

Obtención de seroproteínas funcionales vía reacción de Maillard.

Mar Villamiel, Rosina López-Fandiño, Ana Cristina Soria, Marta Corzo-Martínez y F. Javier Moreno

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC). C/ Juan de la Cierva, 3 28006 Madrid

Tel. 915622900 Fax 915644853

mvillamiel@ifi.csic.es

j.moreno@ifi.csic.es

rosina@ifi.csic.es

acsoria@ifi.csic.es

mcorzo@ifi.csic.es

1. Introducción

Las proteínas del suero lácteo o seroproteínas son ampliamente utilizadas en el sector agroalimentario, ocupando un lugar preponderante en una frontera emergente, donde confluyen la nutrición y la salud. Considerado en el pasado como un subproducto de escasa importancia, el lactosuero es, en la actualidad, uno de los ingredientes más valorados tanto por el valor nutricional de sus componentes como por la funcionalidad de los mismos, hecho al que han contribuido de forma notable los avances sobre las técnicas de filtración por membranas para el fraccionamiento y purificación de sus constituyentes y, en particular, de las proteínas (Onwulata, 2008).

Las seroproteínas (α -lactoalbúmina (α -La), β -lactoglobulina (β -Lg), seroalbúmina bovina (BSA), lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas y otras proteínas minoritarias) representan aproximadamente el 20% de las proteínas de la leche de vaca y se definen como aquéllas que se mantienen en disolución tras la precipitación ácida (Walstra y Genes, 1984) o enzimática (Barth y Behnke, 1997) de las caseínas durante la elaboración del queso. Estas proteínas, con alto contenido en amino ácidos esenciales, son responsables de la funcionalidad tanto biológica como tecnológica del lactosuero y se emplean como ingredientes en productos lácteos, cárnicos, derivados de cereales, bebidas derivadas de frutas, salsas, sopas, pasta, suplementos dietéticos y bebidas para deportistas (Foegeding y col., 2002), por las

propiedades físico-químicas que poseen, tales como solubilidad, viscosidad, capacidad de retención de agua, y por sus propiedades tecnológicas como agentes gelificantes, emulsionantes y espumantes (Christiansen y col., 2004; Neiryck y col., 2004; Firebaugh y Daubert, 2005; Herceg y col., 2007). Además, merece ser destacada la funcionalidad biológica tanto de ciertas proteínas del suero como de sus péptidos derivados, ya que pueden llegar a tener actividad como antioxidantes, antihipertensivos, antitumorales, hipolipidémicos, antivirales, bactericidas y agentes quelantes (Marshall, 2004).

A pesar de las propiedades beneficiosas de las seroproteínas, uno de los objetivos de la industria del sector lácteo es la mejora de las mismas para incrementar su rango de aplicación y, así, acercarse a las necesidades requeridas por el consumidor actual. Como es sabido, tanto las propiedades nutricionales como la funcionalidad de las seroproteínas se encuentran directamente relacionadas con su composición aminoacídica y con sus ordenadas estructuras secundaria y terciaria (Fox, 2003). De este modo, modificaciones en parámetros moleculares importantes tales como la carga, la masa, la hidrofobicidad y la conformación pueden provocar cambios notables en la funcionalidad de dichas proteínas. Existe una gran diversidad de tratamientos encaminados a la modificación de dichas características moleculares, como por ejemplo, los métodos físicos, enzimáticos y/o químicos (acetilación, desaminación, succinilación, alquilación reductora, etc.). Entre los últimos, se ha prestado especial atención al efecto que ejercen los azúcares reductores sobre la funcionalidad y estructura de las proteínas, existiendo evidencias importantes de que la interacción covalente entre los grupos amino de las proteínas con el carbonilo de los azúcares reductores vía reacción de Maillard (RM), es uno de los métodos más efectivos para obtener nuevas proteínas modificadas con gran interés tecnológico (Oliver y col., 2006). Además, a diferencia de otros métodos químicos utilizados para

el mismo fin, la glicosilación vía RM o glicosilación no enzimática, no implica la utilización de reactivos tóxicos para el consumo humano.

La RM es una de las reacciones más complejas e importantes que ocurren durante el procesado y conservación de los alimentos y, junto con la caramelización, es la responsable del pardeamiento no enzimático (Villamiel y col., 2006). Desde que fuera descubierta por Maillard en 1912, ha sido ampliamente estudiada por la gran cantidad y complejidad de los productos formados durante sus etapas iniciales, intermedias y finales (Martins y col., 2001). Durante el avance de esta reacción se originan compuestos de muy diferente naturaleza que pueden llegar incluso a interactuar con los reactantes iniciales, además de producirse alteraciones importantes en la estructura y, consecuentemente, en la funcionalidad de las proteínas. En este sentido, a diferencia de las etapas iniciales de la reacción, las etapas intermedias y finales son las que contribuyen a un mayor entrecruzamiento en las proteínas y una mayor formación de compuestos coloreados y fluorescentes, incluso con potencialidad mutagénica (Oliver y col., 2006). Por todo ello, en función del fin que se persiga, es preciso controlar el avance de la RM seleccionando las condiciones más adecuadas tales como la actividad de agua, la temperatura, el tiempo, el pH, la proporción entre los grupos amino y carbonilo y las propiedades intrínsecas de los reactivos (van Boekel, 2001).

