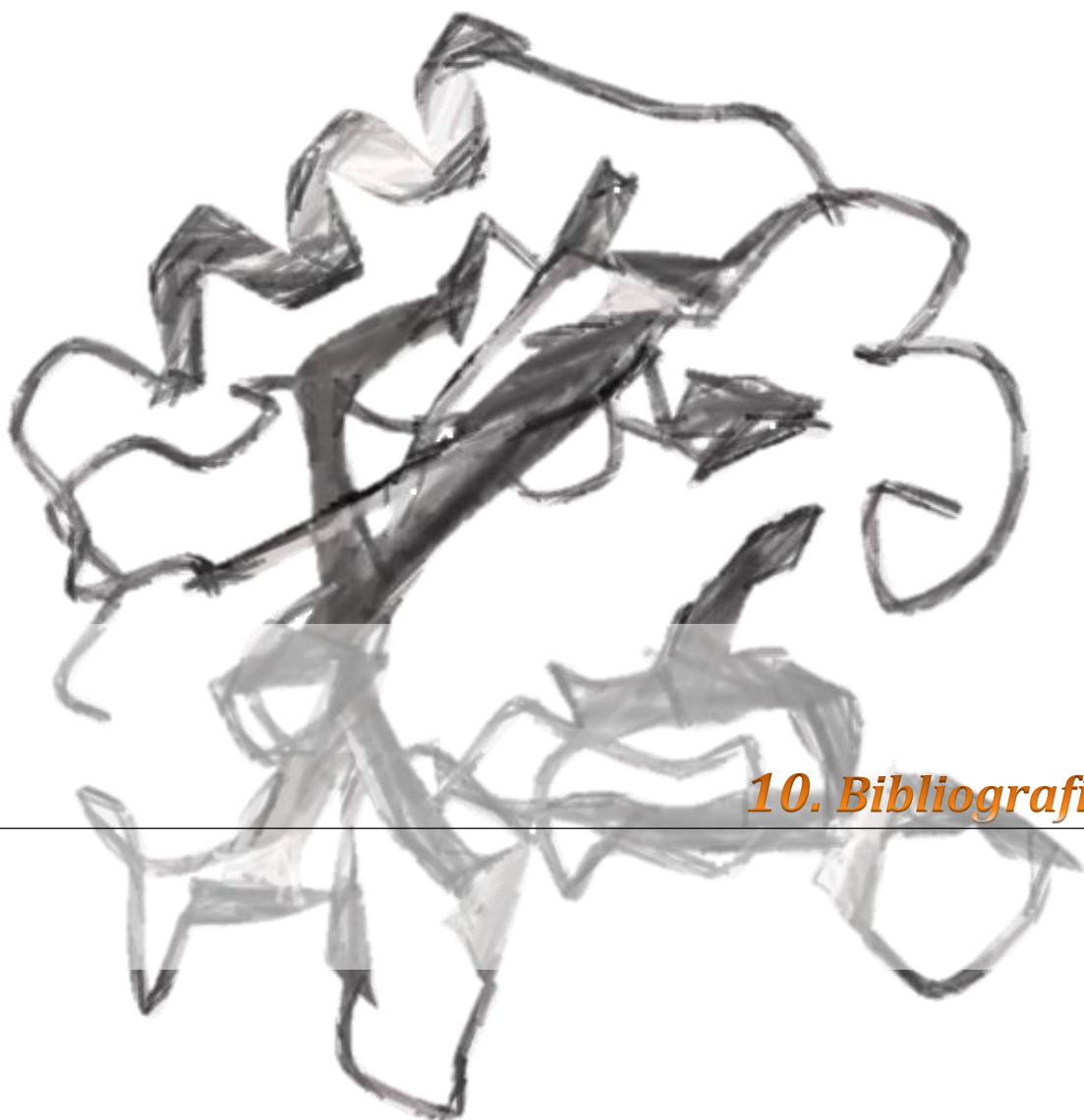
- ✚ La tecnología de pulsos de luz provoca una modificación estructural en la β -Lg cuyo alcance varía en función de la intensidad aplicada, el pH del medio, y la presencia de otros compuestos en el medio.
- ✚ El impacto de los pulsos de luz en la β -Lg parece implicar alteraciones en su reconocimiento tanto por parte de anticuerpos recombinantes (IgEr) como por los anticuerpos empleados en los kits comerciales típicamente empleados para su detección. A mayor intensidad de tratamiento, menor detección de la proteína mediante IgG. Sin embargo, la inhibición con los anticuerpos recombinantes no fue progresiva con la intensidad aplicada.
- ✚ Los pulsos de luz favorecen la digestibilidad de la β -Lg por parte de la pepsina. Esta tecnología podría por tanto favorecer los procesos de hidrólisis industriales llevados a cabo para obtener productos hipoalergénicos, así como mejorar la digestibilidad fisiológica de la proteína.
- ✚ El procesado mediante pulsos de luz es capaz de aumentar el reconocimiento de la β -Lg por parte de los anticuerpos de algunos pacientes alérgicos, a pesar de que su detección se ve disminuida por los métodos tradicionalmente empleados (kits comerciales) cuando la proteína es procesada bajo esta tecnología.
- ✚ El impacto de los pulsos de luz en la inmunoreactividad de la β -Lg con anticuerpos de pacientes alérgicos a las proteínas de leche de vaca (APLV) es específico de cada tipo de plasma y no es predecible por la alergenicidad específica hacia el alérgeno en cuestión (kU_A/L). Por su parte, el empleo de mezclas plasmáticas de pacientes alérgicos puede ser válido clínicamente como test rápido en proteína nativa; sin embargo, los resultados no resultan adecuados como base para tomar decisiones en cuanto al efecto de la tecnología de pulsos de luz y, probablemente, de otros procesos más tradicionales, en la alergenicidad de la β -Lg.



9. Perspectivas de Futuro

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se ha mostrado el potencial de las tecnologías pulsos de luz y tratamiento térmico asistido por presión (TTAP) para su aplicación en la modificación de las propiedades alergénicas de proteínas alimentarias, aunque se debe seguir investigando para una mejor comprensión. A partir de los resultados y conclusiones presentados en este trabajo, las perspectivas de investigaciones futuras se orientarían a los siguientes campos:

- Producción de anticuerpos recombinantes, a partir plasmas de pacientes alérgicos, que sean previamente validados frente a la tecnología a estudiar en cuestión.
- Desarrollo de ensayos de inhibición con técnicas inmunoenzimáticas tipo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) competitivo indirecto, basados en anticuerpos recombinantes, para productos alimenticios que incluyan lácteos o derivados entre sus ingredientes y que permitan reconocer modificaciones en el potencial alergénico del producto final.
- Estudios estructurales de proteína procesada bajo diversas condiciones de tratamiento que permitan conocer los cambios configuracionales responsables de las alteraciones en el potencial alergénico de la proteína.
- Identificación de los puntos de unión entre el antígeno y los anticuerpos para una mejor comprensión de las diferentes respuestas según el anticuerpo empleado en el estudio, así como la repercusión que implica el empleo de *poles* plasmáticos frente al estudio de los plasmas de forma unitaria.
- Ensayos de inhibición por ELISA competitivo indirecto con anticuerpos recombinantes para matrices alimentarias complejas procesadas por altas presiones hidrostáticas y TTAP, y posterior estudio con plasmas de pacientes alérgicos.
- Optimizar los parámetros de presión, tiempo y temperatura en el procesado mediante TTAP para la obtención de productos con propiedades de antigenicidad reducida.



10. Bibliografía

- Aalaei, K., Rayner, M., Sjöholm, I. (2016). Storage stability of freeze-dried, spray-dried and drum-dried skim milk powders evaluated by available lysine. LWT - Food Science and Technology **73**, 675-682.
- Achouri, A., Boye, J. I. (2013). Thermal processing, salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate. Food Research International **53**, 240-251.
- Allen, J. K., Koplin, J. J. (2012). The epidemiology of IgE-mediated food allergy and anaphylaxis. Immunology and Allergy Clinics of North America **32**:35-50.
- Anandan, C., Gupta, R., Simpson, R., Fischbacher, C., Sheikh, A. (2009). Epidemiology and disease burden from allergic disease in Scotland: analyses of national databases. Journal of the Royal Society of Medicine **102**, 431-442.
- Anandan, C., Nurmatov, U., van Schayck, O. C., Sheikh, A. (2010). Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. Allergy **65**, 152-167.
- Anema, S. G., Li, Y. M. (2003). Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. Journal of Dairy Research **70**(1), 73-83.
- Arbolea, J. C., Artigüez, M. L., Fernández, E., Martínez de Marañón, I. (2013). Method for improving functional properties by means of pulsed light, samples with improved functional properties and uses thereof. European Patent Applicatio, EP 2 548 450 A1.
- Artigüez, M. L., Arbolea, J. C., Martínez de Marañón, I. (2012). Influence of β -lactoglobulin and β -casein on *Listeria innocua* inactivation by pulsed light. International Journal of Food Microbiology **153**, 223-228.
- Artigüez, M. L., Lasagabaster, A., Martínez de Marañón, I. (2011). Factors affecting microbial inactivation by Pulsed Light in a continuous flow-through unit for liquid products treatment. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11), Procedia Food Science **1**, 786 - 791.
- Artigüez, M. L., Martínez de Marañón, I. (2014). Process Parameters Affecting *Listeria innocua* Inactivation by Pulsed Light. Food and Bioprocess Technology, **7**(9), 2759-2765.
- Artigüez, M. L., Martínez de Marañón, I. (2015). Improved process for decontamination of whey by a continuous flow-through pulsed light system. Food Control **47**, 599-605.
- Bahna, S. L. (2008). Hypoallergenic formulas: optimal choices for treatment versus prevention. Annals of Allergy, Asthma & Immunology **101**, 453-459.
- Baker, S. S., Cochran, W. J., Greer, F. R., Heyman, M. B., Jacobson, M.S., et al. (2000). Hypoallergenic infant formulas. Pediatrics **106**, 346-349.

- Balasubramanian, S., Balasubramaniam, V. M. (2003). Compression heating influence of pressure transmitting fluids on bacteria inactivation during high pressure processing. Food Research International **36** (7), 661–668.
- Balasubramanian, V. M., Raghubeer, E. (2002). Determining thermal effects in high-pressure processing. Food Technology **56**(2): 31-35.
- Baldini, G., Beretta, S., Chirico, G., Franz, H., Maccioni, E., Mariani, P., and Spinozzi, F. (1999). Salt-induced association of β -lactoglobulin by light and X-ray scattering. Macromolecules **32**, 6128–6138.
- Balny, C., Masson, P., Heremans, K. (2002). High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, **1595**, 3–10.
- Baranda, A. B., Fundazuri, O., Martínez de Marañón, I. (2014). Photodegradation of several triazidic and organophosphorus pesticides in water by pulsed light technology. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **286**, 29-39.
- Barbosa-Cánovas, G. (1999). Conservación no térmica de alimentos. Ed. Ilustrada, pp 294.
- Barbosa-Cánovas, G., Juliano, P. (2008). Food sterilization by combining high pressure and thermal energy. Food Engineering: Integrated Approaches. Gutiérrez-López, G., Barbosa-Cánovas, G., Welti-Chanes, J., Parada-Arias, E. Springer New York: 9-46.
- Bauer, R., Carrotta, R., Rischel, C., Øgdenal, L. (2000). Characterization and isolation of intermediates in β -lactoglobulin heat aggregation at high pH. Biophysical Journal **79**, 1030–1038.
- Belloque, J., Alonso, E., Lo, R., Chico, R. (2008). Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. International Dairy Journal **18**, 367–376.
- Belloque, J., Chicon, R., Lopez-Fandino, R. (2007). Unfolding and refolding of beta-lactoglobulin subjected to high hydrostatic pressure at different pH values and temperatures and its influence on proteolysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**, 5282–5288.
- Besler, M., Steinhart, H., Paschke, A. (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. Journal of Chromatography **756**, 207–228.
- Bialka, K. L., Demirci, A., Puri, V. M. (2008). Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on raspberries and strawberries resulting from exposure to ozone or pulsed UV-light. Journal of Food Engineering **85**(3):444–449.
- Bonomi, F., Fiocchi, A., Frøkiær, H., Gaiaschi, A., Iametti, S., Poiesi, C., Rasmussen, P., Restani, P., Rovere, P. (2003). Reduction of immunoreactivity of bovine β -lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. Journal of Dairy Research **70**, 51-59.

- Bottero, M. T., Civera, T., Anastasio, A., Turi, R. M., Rosati, S. (2002). Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction, Journal of Food Protection **65**(2), 362-366.
- Branum, A. M., Lukacs, S. L. (2009). Food allergy among children in the United States. Pediatrics **124**, 1549-1555.
- Breiteneder, H., Mills, E. N. (2005). Molecular properties of food allergens. Journal of Allergy and Clinical Immunology **115**, 14-23.
- Bromley, E. H. C., Krebs, M. R. H., Donald, A. M. (2006). Mechanisms of structure formation in particulate gels of β -lactoglobulin formed near the isoelectric point. The European Physical Journal E **21**, 145-152.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J. H., Cooper, R., Flower, D.R, Yewdall, S.J.; Polikarpov, I.; North, A.C. and Sawyer, L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin. Structure **5**, 481-495.
- Bu, G., Lu, J., Zheng, Z., Luo, Y. (2009a). Influence of Maillard reaction conditions on the antigenicity of bovine α -lactalbumin using response surface methodology. Journal of the Science of Food and Agriculture **89**, 2428-2434.
- Bu, G., Luo, Y., Chen, F., Liu, K., Zhu, T. (2013). Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. Dairy Science & Technology **93**(3), 211-223.
- Bu, G., Luo, Y., Zhang, Y., Chen, F. (2010). Effects of fermentation by lactic acid bacteria on the antigenicity of bovine whey proteins. Journal of the Science of Food and Agriculture **90**, 2015-2020.
- Bu, G., Luo, Y., Zheng, Z., Zheng, H. (2009b). Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein isolate. Food and Agricultural Immunology **20**, 195-206.
- Bull, L. A., Schaschke, C. J. (2002). Interactive effects of pressure, temperature and time on the molecular structure of ovalbumin, lysozyme and β -lactoglobulin. High Pressure Research **22**: 689-691.
- Burks, A. W. (2008). Peanut Allergy. The Lancet **371**, 1538-1546.
- Butz, P., Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. Food Research International **35**, 279-284.
- Chandan, R. C. (2011). Dairy ingredients for food processing: An overview. In Dairy ingredients for food processing (pp. 3-33). Wiley-Blackwell.
- Chandan, R. C., Kilara, A. (2011). Dairy Ingredients for Food Processing. Wiley- Blackwell, Oxford, UK.
- Cheftel, J. C., Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. Meat Science **46** (3), 211-236.

- Chevalier, F., Chobert, J.-M., Popineau, Y., Nicolas, M. G., Haertlé, T. (2001). Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. International Dairy Journal **11**, 145–152.
- Chicón, R., Belloque, J., Alonso, E., López-Fandiño, R. (2008a). Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. International Dairy Journal **18**, 367-376.
- Chicón, R., Belloque, J., Alonso, E., López-Fandiño, R. (2009). Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained. Food Hydrocolloids **23**, 593–599.
- Chicón, R., López-Fandiño, R., Alonso, E., Belloque, J. (2008b). Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of beta-lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments. Journal of Dairy Science **91**, 928-938.
- Chung, S., Yang, W., Krishnamurthy, K. (2008). Effects of pulsed UV-light on peanut allergens in extracts and liquid peanut butter. Journal of Food Chemistry **73**(5), 400-404.
- Claeys, W. L., van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. (2003). Review: Are intrinsic TTIs for thermally processed milk applicable for high-pressure processing assessment? Innovative Food Science and Emerging Technologies **4**, 1–14.
- Considine, T., Patela, H. A., Anemaa, S. G., Singh, H., Creamer, L. K. (2006). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments—A review. Innovative Food Science & Emerging Technologies **8**, 1–23.
- Coscia, A., Orrù, S., Di Nicola, P., Giuliani, F., Rovelli, I., Peila, C., Martano, C., Chiale, F., Bertino, E. (2012). Cow's milk proteins in human milk. Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents **26**, 39- 42.
- Creamer, L. K., Loveday, S.M., Sawyer, L. (2011). (Beta)-lactoglobulin. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney(Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences*, 3. (pp. 787–794). San Diego: Academic Press.
- Cruvinel, W. de M., Jr,vMesquita D., Pereira, J. A., Tiek Takao, T., Wagner, A., Pereira, N., Coelho, L. E. (2010). Immune system – Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. Brazilian Journal of Rheumatology **50**(4): 434-61.
- Czerwenka, C., Maier, I., Potocnik, N., Pittner, F., Lindner, W. (2007). Absolute quantitation of β -lactoglobulin by protein liquid chromatography–mass spectrometry and its application to different milk products. Analytical Chemistry **79**, 5165–5172.
- Dalai, S., Sahu, J. (2010). High hydrostatic pressure (HPP) in food processing: Design aspects and applications. Assam University Journal of Science & Technology: Physical Sciences and Technology **6**(2), 70-87.

- Dalgleish, D. G., Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. Annual Review of Food Science and Technology **3**, 449-467.
- Damodaran, S. (2005). Protein Stabilization of Emulsions and Foams. Journal of Food Science **70**: R54-R66.
- Danielewicz-Ferchmin, I., Banachowicza, E. M., Ferchmin, A. R. (2011). Role of electromechanical and mechanoelectric effects in protein hydration under hydrostatic pressure. Physical Chemistry Chemical Physics **13**, 17722-17728.
- Davies, M. J., Truscott, R. J. (2001). Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology **63**, 114-125.
- Davis, P. J., James, D. C., Smales, C. M. (2001). How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? Allergy **56**, 56-60.
- Davis, P. J., Williams, S. C. (1998). Protein modification by thermal processing. Allergy **53**(46): 102-105.
- de Heij, W. B. C., van Schepdael, L. J. M. M., Moezelaar, R., Hoogland, H., Matser, A. M., van den Berg, R. W. (2003). High-pressure sterilization: Maximizing the benefits of adiabatic heating. Food Technology **57**(3):37-41.
- de la Fuente, M., Olano, A., Casal, V., Juárez, M. (1998). Effects of high pressure and heat treatment on the mineral balance of goats milk. Journal of Dairy Research **66**, 65-72.
- de Luis, R., Pérez, M., Sánchez, L., Lavilla, M., Calvo, M. (2007). Development of two Immunoassay formats to detect β -lactoglobulin: Influence of heat treatment on β -lactoglobulin immunoreactivity and assady applicability in processed foods. Journal of Food Protection **70**: 1691-1697.
- de Maria, S., Ferrari, G., Maresca, P. (2016). Effects of high hydrostatic pressure on the conformational structure and the functional properties of bovine serum albumin. Innovative Food Science and Emerging Technologies **33**, 67-75.
- de Wit, J. (1981). Structure and functional behavior of whey proteins. Netherlands Milk Dairy Journal **35**: 47-64.
- de Wit, J. N., Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. Journal of Dairy Science **67**: 2701-2710.
- Dearman, R. J., Kimber, I. (2009). Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. Clinical & Experimental Allergy **39**(4): 458-468.
- Deckers, I. A., McLean, S., Linssen, S., Mommers, M., van Schayck, C. P., Sheikh, A. (2012). Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: a systematic review of epidemiological studies. PLoS One **7**(7):e39803.