2. Efecto de la glicosilación vía reacción de Maillard sobre la funcionalidad de las seroproteínas

2.1. Efecto sobre las propiedades tecnológicas

Hasta el momento se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la obtención deliberada de glicoconjugados vía RM con proteínas de diferente origen y carbohidratos de distinta naturaleza y peso molecular. Esta interacción covalente provoca modificaciones en la carga, la solvatación y/o conformación de las proteínas,

pudiendo modificar su funcionalidad tecnológica y biológica. Muchos de estos estudios se han realizado en las seroproteínas y, sobre todo, en la β -Lg, ya que la funcionalidad del suero lácteo viene determinada principalmente por la de esta proteína mayoritaria, siendo la α -La la siguiente en abundancia (50 y 25% de su fracción proteica, respectivamente) (Kontopidis y col., 2004; Considine y col., 2007).

Varios autores han estudiado la interacción de la β -Lg vía RM, bajo condiciones controladas, con distintos mono-, di- y oligosacáridos. La unión covalente de carbohidratos a la proteína provoca una pérdida en la carga positiva, resultando en un cambio en el perfil de solubilidad de la proteína en función del pH y del tratamiento térmico (Haertlé y Chobert, 1999). Se han obtenido glicoconjugados de la β -Lg con glucosa, glucosa-6-fosfato, galactosa, manosa, ribosa, arabinosa, gliceraldehído, lactosa y oligofructosa con una mejor solubilidad, capacidad emulgente y espumante y estabilidad térmica, respecto a la proteína original (Nacka y col., 1998; Bouhallab y col., 1999; Groubet y col., 1999; Morgan y col., 1999a, 1999b; Chevalier y col., 2001a; Fenaille y col., 2003; Trofinova y Jongh, 2004). La gelificación es otra de las propiedades funcionales de las seroproteínas que puede verse mejorada tras su glicosilación no enzimática con monosacáridos. En este caso interesa que la RM progrese hacia estados más avanzados para favorecer un mayor entrecruzamiento y agregación de las proteínas (Rich y Foegeding, 2000).

Las modificaciones en la capacidad emulgente han sido profusamente estudiadas en glicoconjugados cuando se emplean polisacáridos de alto peso molecular. En general, la unión covalente de polisacáridos a las proteínas mejora la funcionalidad proteica ya que combina las propiedades emulsionantes de las proteínas con el papel estabilizador de los polisacáridos (Dickinson y Galazka, 1991). A pesar de que esta unión se encuentra más limitada que la de los oligosacáridos debido al impedimento estérico que ejercen las cadenas de carbohidratos, la conjugación de

proteínas con polisacáridos puede afectar en mayor medida a la funcionalidad, debido especialmente a su elevada hidrofilia. Además, se exponen zonas hidrofóbicas superficiales de las proteínas mejorando a la vez la adsorción en las interfases y aumentando la flexibilidad de las moléculas de proteína. Esto favorece su interacción con la fase oleosa cuando se forma una emulsión, mientras que la cadena polisacáridica queda expuesta hacia la fase acuosa, impidiendo la coalescencia de las gotas de aceite (Figura 1) (Nagasawa y col., 1996). Además, la menor reactividad de los polisacáridos impide un mayor avance de la RM lo que se traduce en menor desarrollo de color y menor incidencia de reacciones secundarias (Kato, 2002).

Varias son las investigaciones que han abordado la formación de glicoconjugados entre seroproteínas y dextrano vía RM. El interés de la utilización de este polisacárido reside en su estructura, ya que se trata de una cadena glucosídica lineal mayoritariamente con uniones $\alpha(1\rightarrow6)$ y con algunas ramificaciones $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow4)$. El alto porcentaje de uniones $\alpha(1\rightarrow6)$ que posee el dextrano le confiere una alta flexibilidad, solubilidad y baja viscosidad en disolución.