- del Castillo-Santaella, T., Sanmartín, E., Cabrerizo-Vílchez, M. A., Arbolea, J. C., Maldonado-Valderrama, J. (2014). Improved digestibility of β -lactoglobulin by pulsed light processing: a dilatational and shear study. Soft Matter **10**(48), 9702-9714.
- Demeulemester, C., Lajon, A., Abramowski, V., Martin, J. L., Durand, P. (1991). Improved ELISA and dot-blot methods for the detection of whey proteins in meat products. Journal of the Science of Food and Agriculture **56**, 325-333.
- Dissanayake, M., Vasiljevic, T. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. Journal of Dairy Science **92**, 1387-1397.
- Duan, C., Yang, L., Li, A., Zhao, R., Huo, G. (2014). Effects of enzymatic hydrolysis on the allergenicity of whey protein concentrates. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology **13**, 231-239.
- Dumay, E. M., Kalichievski, M. T., Cheftel, J. C. (1994). High pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and baroprotective effects of sucrose. Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**: 1602-1605.
- Dunn, J., Burgess, D., Leo, F. (1997). Investigation of pulsed light for terminal sterilization of WFI filled blow/fill/seal polyethylene containers. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology **51**, 111-115.
- Dunn, J. E., Clark, R. W., Asmus, J. F., Pearlman, J. S., Boyer, K., Painchaud, F., Hofmann, G. A. (1989). Methods for preservation of foodstuffs. Patent US4871559 A
- Dupont, D., Muller-Renaud, S. (2006). Quantification of proteins in dairy products using an optical biosensor. Journal of AOAC International **89**, 843-844.
- EFSA**, (2014). Scientific opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. EFSA J. **12**, 3894.
- EFSA. (2015). Scientific Opinion: Safety of UV-treated milk as novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. EFSA Journal **14**(1):4370.
- Ehn, B. M., Allmere, T., Telemo, E., Bengtsson, U., Ekstrand, B. (2005). Modification of IgE binding to β -lactoglobulin by fermentation and proteolysis of cow's milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**, 3743-3748.
- Ehn, B. M., Ekstrand, B., Bengtsson, U., Ahlstedt, S. (2004). Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**, 1398-1403.
- El-Agamy, E. (2007) The challenge of cow milk protein allergy. Small Ruminant Research **68**(1-2):64-72.

- Elmnasser, N., Dalgalarrodo, M., Orange, N., Bakhrouf, A., Haertle, T., Federighi, M., Chobert, J. (2008). Effect of pulsed-light treatment on milk proteins and lipids. Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**, 1984–1991.
- European Parliament and Council Regulation. Reglament No 1169/2011 of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004.
- Europrevall. (2009). Food Allergy: Basic facts and how to live with it. <http://www.eaaci.org/food-allergy/April%202012%20Food%20Allergy%20Basic%20facts%20and%20how%20to%20live%20with%20it.pdf>
- Famelart, M.-H., Chapron, L., Piot, M., Brulé, G., Durier, C. (1998). High pressure-induced gel formation of milk and whey concentrates. Journal of Food Engineering **36**: 149–164.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization / World Health Organization. (2001). Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (Rome, Italy).
- Farkas, D., Hoover, D. (2000). High-pressure processing. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Journal of Food Science Supplement, pp. 47-64.
- FDA, Food and Drug Administration. (2000). Food and Drug Administration issues approval for pulsed UV light in the production, processing and handling of food. Code 21CFR179.41 (pp. 438).
- FDA, Food and Drug Administration. (2010). Food allergies: What you need to know. <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAllergens/ucm079311.htm>
- Fernández, E., Artiguez, M. L., de Marañón, I. M., Villate, M., Blanco, F. J., Arbolea, J. C. (2012). Effect of pulsed-light processing on the surface and foaming properties of β -lactoglobulin. Food Hydrocolloids **27**, 154–160.
- Feuilloley, M. G. J., Bourdet, G., Orange, N. (2006). Effect of white pulsed light on *Pseudomonas aeruginosa* culturability and its endotoxin when present in ampoules for injection. European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Science **11**, 37–43.

- Fiocchi, A., Schünemann, H. J., Brozek, J., Restani, P., Beyer, K., Troncone, R., Martelli, A., Terracciano, L., Bahna, S. L., Rancé, F., Ebisawa, M., Heine, R. G., Assa'ad, A., Sampson, H., Verduci, E., Bouygue, G. R., Baena-Cagnani, C., Canonica, W., Lockey, R. F. (2010). Diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA): a summary report. Journal of Allergy and Clinical Immunology **126**(6):1119–1128.
- Foegeding, E., Çakir, E., Koç, H. (2010). Using dairy ingredients to alter texture of foods: Implications based on oral processing considerations. International Dairy Journal **20** (9): 562-570.
- Fotschki, J., Szyk, A., Wróblewska, B. (2015). Immunoreactivity of lactic acid-treated mare's milk after simulated digestion. Journal of Dairy Research **82**, 78-85.
- Fritsche, R. (2003). Role for technology in dairy allergy. Australian Journal of Dairy Technology **58**:89–91.
- Funtenberger, S., Dumay, E. M., Cheftel, J. C. (1997). High pressure promotes β -lactoglobulin aggregation through SH/S-S interchange reactions. Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**:912–921.
- Galli, S. J., Tsai, M., Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. Nature **454**(7203):445–454.
- Garcia, M. C., Marina, M. L., Torre, M. (1998). Ultrarapid detection of bovine whey proteins in powdered soybean milk by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A **822**, 225–232.
- Gaudin, J. C., Rabesona, H., Choiset, Y., Yeretssian, G., Chobert, J. M., Sakanyan, V., Drouet, M., Haertlé, T. (2008). Assessment of the immunoglobulin E-mediated immune response to milk-specific proteins in allergic patients using microarrays. Clinical & Experimental Allergy **38**, 686-693.
- Giovanna, V., Carla, C., Alfina, C., Domenico, P. A., Elena, L. (2012). The immunopathogenesis of cow's milk protein allergy (CMPA). Italian Journal of Pediatrics **38**:35.
- Gómez-López, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., Debevere, J. (2005). Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. International Journal of Food Microbiology **103**(1), 79–89.
- Goodman, R. E. (2008). Performing IgE serumtesting due to bioinformatics matches in the allergenicity assessment of GM crops. Food and Chemical Toxicology **46**(10), S24–S34.
- Gottschalk, M., Nilsson, H., Roos, H., Halle, B. (2003). Protein self-association in solution: The bovine β -lactoglobulin dimer and octamer. Protein Science **12**(11): 2404-2411.
- Grimshaw, K. E. C., King, R. M., Nordlee, J. A., Hefle, S. L., Warner, J. O., Hourihane, J. O. B. (2003). Presentation of allergen in different food preparations affects the nature of the allergic reaction – a case series. Clinical & Experimental Allergy **33**:1581–1585.

- Gupta, R., Sheikh, A., Strachan, D. P., Anderson, H. R. (2004). Burden of allergic disease in the UK: secondary analyses of national databases. Clinical & Experimental Allergy **34**:520-526.
- Hajós, G., Polgár, M., Farkas, J. (2004). High-pressure effects on IgE immunoreactivity of proteins in a sausage batter. Innovative Food Science and Emerging Technologies **5**, 443-449.
- Harwalkar, V. R., Kalab, M. (1985). Thermal denaturation and aggregation of β -lactoglobulin at pH 2.5. Effect of ionic strength and protein concentration. Milchwissenschaft **40**, 31-34.
- Hattori, M., Miyakawa, S., Ohama, Y., Kawamura, H., Yoshida, T., To-o, K., Kuriki, T., Takahashi, K. (2004). Reduced immunogenicity of β -lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**, 4546-4553.
- Hefle, S. L., Nordlee, J. A., Taylor, S. L. (1996). Allergenic foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **36**, S69-S89.
- Heroldova, M., Houska, M., Vavrova, H., Kucera, P., Setinova, I., Honzova, S., Kminkova, M., Strohal, J., Novotna, P., Proskova, A. (2009). Influence of high-pressure treatment on allergenicity of rDau c1 and carrot juice demonstrated by *in vitro* and *in vivo* tests. High Pressure Research **29**, 695-704.
- Herz, U. (2008). Immunological Basis and Management of Food Allergy. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **47**(Supplement 2): S54-S57.
- Hinrichs, J., Kessler, H. G. (1997). Kinetics of pressure-induced denaturation of whey proteins at different temperatures and functional properties. In K. Heremans (Ed.), High pressure research in bioscience and biotechnology (pp. 407-410). Leuven, Belgium: University Press.
- Hinrichs, J., Rademacher, B. (2004). High pressure thermal denaturation kinetics of whey proteins. Journal of Dairy Research **71**, 480-488.
- Hinrichs, J., Rademacher, B. (2005). Kinetics of combined thermal and pressure-induced whey protein denaturation in bovine skim milk. International Dairy Journal **15**, 315-323.
- Hiperbaric. <http://www.hiperbaric.com/es/alta-presion>
- Hiramoto, T. (1984). Method of sterilization. Ushio Denki Kabushikikaisha, Tokyo, Japan. US Patent 4464336.
- Hoffmann, M. A., van Mil, P. J. (1999). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin as a function of pH. Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**:1898-1905.
- Host, A., Samuelsson, E. G. (1988). Allergic reactions to raw, pasteurized, and homogenized/pasteurized cow milk: a comparison. A double-blind placebo-controlled study in milk allergic children. Allergy **43**, 113-118.
- Hourihane, J. O. B. (1998). Prevalence and severity of food allergy – need for control. Allergy **53**, 84-88.