Dunlap y Côté (2005) examinaron el efecto del tamaño del polisacárido en la

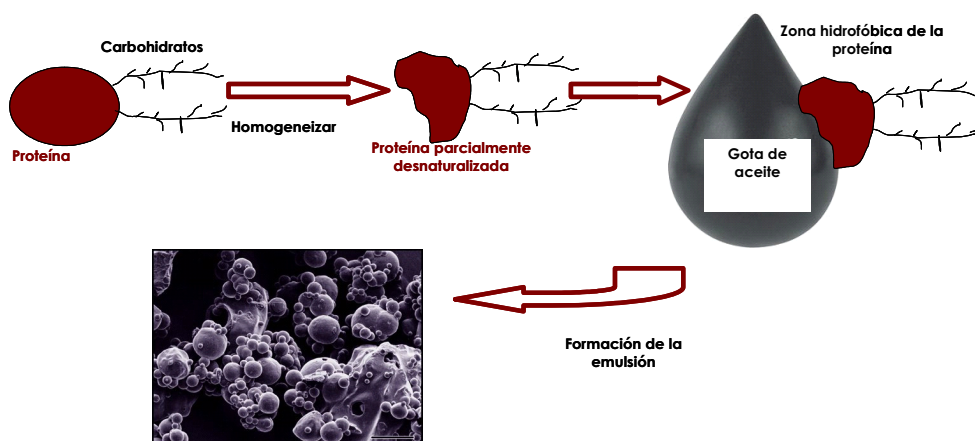


Figura 1. Esquema de la formación de una emulsión empleando proteínas glicosiladas con polisacáridos.

estabilidad de la emulsión cuando se conjugaba la β -Lg con dextranos de 19.6-2000 kDa y encontraron que, en general, al aumentar el peso molecular del dextrano se incrementaba también la estabilidad de la emulsión en las condiciones ensayadas, hasta pesos moleculares de 150 kDa. Wooster y Augustin (2006) también estudiaron la influencia del peso molecular del polisacárido (18.5-440 kDa) en la estabilidad de la emulsión cuando se empleaban como agentes emulgentes los conjugados β -Lg-dextrano obtenidos vía RM. La unión del dextrano, independientemente de su peso molecular, incrementó la estabilidad de la emulsión frente a la floculación inducida por calcio. La capacidad emulgente también se vio mejorada en glicoconjugados aislados de proteína de suero (WPI) con dextrano de 35 y 70 kDa por los mismos autores (Wooster y Augustin, 2007), quienes atribuyeron el efecto positivo en esta propiedad al desdoblamiento de la proteína y, consecuentemente, a la pérdida de rigidez de la misma durante el avance de la reacción en los casos de moderados niveles de conjugación proteína-carbohidrato.

Asimismo, se han hallado resultados importantes en conjugados obtenidos vía RM empleando galactomanano, que es otro de los polisacáridos a considerar, no sólo por su relativamente alta solubilidad en agua sino también por su disponibilidad y bajo coste, lo que hace que sea un estabilizante ampliamente utilizado como ingrediente alimentario. En este sentido, Kim y col. (2003) encontraron mejores índices de actividad emulgente y mejor estabilidad de la emulsión en conjugados BSA-galactomanano en comparación con la proteína sin glicosilar.

Otros estudios llevados a cabo empleando dextrano (10-43 kDa) han demostrado que las condiciones óptimas para interaccionar vía RM con la β -Lg, la α -La y la BSA son 60°C y 0.44 a_w , originándose glicoconjugados con mejor solubilidad que la proteína inicial. Las mejoras más notables en esta propiedad se alcanzaron a bajos valores de pH, probablemente debido a que la unión covalente del polisacárido

produce una disminución en el punto isoelectrico de la proteína. La estabilidad térmica tanto de la β -Lg como de la BSA, que son las seroproteínas más termolábiles, también se mejoró por la unión con el dextrano. Estos autores indicaron que el efecto positivo de la unión del polisacárido a las proteínas en las propiedades estudiadas no estaba ligado al peso molecular del carbohidrato (Jiménez-Castaño y col., 2005a, b; Jiménez-Castaño y col., 2007). La figura 2, muestra, a modo de ejemplo, los resultados correspondientes a la β -Lg con dextrano de 10 y 20 KDa.

Recientemente, Zhu y col. (2008) han estudiado la formación vía RM de conjugados WPI-dextrano de 11 kDa en disoluciones acuosas a diferente temperatura y concentración, tanto de proteína como de carbohidrato. Estos autores observaron que los conjugados originados eran estables en las condiciones ensayadas, pero no llevaron a cabo ningún estudio sobre la influencia en la funcionalidad. Además, como es sabido, las condiciones óptimas para llevar a cabo la formación de estos productos de interacción implican bajos valores de a_w , ya que la RM se encuentra favorecida a la vez que las alteraciones importantes en la estructura proteica se ven minimizadas.

2.2. Efecto sobre las propiedades biológicas

La glicosilación de proteínas mediante RM no sólo puede mejorar determinadas características tecnológicas y sensoriales de los alimentos, sino que, además, podría proporcionar a las proteínas modificadas un valor biológico añadido, diversificando su funcionalidad y, por tanto, dotándolas de un mayor interés, como se muestra a continuación.