- Houska, M., Setinova, I., Kucera, P. (2013). Food allergens and processing: A review of recent results. In S. Yanniotis, P. Taoukis, N. G. Stoforos, V. T. Karathanos (Eds.), *Advances in Food Process Engineering Research and Applications* (pp. 291-337). Boston, MA: Springer US.
- Hsu, L., Moraru, C. I. (2011). A numerical approach for predicting volumetric inactivation of food borne microorganisms in liquid substrates by pulsed light treatment. *Journal of Food Engineering* **105**(3), 569-576.
- Huby, R. D. J., Dearman, R. J., Kimber, I. (2000). Why are some proteins allergens? *Toxicological Science* **55**, 235-246.
- Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science* **62**, 359-371.
- Huppertz, T., Fox, P. F., Kelly, A. L. (2004). High pressure-induced denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research* **71**(4):489-95.
- Husband, F. A., Garrood, M. J., Mackie, A. R., Burnett, G. R., Wilde, P. J. (2001). Adsorbed protein secondary and tertiary structures by circular dichroism and infrared spectroscopy with refractive index matched emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(2), 859-866.
- Iametti, S., Cairoli, S., de Gregori, B., Bonomi, F. (1995). Modifications of high-order structures upon heating of β -lactoglobulin: Dependence on the protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**:53-58.
- Iametti, S., de Gregori, B., Vecchio, G., Bonomi, F. (1996). Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry* **237**:106-112.
- Iametti, S., Transidico, P., Bonomi, F., Vecchio, G., Pittia, P., Rovere, P., Dall'Aglio, G. (1997). Molecular modifications of β -lg upon exposure to high pressure. *Journal Agriculture and Food Chemistry* **45**, 23-29.
- Ikeuchi, Y., Nakagawa, K., Endo, T., Suzuki, A., Hayashi, T., Ito, T. (2001). Pressure-induced denaturation of monomer β -lactoglobulin is partially reversible: comparison of monomer form (highly acidic pH) with dimer form (neutral pH). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**:4052-4059.
- Inoue, R., Matsushita, S., Kaneko, H., Shinoda, S., Sakaguchi, H., Nishimura, Y., Kondo, N. (2001). Identification of beta-lactoglobulin-derived peptides and class II HLA molecules.
- Jarvinen, K. M., Chatchatee, P., Bardina, L., Beyer, K., Sampson, H. A. (2001). IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and betalactoglobulin in cow's milk allergy. *International Archives of Allergy and Immunology* **126**, 111-118.

- Jayat, D., Gaudin, J. C., Chobert, J. M., Burova, T. V., Holt, C., McNae, I., Sawyer, L., Haertlé, T. (2004). A recombinant C121S mutant of bovine beta-lactoglobulin is more susceptible to peptic digestion and to denaturation by reducing agents and heating. Biochemistry **25**, 6312-6321.
- Jegouic, M., Grinberg, V. Y., Guingant, A., Haertlé, T. (1997). Baric oligomerization in α -lactalbumin/ β -lactoglobulin mixtures. Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**: 19-22.
- Jiménez-Saiz, R., Benedé, S., Molina, E., López-Expósito, I. (2014). Effect of processing technologies on the allergenicity of food products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **55**(13):1902-17.
- Johnston, L. K., Chien, K. B., Bryce, P. J. (2014). The immunology of food allergy. Journal of Immunology **192**, 2529-2534.
- Jonsson, H. (2002). Sensitive and specific biosensor detection of hazelnut proteins and other allergens in food. Proceedings TNO International Food Allergy Forum, Noordwijkerhout, The Netherlands, pp. 61.
- Joss, L. A. Ralston, G. B. (1996). β -Lactoglobulin B: A proposed standard for the study of reversible self-association reactions in the analytical ultracentrifuge? Analytical Biochemistry **236**: 20-26.
- Juliano, P., Knoerzer, K., Fryer, P. J., Versteeg, C. (2009). *C. botulinum* inactivation kinetics implemented in a computational model of a high-pressure sterilization process. Biotechnology Progress **25**(1): 163-175.
- Jylhä, S., Mäkinen-Kiljunen, S., Haahtela, T., Söderlund, H., Takkinen, K., Laukkanen, M., (2009). Selection of recombinant IgE antibodies binding the β -lactoglobulin allergen in a conformation-dependent manner. Journal of Immunological Methods **350**: 63-70.
- K**aack, K. L., Lyager, B. (2007). Treatment of slices from carrot (*Daucus carota*) using high intensity white pulsed light. European Food Research and Technology **224**, 561-566.
- Kageyama, T. (2002). Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. Cellular and Molecular Life Science **59**, 288-306.
- Kamatari, Y. O., Ohji, S., Konno, T., Seki, Y., Soda, K., Kataoka, M., Akasaka, K. (1999). The compact and expanded denatured conformations of apomyoglobin in the methanol-water solvent. Protein Science **8**: 873-882.
- Kim, S., Ki, K., Khan, M., Lee, W., Lee, H., Ahn, B., Kim, H. S. (2007). Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity. Journal of Dairy Science **90**, 4043-4050.
- Kim, J., Saltmarch, M., Labuzu, T. P. (1981). Non-enzymatic browning of hygroscopic whey powders in open versus sealed pouches. Journal of Food Processing and Preservation **5**, 49-57.
- Kimber, I., Dearman, R. J. (2002). Factors affecting the development of food allergy. Proceedings of the Nutrition Society **61**, 435-439.

- Kleber, N., Krause, I., Illgner, S., Hinrichs, J. (2004). The antigenic response of β -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. European Food Research and Technology **219**:105–110.
- Kleber, N. Hinrichs, J. (2007). Antigenic response of beta-lactoglobulin in thermally treated bovine skim milk and sweet whey. Milchwissenschaft **62**, 121-124.
- Kleber, N., Maier, S., Hinrichs, J. (2007). Antigenic response of bovine β -lactoglobulin influenced by ultra-high pressure treatment and temperature. Innovative Food Science and Emerging Technologies **8**, 39–45.
- Knoerzer, K., Buckow, R., Sanguansri, P., Versteeg, C. (2010). Adiabatic compression heating coefficients for high-pressure processing of water, propylene-glycol and mixtures – A combined experimental and numerical approach. Journal of Food Engineering **96**(2): 229-238.
- Knoerzer, K., Juliano, P., Gladman, S., Versteeg, C., Fryer, P. J. (2007). A computational model for temperature and sterility distributions in a pilot-scale high-pressure high-temperature process. AIChE Journal **53**(11):2996-3010.
- Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. Food Technology **47**(6), 156–161.
- Knudsen, J. C., Otte, J., Olsen, K., Skibsted, L. H. (2002). Effect of high hydrostatic pressure on the conformation of β -lactoglobulin A as assessed by proteolytic peptide profiling. International Dairy Journal **12**, 791–803.
- Kobayashi, T., Ikeguchi, M., Sugai, S. (2002). Construction and characterization of β -lactoglobulin chimeras. Proteins **49**: 297–301.
- Koletzko, S., Niggemann, B., Arato, A., Dias, J. A., Heuschkel, R., Husby, S., Mearin, M. L., Papadopoulou, A., Ruemmele, F. M., Staiano, A., Schäppi, M. G., Vandenplas, Y., European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. (2012). Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI committee practical guidelines. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **55**(2):221-229.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2002). The ligand-binding site of bovine beta-lactoglobulin: Evidence for a function? Journal of Molecular Biology **318**, 1043-1055.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2004). Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. Journal of Dairy Science **87**, 785-796.
- Krebbers, B., Matser, A. M., Hoogerwerf, S. W., Moezelaar, R., Tomassen, M. M. M., Van den Berg, R. W. (2003). Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. Innovative Food Science & Emerging Technologies **4**(4), 377–385.

- Krishnamurthy, K., Demirci, A., Irudayaraj, J. M. (2007). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-light treatment system. Journal of Food Science **72**, M233-239.
- Krishnamurthy, K., Demirci, A., Krishnamurthy, K., Irudayaraj, J., & Yang, W. (2009). Chapter 11. UV pasteurization of food materials. CRC Press.
- Krishnamurthy, K., Tewari, J. C., Irudayaraj, J., Demirci, A. (2008). Microscopic and spectroscopic evaluation of inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV light and infrared heating. Food and Bioprocess Technology **3**(1):93-104.
- Kumosinski, T. F., Timasheff, S. N. (1966). Molecular interactions in β -lactoglobulin, X: The stoichiometry of the β -lactoglobulin mixed tetramerization. Journal of the American Chemical Society **88**, 5635-5642.
- Lack, G. (2012). Update on risk factors for food allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology **129**:1187-1197.
- Ladics, G. S., Van Bilsen, J. H. M., Brouwer, H. M. H., Vogel, L., Vieths, S., Knippels, L. M. J. (2008). Assessment of three human Fc ϵ RI-transfected RBL cell-lines for identifying IgE induced degranulation utilizing peanut-allergic patient sera and peanut protein extract. Regulatory Toxicology and Pharmacology **51**(3), 288-294.
- Lagunas-Solar, M. C., Piña, C., MacDonald, J. D., Bolkan, L. (2006). Development of pulsed UV light processes for surface fungal disinfection of fresh fruits. Journal of Food Protection **69**(2):376-84.
- Lasagabaster, A. (2009). Factores que determinan la eficacia de la tecnología de luz pulsada para la inactivación de microorganismos de origen alimentario. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco (UPV-EHU). 262 pp.
- Lasagabaster, A., Arbolea, J. C., Martínez de Marañón, I. (2011). Pulsed light technology for surface decontamination of eggs: Impact on Salmonella inactivation and egg quality. Innovative Food Science and Emerging Technologies **12**, 124-128.
- Lavilla, M., Orcajo, J., Díaz-Perales, A., Gamboa, P. (2016). Examining the effect of High Pressure Processing on the allergenic potential of the major allergen in peach (Pru p 3). Innovative Food Science and Emerging Technologies **38B**, 334-341.
- Lee, Y. (1992). Food-processing approaches to altering allergenic potential of milk-based formula. Journal of Pediatrics **121**:S47-50.
- Lehrer, S. B., W. E. Horner, G. Reese. (1996). Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **36**:553-564.
- Lepski, S., Brockmeyer, J. (2013). Impact of dietary factors and food processing on food allergy. Molecular Nutrition & Food Research **57**, 145-152.

- Leung, J., Hundal, N. V., Katz, A. J., Shreffler, W. G., Yuan, Q., Butterworth, C. A., Hesterberg, P. E. (2013). Tolerance of baked milk in patients with cow's milk-mediated eosinophilic esophagitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology **132**:1215–1216.
- Li, Y. (2011). Effect of Pulsed Ultraviolet Light, High Hydrostatic Pressure and Non-thermal Plasma on the Antigenicity of Almond. M.S. Thesis, Department of Agricultural and Biological Engineering, University of Florida, Gainesville, FL, USA.
- Li, Y. Q., Yang, W. D., Chung, S. Y., Chen, H. Q., Ye, M., Teixeira, A. A., Gregory, J. F., Welt, B. A., Shriver, S. (2013). Effect of pulsed ultraviolet light and high hydrostatic pressure on the antigenicity of almond protein extracts. Food and Bioprocess Technology **6**(2), 431–440.
- Linton, M., Patterson, M. F. (2000), High pressure processing of foods for microbiological safety and quality. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica **47**(2–3), 175–182.
- Liu, G. M., Cheng, H., Nesbit, J. B., Su, W. J., Cao, M. J., Maleki, S. J. (2010). Effects of boiling on the IgE-binding properties of tropomyosin of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Food Science **75**(1):T1–T5.
- Liu, X., Ning, J., Clark, S. (2009). Changes in structure and functional properties of whey proteins induced by high hydrostatic pressure: A review. Frontiers of Chemical Engineering in China **3**(4): 436–442.
- Loch, J., Polit, A., Górecki, A., Bonarek, P., Kurpiewska, K., Dziedzicka-Wasylewska, M., Lewinski, K. (2011). Two modes of fatty acid binding to bovine β -lactoglobulin—crystallographic and spectroscopic studies. Journal of Molecular Recognition **24**, 341–349.
- López, M. (2012). Estandarización de IgE específica. Documento Consenso del Comité de Inmunología Clínica de la SEAIC (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica). <https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi8nrGj7zLUAhVJrxoKHY19A3kQFggmMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.seaic.org%2Fwp-content%2Fplugins%2Fdownload-monitor%2Fdownload.php%3Fid%3DSEAIC-Estandarizacion-de-IgE-Especifica.pdf&usq=AFQjCNHYTrk1-viXNN67o7 t TzFVokjww>
- López, N., Dosda, M. D., Ramírez, F. A., Noguera, O., Espasa, A., Cañas, D. (2009). Análisis comparativo de tres métodos de ELISA frente a Inmunodot para la determinación de antígenos extraíbles del núcleo (ENAs). Inmunología **28**:1, 7-11.
- López-Expósito, I., Chicón, R., Belloque, J., López-Fandiño, R., Berin, M. (2012). In vivo methods for testing allergenicity show that high hydrostatic pressure hydrolysates of β -lactoglobulin are immunologically inert. Journal of Dairy Science **95**, 541-548.

- López-Expósito, I., Chicon, R., Belloque, J., Recio, I., Alonso, E., Lopez-Fandino, R. (2008). Changes in the ovalbumin proteolysis profile by high pressure and its effect on IgG and IgE binding. Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**, 11809–11816.
- López-Fandiño, R., Olano, A. (1998). Effects of high pressures combined with moderate temperature on the rennet coagulation properties of milk. International Dairy Journal **8**, 623–627.
- Lucas, J. S. A., Grimshaw, K. E. C., Collins, K., Warner, J. O., Hourihane, J. O. B. (2004). Kiwi fruit is a significant allergen and is associated with differing patterns of reactivity in children and adults. Clinical & Experimental Allergy **34**, 1115–1121.
- Ma**, X., Lozano-Ojalvo, D., Chen, H., López-Fandiño, R., Molina, E. (2015). Effect of high pressure-assisted crosslinking of ovalbumin and egg white by transglutaminase on their potential allergenicity. Innovative Food Science & Emerging Technologies, **29**, 143–150.
- Macierzanka, A., Sancho, A. I., Mills, E. N. C., Rigby, N. M., Mackie, A. R. (2009). Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of b-casein and β -lactoglobulin. Soft Matter **5**, 538-550.
- Maillard, L. C. (1912). Action des amines sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences **154**, 66–68.
- Makita, T. (1992). Application of high pressure and thermophysical properties of water to biotechnology. Fluid Phase Equilibria **76**(0):87-95.
- Maldonado-Valderrama, J., Fainerman, V. B., Gálvez-Ruiz, M. J., Martín-Rodríguez, A., Cabrerizo-Vílchez, M. A., Miller, R. (2005). Dilatational rheology of β -casein adsorbed layers at liquid-fluid interfaces. The Journal of Physical Chemistry B **109**(37), 17608-17616.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P. J., Mulholland, F., Morris, V. J. (2012). Protein unfolding at fluid interfaces and its effect on proteolysis in the stomach. Soft Matter **8**, 4402–4414.
- Mandalari, G., Adel-Patient, K., Barkholt, V., Baro, C., Bennett, L., Bublin, M., Gaier, S., Graser, G., Ladic, G. S., Mierzejewska, D., Vassilopoulou, E., Vissers, Y. M., Zuidmeer, L., Rigby, N. M., Salt, L. J., Defernez, M., Mulholland, F., Mackie, A. R., Wickhama, M. S. J., Mills, E. N. C. (2009). *In vitro* digestibility of b-casein and b-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. Regulatory Toxicology and Pharmacology **55**, 372–381.
- Manderson, G. A., Hardman, M. J., Creamer, L. K. (1998). Effect of heat treatment on the conformation and aggregation of β -lactoglobulin A, B, and C. Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**:5052–5061.
- Manzocco, L., Panozzo, A., Nicoli, M. C. (2013). Effect of pulsed light on selected properties of egg white. Innovative Food Science & Emerging Technologies **18**, 183–189.

- Masson, P., Cléry, C. (1996). Pressure-induced molten globule states of proteins. In: Hayashi R, ed. High Pressure Bioscience and Biotechnology. London: Elsevier Applied Science Publishers 996, 117–126.
- Mazri, C., Sánchez, L., Ramos, S. J., Calvo, M., Pérez, M. D. (2012). Effect of high-pressure treatment on denaturation of bovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin. European Food Research and Technology **234**:813–819.
- McCafferty, J., Griffiths, A., Winter, G., Chiswell, D. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature **348**(6301):552-4.
- McClements, J. M. J., Patterson, M. F., Linton, M. (2001). The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. Journal of Food Protection **64** (4), 514–522.
- McKenzie, H. A. (1971). β -Lactoglobulins. Pages 257–330 in Milk Proteins. H. A. McKenzie, ed. Academic Press, New York, NY.
- McKenzie, H. A., Sawyer, W. H. (1967). Effects of pH on β -lactoglobulins. Nature **214**, 1101–1104.
- Meinschmidt, P., Ueberham, E., Lehmann, J., Reineke, K., Schlüter, O., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. (2016). The effects of pulsed ultraviolet light, cold atmospheric pressure plasma, and gamma-irradiation on the immunoreactivity of soy protein isolate. Innovative Food Science and Emerging Technologies **38B**, 374–383.
- Mercadante, D., Melton, L. D., Norris, G. E., Loo, T. S., Williams, M. A. K., Dobson, R.C. J., Jameson, G. B. (2012). Bovine β -Lactoglobulin is dimeric under imitative physiological conditions: Dissociation equilibrium and rate constants over the pH range of 2.5–7.5. Biophysical Journal **103**, 303-312.
- Meulenbroek, L., Oliveira, S., den Hartog Jager, C., Klemans, R., Lebens, A., Baalen, T., Knulst, A. C., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Garssen, J., Knippels, L. M., van Hoffen, E. (2014). The degree of whey hydrolysis does not uniformly affect in vitro basophil and T cell responses of cow's milk-allergic patients. Clinical & Experimental Allergy **44**, 529-539.
- Meyer-Pittroff, R., Behrendt, H., Ring, J. (2007). Specific immuno-modulation and therapy by means of high pressure treated allergens. High Pressure Research **27**, 63–67.
- Michalski, M. C., Januel, C. (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? Trends Food Science & Technology **17**, 423–437.
- Miller, B. M., Sauer, A., Moraru, C. I. (2012). Inactivation of Escherichia coli in milk and concentrated milk using pulsed-light treatment. Journal of Dairy Science **95**(10), 5597-5603.

- Mills, C. E. N., Sancho, A. I., Rigby, N. M., Jenkins, J. A., Mackie, A. R. (2009). Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**(8), 963–969.
- Miranda, G., Pelissier, J. P. (1983). Kinetic studies of in vivo digestion of bovine unheated skim-milk proteins in the rat stomach. *Journal of Dairy Research* **50**:27–36.
- Molina, E., Amigo, L., Ramos, M. (1998). Detection of bovine milk proteins in soymilk by Western blotting. *Journal of Food Protection* **61**, 1691–1694.
- Molinari, H., Ragona, L., Varani, L., Musco, G., Consonni, R., Zetta, L., Monaco, H. L. (1996). Partially folded structure of monomeric bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters* **381**, 237-243.
- Monaci, L., Tregoat, V., van Hengel, A. J., Anklam, E. (2006). Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology* **223**: 149–179.
- Monaci, L., Visconti A. (2010). Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends in Food Science and Technology* **21**: 272-283.
- Monogioudi, E., Faccio, G., Lille, M., Poutanen, K., Buchert, J., Mattinen, M. L. (2011). Effect of enzymatic cross-linking of β -casein on proteolysis by pepsin. *Food Hydrocolloids* **25**:1, 71-81.
- Moreno, F. J. (2007). Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **61**, 50–60.
- Morisawa, Y., Kitamura, A., Ujihara, T., Zushi, N., Kuzume, K., Shimanouchi, Y., Tamura, S., Wakiguchi, H., Saito, H., Matsumoto, K. (2009). Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins. *Clinical and Experimental Allergy* **39**: 918-925.
- Mouécoucou, J., Frémont, S., Villaume, C., Sanchez, C., Méjean, L. (2007). Polysaccharides reduce in vitro IgE/IgE-binding of β -lactoglobulin after hydrolysis. *Food Chemistry* **104**, 1242-1249.
- Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, R. M., Wal, J. M., Bernard, H. (2005). Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(11):4547–4553.
- Mor-Mor, M., Yuste, J. (2003). High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: physical properties and sensory analysis. *Meat Science* **65** (3), 1187–1191.
- Natale, M., Bisson, C., Monti, G., Peltran, A., Garoffo, L. P., Valentini, S., Fabris, C., Bertino, E., Coscia, A., Conti, A. (2004). Cow's milk allergens identification by two dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Molecular Nutrition & Food Research* **48**, 363-369.
- Niggemann, B., Von Berg, A., Bollrath, C., Berdel, D., Schauer, U., Rieger, C., Haschke-Becher, E., Wahn, U. (2008). Safety and efficacy of a new extensively hydrolyzed formula for infants with cow's milk protein allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* **19**, 348–354.

- Nooji, J. (2011). Reduction of wheat allergen potency by pulsed ultraviolet light, high hydrostatic pressure and nonthermal plasma. M.S. thesis Gainesville, FL, USA: Department of Food Science and Human Nutrition, University of Florida, 32611.
- Nowak-Wegrzyn, A., Bloom, K. A., Sicherer, S. H., Shreffler, W. G., Noone, S., Wanich, N., Sampson, H. A. (2008). Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology **122**(2), 342-347.
- Nowak-Wegrzyn, A., Fiocchi, A. (2009). Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology **9**, 234–237.
- O'Connell, J. E., Fox, P. F. (2011). Heat Treatment of Milk | Heat Stability of Milk. In Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), J.W. Fuquay, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 744–749.
- Olsen, K., Kristiansen, K. R., Skibsted, L. H. (2003). Effect of high hydrostatic pressure on the steady-state kinetics of tryptic hydrolysis of β -lactoglobulin. Food Chemistry **80**, 255–260.
- O'Reilly, C. E., Murphy, P. M., Kelly, A. L., Guinee, T. P., Beresford, T. P. (2002). The effect of high pressure treatment on the functional and rheological properties of Mozzarella cheese. Innovative Food Science and Emerging Technology **3**, 3–9.
- Orruño, E., Morgan, M. R. A. (2006). IgE binding to proteins from sesame and assessment of allergenicity: implications for biotechnology? Biotechnology Letters **28**(23): 1877-1888.
- Ortore, M. G., Spinozzi, F., Mariani, P., Paciaroni, A., Barbosa, L., Amenitsch, H., Steinhart, M., Ollivier, J., Russo, D. (2009). Combining structure and dynamics: non-denaturing high-pressure effect on lysozyme insolubility, Journal of The Royal Society Interface **6**, S619–S634.
- Palgan, I., Caminiti, I. M., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D. J., Cronin, D. A., Lyng, J. G. (2011). Effectiveness of high intensity light pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk. Food Microbiology **28**(1), 14-20.
- Panick, G., Malessa, R., Winter, R. (1999). Differences between the pressure and temperature induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin A, B and AB monitored by FT-IR spectroscopy and small-angle X ray scattering. Biochemistry **38**, 6512–6519.
- Panozzo, A., Manzocco, L., Lippe, G., Nicoli, M. C. (2016). Effect of pulsed light on structure and immunoreactivity of gluten. Food Chemistry **194**, 366–372.
- Pattison, D. I., Rahmanto, A. S., Davies, M. J. (2012). Photo-oxidation of proteins. Photochemical & Photobiological Sciences **11**, 38–53.

- Pelto, L., Rantakokko, H. K., Lilius, E.M., Nuutila, J., Salminen, S. (2000). No difference in symptoms and receptor expression in lactose-intolerant and in milk-hypersensitive subjects following intake of homogenized and unhomogenized milk. International Dairy Journal **10**, 799–803.
- Penner, M. (2014). Ultraviolet, Visible and Fluorescence Spectroscopy. In : Nielsen, S.S. (Ed.), Food Analysis, pp. 387-406.
- Peram, M. R., Loveday, S. M., Ye, A., Singh, H. (2013). *In-vitro* gastric digestion of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin. Journal of Dairy Science **96**, 63-74.
- Peñas, E., Préstamo, G., Baeza, M. L., Martínez-Molero, M. I., Gomez, R. (2006). Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. International Dairy Journal **16**, 831–839
- Peyron, S., Mouecoucou, J., Fremont, S., Sanchez, C., Gontard, N. (2006). Effects of heat treatment and pectin addition on beta-lactoglobulin allergenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**:5643–5650.
- Piazza, R., Iacopini, S. (2002). Transient clustering in a protein solution. European Physical Journal **7**: 45–48.
- Polydera, A. C., Galanou, E., Stoforos, N. G., Taoukis, P. S. (2003). Inactivation kinetics of pectin methylesterase of Greek navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. Journal of Food Engineering **62** (3), 291–298.
- Poms, R. E., Klein, C. L., Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: A review. Food Additives and Contaminants **21**, 1–31.
- Popelka, Pe., Popelka, Pa., Horská, D., Golian, J., Marcinčák, S. (2002). Detection of sheep milk and cheeses adulteration using enzyme immunoanalysis (ELISA). Slovenian Veterinary Research Journal **27**(3), 36-37.
- Porter, J. W. G. (1978). The present nutritional status of milk proteins. International Journal of Dairy Technology **31**:199–202.
- Poulsen, O. M., Hau, J., Kollerup, J. (1987). Effect of homogenization and pasteurization on the allergenicity of bovine milk analysed by a murine anaphylactic shock model. Clinical Allergy **17**, 449–458
- Poulsen, L. K., Vieths, S., van Ree, R. (2006). Allergen specific IgE testing in the diagnosis of food allergy and the event of a positive match in the bioinformatics search. Molecular Nutrition & Food Research **50**, 645–654.
- Prescott, S., Allen, K. J. (2011). Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. Pediatric Allergy and Immunology **22**:155-160.

- Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, H. M., Baker, E. N., Jameson, G. B. (1998).** Structural basis of the Tanford transition in bovine β -lactoglobulin. Biochemistry **37**: 14014–14023.
- Qin, Z., Guo, X., Lin, Y., Chen, J., Liao, X., Hu, X., Wu, J. (2013). Effects of high hydrostatic pressure on physicochemical and functional properties of walnut (*Juglans regia L.*) protein isolate. Journal of the Science of Food and Agriculture **93**: 1105–1111.
- Rahaman, T., Vasiljevic, T., Ramchandran, L. (2015).** Conformational changes of β -lactoglobulin induced by shear, heat, and pH - Effects on antigenicity. Journal of Dairy Science **98**, 4255-4265.
- Rahaman, T., Vasiljevic, T., Ramchandran, L. (2016). Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. Trends in Food Science & Technology **49**, 24-34.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K., Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **47**:69–112.
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non-thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. Food Research International **44**, 1875–1887.
- Reddy, I. M., Kella, N. K. D., Kinsella, J. E. (1988). Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry **36**:737-741.
- Renard, D., Lefebvre, J., Griffin, M. C. A., Griffin, W. G. (1998). Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. International Journal of Biological Macromolecules **22**:41–49.
- Restani, P., Ballabio, C., Di Lorenzo, C., Tripodi, S., Fiocchi, A. (2009). Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. Analytical and Bioanalytical Chemistry **395**, 47-56.
- Roefs, S., de Kruif, K. (1994). A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin. European Journal of Biochemistry **226** (3): 883-889.
- Roth-Walter, F., Berin, M., Arnaboldi, P., Escalante, C., Dahan, S., Rauch, J., Jensen-Jarolim, E., Mayer, L. (2008). Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. Allergy **63**, 882-890.
- Russo, D., Ortore, M. G., Spinozzi, F., Mariani, P., Loupiac, C., Annighofer, B., Paciaroni, A. (2013). The impact of high hydrostatic pressure on structure and dynamics of β -lactoglobulin. Biochimica et Biophysica Acta **1830**, 4974–4980.

- Rytkönen, J., Karttunen, T. J., Valkonen, K. H., Jenmalm, M. C., Alatossava, T., Björkstén, B., Kokkonen J. (2002). Effect of heat denaturation on beta- lactoglobulin-induced gastrointestinal sensitization in rats: Denaturated β -LG induces a more intensive local immunologic response than native β -LG. Paediatric Allergy and Immunology **13**, 269–277.
- Saalfeld, D., Riegel, I., Kulozik, U., Gebhardt, R. (2015). The combined effect of high hydrostatic pressure and calcium salts on the stability, solubility and gel formation of β -Lactoglobulin. Foods **4**(2): 229–239.
- Sabadin, I. S., Villas-Boas, M. B., de Lima Zollner, R., Netto, F. M. (2012). Effect of combined treatment of hydrolysis and polymerization with transglutaminase on β -lactoglobulin antigenicity. European Food Research and Technology **235**, 801-809.
- Sakai, K., Sakurai, K., Sakai, M., Hoshino, M., Goto, Y. (2000). Conformation and stability of thiol-modified bovine β -lactoglobulin. Protein Science **9**:1719-1729.
- Sakurai, K., Goto, Y. (2002). Manipulating monomer–dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin by amino acid substitution. Journal of Biological Chemistry **277**: 25735–25740.
- Sakurai, K., Oobatake, M., Goto, Y. (2001). Salt-dependent monomer – dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin at pH 3. Protein Science **10**: 2325-2335.
- Sampaio, G., Marinho, S., Prates, S., Morais-Almeida, M., Rosado-Pinto, J. (2005). Transient vs persistent cow's milk allergy and development of other allergic diseases. Allergy **60**, (3):411–412.
- Sampson, H. A. (2001). Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology **107**(5 suppl.), 891-896.
- Sampson, H. A. (2004). Update on food allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology **113**, 805–819.
- Sampson, H. A. (2005). Food allergy: accurately identifying clinical reactivity. Allergy **60**(Supplement 79):19-24.
- Sampson, H. A., Burks, W. (2008). Adverse reactions to foods. In: Adkinson NF, Bochner BS, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, Simons EF, (editors). Middleton's Allergy: Principles and Practice. 7th edition. Philadelphia. Mosby; p. 1139-1167.
- Sampson, M. A., Muñoz-Furlong, A., Sicherer, S. H. (2006). Risk-taking and coping strategies of adolescents and young adults with food allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology **117**:1440–1445.
- Sathe, S. K., Teuber, S. S., Roux, K. H. (2005). Effects of food processing on the stability of food allergens. Biotechnology Advances **23**, 423–429.

- Sawyer, L. (2003.) β -lactoglobulin. In: Fox P, McSweeney P. (eds.) *Advanced Dairy Chemistry*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 319–386.
- Schay, G., Smeller, L., Tsuneshige, A., Yonetani, T., Fidy, J. (2006). Allosteric effectors influence the tetramer stability of both R- and T-states of hemoglobin A. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 25972–25983.
- Schmitt, C., Bovay, C., Vuilliomenet, A.-M., Rouvet, M., Bovetto, L., Barbar, R., Sanchez, C. (2009). Multiscale characterization of individualized β -lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions. *Langmuir* **25**, 7899-7909.
- Schoenwetter, W. F., Dupclay, L. Jr., Appajosyula, S., Botteman, M. F., Pashos, C. L. (2004). Economic impact and quality of life burden of allergic rhinitis. *Current Medical Research and Opinion* **20**:305-317.
- Schokker, E. P., Singh, H., Pinder, D. N., Norris, G. E., Creamer, L. K.. (1999). Characterization of intermediates formed during heat-induced aggregation of β -lactoglobulin AB at neutral pH. *International Dairy Journal* **9**:791–800.
- Schuck, P., le Floch-Fouere, C., Jeantet, R. (2013). Changes in functional properties of milk protein powders: effects of vacuum concentration and drying. *Drying Technology* **31**, 1578–1591.
- Sharman, J., Kumar, L., Singh, S. (2001). Comparison of results of skin prick tests, enzyme-linked immunosorbent assays and food challenges in children with respiratory allergy. *Journal of Tropical Pediatrics* **47**(6), 367–368.
- Sharma, R. R., Demirci, A. (2003). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light and response surface modeling. *Journal of Food Science* **68** (4), 1448-1453.
- Shriver, S. K. (2011). Effect of selected emerging nonthermal processing methods on the allergen reactivity of Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*). M.S. thesis Gainesville, FL, USA: Department of Food Science and Human Nutrition, University of Florida, 32611.
- Shriver, S. K., Yang, W. (2011). Thermal and nonthermal methods for allergen control. *Food Engineering Reviews* **3**, 26-43.
- Shriver, S., Yang, W., Chung, S. Y., Percival, S. (2011). Pulsed Ultraviolet Light Reduces Immunoglobulin E Binding to Atlantic White Shrimp (*Litopenaeus setiferus*) Extract. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **8**, 2569-2583.
- Sicherer, S. H. (2011). Epidemiology of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **127**:594-602.

- Sicherer, S. H., Sampson, H. A. (2014). Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. Journal of Allergy and Clinical Immunology **133**, 291–307, e5.
- Siddique, A. B. Md, Maresca, P., Pataro, G., Ferrari, G. (2016). Effect of pulsed light treatment on structural and functional properties of whey protein isolate. Food Research International Journal **87**, 189-196.
- Silva, J. L., Foguel, D., Royer, C. A. (2001). Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. Trends in Biochemical Science **26**, 612–618.
- Singh, H. (2004). Heat stability of milk. International Journal of Dairy Technology **57**:111–119.
- Singh, H., Havea, P. (2003). Thermal denaturation, aggregation and gelation of whey proteins. In *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1, Proteins*, P.F. Fox, and P.L.H. McSweeney, eds. (Kluwer Academic/Plenum Publishers).
- Smith, W. L., Lagunas-Solar, M. C., Cullor, J. S. (2002). Use of pulsed ultraviolet laser light for the cold pasteurization of bovine milk. Journal of Food Protection **65**(9), 1480-1482.
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. International Dairy Journal **18**, 695–704.
- Soliman, F. (2013). Food allergy: the invisible foe. Egyptian Journal of Internal Medicine **25**:1-9.
- Somkuti, J., Smeller, L. (2013). High pressure effects on allergen food proteins. Biophysical Chemistry Journal **183**, 19–29.
- Sopo, S. M., Greco, M., Cuomo, B., Bianchi, A., Liotti, L., Monaco, S., Iacono, I. D. (2016). Matrix effect on baked egg tolerance in children with IgE-mediated hen's egg allergy. Pediatric Allergy and Immunology **27**: 465–470.
- Sprikkelman, A. B., Heymans, H. S. A., van Aalderen, M. M. C. (2000). Development of allergic disorders in children with cow's milk protein allergy or intolerance in infancy. Clinical and Experimental Allergy **30**(10):1358–1363.
- Stanic-Vucinic, D., Stojadinovic, M., Atanaskovic-Markovic, M., Ognjenovic, J., Grönlund, H., van Hage, M., Lantto, R., Sancho, A. I., Cirkovic Velickovic, T. (2012). Structural changes and allergenic properties of β -lactoglobulin upon exposure to high-intensity ultrasound. Molecular Nutrition and Food Research **56**, 1894–1905.
- Stoica, M., Mihalcea, L., Borda, D., Alexe, P. (2013). Non-thermal novel food processing technologies. An overview. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies **19**(2), 212-217.
- Sun, N., Zhou, C., Pu, Q., Wang, J., Huang, K., Che, H. (2013). Allergic reactions compared between BN and Wistar rats after oral exposure to ovalbumin. Journal of Immunotoxicology **10**(1), 67–74.

- Taheri-Kafrani, A., Gaudin, J. C., Rabesona, H., Nioi, C., Agarwal, D., Drouet, M., Chobert, J. M., Bordbar, A. K., Haertle, T. (2009). Effects of heating and glycation of beta-lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**, 4974–4982.
- Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H., & Sawada, J. (2003). Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. Biological and Pharmaceutical Bulletin **26**, 969–973.
- Takeshita, K., Shibato, J., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., Arihara, K., Itoh, M. (2003). Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. International Journal of Food Microbiology **85**, 151–158.
- Tamime, A.Y. (Ed.). (2009). Milk Processing and Quality Management. John Wiley & Sons, Oxford, UK.
- Tammineedi, C. V. R. K., Choudhary, R., Perez-Alvarado, G. C., Watson, D. G. (2013). Determining the effect of UV-C, high intensity ultrasound and nonthermal atmospheric plasma treatments on reducing the allergenicity of α -casein and whey proteins. LWT - Food Science and Technology **54**(1), 35–41.
- Tanaka, N., Tsurui, Y., Kobayashi, I., Kunugi, S. (1996). Modification of the single unpaired sulphhydryl group of β -lactoglobulin under high pressure and the role of the intermolecular S-S exchange in the pressure denaturation. International Journal of Biological Macromolecules **19**:63–68.
- Taylor, S. L., Lehrer, S. B. (1996). Principles and characteristics of food allergens. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **3** (S), S91-S118.
- Tedford, L. A., Schaschke, C. J. (1999). Combined influence of high pressure and thermal processing on egg white and milk protein. Leatherhead Food RA Food Industry Journal **2**: 125–132.
- Tedford, L. A., Schaschke, C. J. (2000). Induced structural change to β -Lactoglobulin by combined temperature and pressure. Biochemical Engineering Journal **5**: 73–76.
- Tedford, L. A., Kelly, S. M., Price, N. C., Schaschke, C. J. (1999). Interactive effects of pressure, temperature and time on the molecular structure of β -lactoglobulin. Journal of Food Science **64**: 396–399.
- Thomas, K., Herouet-Guicheney, C., Ladics, G., Bannon, G., Cockburn, A., Crevel, R., Fitzpatrick, J., Mills, C., Privalle, L., Vieths, S. (2007). Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: international workshop report. Food and Chemical Toxicology **45**:1116-22.
- Ting, E., Balasubramaniam, V. M., Raghubeer, E. (2002). Determining thermal effects in high pressure processing. Food Technology **56** (2), 31–35.

- Tolgyesi, F., Bode, C. S., Smeller, L., Kim, D. R., Kim, K. K., Heremans, K., Fidy, J. (2004). Pressure activation of the chaperone function of small heat shock proteins, Cellular & Molecular Biology **50**, 361–369.
- Torres, J. A., Velazquez, G. (2008). Hydrostatic pressure processing of foods. Food Processing Operations Modeling: Design and Analysis. S. Jun, and J. M. Irudayaraj, CRC. Press Inc: 173-212.
- Tsabouri, S., Douros, K., Priftis, K. N. (2014). Cow's Milk Allergenicity. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets **14**:16-26.
- Turtoi, M., Nicolau, A. (2007). Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material. Journal of Food Engineering **83**, 47–53.
- UCFA**. Utrecht Center for Food Allergy Site by Mark Blankestijn. (2012). <https://ucfa.nl/food-allergy/mechanisms/>
- Van Beresteijn, E.C.H., Peeters, R.A., Kaper, J., Meijer, R.J.G.M., Robben, A.J.P.M., Schmidt, D.G. (1994). Molecular Mass Distribution Immunological Properties Nutritive Value of Whey Protein Hydrolysates. Journal of Food Protein **57**, 619–625.
- van den Berg, L., Carolas, A., van Vliet, T., van der Linden, E., van Boekel, M., van de Velde, F. (2008). Energy storage controls crumbly perception in whey proteins/polysaccharide mixed gels. Food Hydrocolloids **22**, 1404–1417.
- van Hengel, A. (2007). Food allergen detection methods and the challenge to protect food allergic consumers. Analytical and Bioanalytical Chemistry **389**, 111-118.
- van Regenmortel, M. H. V. (1994). The recognition of proteins and peptides by antibodies. In Immunochemistry, eds. C. J. Van Oss and M. H. V. van Regenmortel. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 177—300.
- Verhoeckx, K. C. M., Vissers, Y. M., Baumert, J. L., Faludi, R., Feys, M., Flanagan, S., Herouet-Guicheney, C., Holzhauser, T., Shimojo, R., van der Bolt, N., Wichers, H., Kimber, I. (2015). Food processing and allergenicity. Food and Chemical Toxicology **80**, 223–240.
- Villas-Boas, M. B., Benedé, S., de Lima Zollner, R., Netto, F. M., Molina, E. (2015). Epitopes resistance to the simulated gastrointestinal digestion of β -lactoglobulin submitted to two-step enzymatic modification. Food Research International **72**, 191–197.
- Villas-Boas, M. B., Fernandes, M. A., Zollner, R. d. L., Netto, F. M. (2012). Effect of polymerization with transglutaminase on in vitro digestion and antigenicity of β -lactoglobulin. International Dairy Journal **25**, 123–131.
- Wal**, J. M. (1991). Approches du risque allergique lié aux protéines issues de traitements technologiques. Médecine Nutrition **27**:133-139.

- Wal, J. M. (1998). Cow's milk allergens. Allergy **53**, 1013-1022.
- Wal, J. M. (2001). Structure and function of milk allergens. Allergy **56** (Supp. 67), 35-38.
- Wal, J. M. (2002). Cow's milk proteins/allergens. Annals of Allergy, Asthma & Immunology **89**:3- 10.
- Wal, J. M. (2004). Bovine milk allergenicity. Annals of Allergy, Asthma & Immunology **93**:2-11.
- Wal, J. M., Bernard, H., Créminon, C., Hamberger, C., David, B., Peltre, G. (1995). Cow's milk allergy: the humoral immune response to eight purified allergens. In *Advances in Mucosal Immunology*; Mestecky, J., et al., Eds.; Plenum Press: New York, 1995; pp 879-881.
- Wang, S. (2009). High Intensity Pulsed Light Technology. In: *Emerging Technologies for Food Processing*, edited by Da-Wen Sun, Published by: Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, 792 pages, 2005. *Trends in Food Science*, pp. 279-306.
- Wekhof, A. (2000). Disinfection with flash lamps. PDA: Journal of Pharmaceutical Science and Technology **54**, 264-276.
- WHO, World Health Organization, (2006). *INFOSAN Information Note No. 3/2006 – Food Allergies*.
- Wihodo, M., Moraru, C. I. (2015). Effect of Pulsed Light treatment on the functional properties of casein films. LWT-Food Science and Technology **64**, 837-844.
- Winter, R., Lopes, D., Grudzielanek, S., Vogtt, K. (2007). Towards an understanding of the temperature/pressure configurational and free-energy landscape of biomolecules. Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics **32**, 41-97.
- Wondraczek, H., Kotiaho, A., Fardim, P., Heinze, T. (2011). Photoactive polysaccharides. Carbohydrate Polymers **83**, 1048-1061.
- Wróblewska, B., Karamac, M., Amarowicz, R., Szymkiewicz, A., Troszynska, A., Kubicka, E. (2004). Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis. International Journal of Food Science & Technology **39**, 839-850.
- Wu, S. Y., Perez, M. D., Puyol, P., Sawyer, L. (1999). β -Lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. Journal of Biological Chemistry **274**, 170-174.
- Yang, W. W., Chung, S. Y., Ajayi, O., Krishnamurthy, K., Konan, K., Goodrich-Schneider, R. (2010). Use of pulsed ultraviolet light to reduce the allergenic potency of soybean extracts. International Journal of Food Engineering **6**(3), 1556-3758.
- Yang, W., Mwakatage, N. R., Goodrich-Schneider, R., Krishnamurthy, K., Rababah, T. M. (2012). Mitigation of major peanut allergens by pulsed ultraviolet light. Food and Bioprocess Technology **5**(7):2728-2738.

- Yeung, J. (2006). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in foods. In: Koppelman, S., Hefle, S (Eds.), *Detecting allergens in food*. Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, Cambridge (England), pp: 109-124.
- Young, E., Stoneham, M. D., Petrukevitch, A., Barton, J., Rona, R. (1994). A population study of food intolerance. Lancet **343**, 1127-1130.
- Zeece, M., Huppertz, T., Kelly, A. (2008). Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of beta-lactoglobulin, Innovative Food Science and Emerging Technologies **9**, 62-69.
- Zhai, J., Wooster, T. J., Hoffmann, S. V., Lee, T. H., Augustin, M. A., Aguilar, M. I. (2011). Structural rearrangement of β -lactoglobulin at different oil-water interfaces and its effect on emulsion stability. Langmuir **27**(15), 9227-9236.
- Zheng, H., Shen, X., Bu, G., Luo, Y. (2008). Effects of pH, temperature and enzyme- to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by alcalase. International Dairy Journal **18**, 1028-1033.
- Zhong, J., Liu, C., Liu, W., Cai, X., Tu, Z., Wan, J. (2011). Effect of dynamic high-pressure microfluidization at different temperatures on the antigenic response of bovine β -lactoglobulin. European Food Research and Technology **233**:95-102.
- Zhong, J. Z., Liu, W., Liu, C. M., Wang, Q. H., Li, T., Tu, Z. C., Luo, S. J., Cai, X. F., Xu, Y. J. (2012). Aggregation and conformational changes of bovine β -lactoglobulin subjected to dynamic high-pressure microfluidization in relation to antigenicity. Journal of Dairy Science **95**:4237-4245.

*“The only way to do great work,
is to love what you do.”*

Steve Jobs (1955-2011)