La modificación de las proteínas con azúcares fosforilados puede dar lugar a una serie de fosfopéptidos con capacidad de solubilizar el fosfato cálcico, evitando su precipitación y aumentando su absorción en el intestino (Sato y col., 1986). Debido a

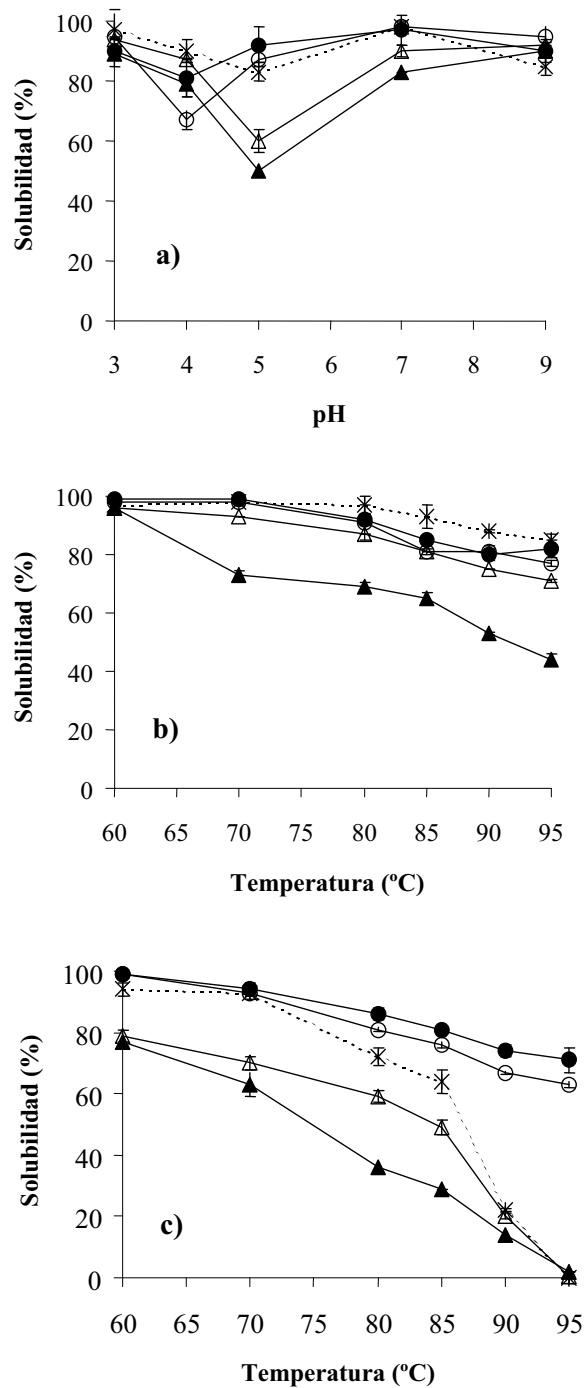


Figura 2. Solubilidad (a) y estabilidad térmica a pH 7 (b) y 5 (c) de la β -lactoglobulina nativa, calentada y glicosilada con dextrano (60°C y 0.44 a_w durante tiempos correspondientes a los máximos de glicosilación). (-x) nativa; (△) calentada 36 h; (▲) calentada 60 h; (○) glicosilada con dextrano 10 kDa, 36 h; (●) glicosilada con dextrano 20 kDa, 60 h.

este hecho, se han atribuido a los fosfopéptidos una serie de aplicaciones potenciales, tales como la prevención de la osteoporosis, recalcificación de huesos después de posibles fracturas, prevención de la hipertensión y de la aparición de caries dental, etc. (FitzGerald, 1998). Aoki y col. (1997) demostraron que la glicosilación vía RM de la β -Lg con glucosa-6-fosfato producía un aumento en la solubilización del fosfato cálcico. Más recientemente, se han publicado una serie de trabajos que muestran un aumento en la solubilización del fosfato cálcico de un concentrado de proteínas de suero (Li y col., 2005), de la β -Lg (Enomoto y col., 2007) y de la BSA (Enomoto y col., 2008) tras su glicosilación no-enzimática con maltopentaosa y/o fosforilación con pirofosfato.

Otra propiedad beneficiosa que puede ser fomentada por la glicosilación de proteínas vía RM es la actividad antioxidante. Así, Browdy y Harris (1997) comprobaron que productos avanzados de la RM, derivados del calentamiento de sueros en polvo, retardaban la oxidación de los lípidos. Por otro lado, Alaiz y col. (1997) indicaron que la glicosilación no-enzimática de la BSA bovina con glucosa, fructosa y, especialmente, con ribosa dio lugar a compuestos pardos con actividad antioxidante. Chevalier y col. (2001b) también observaron que la β -Lg modificada con ribosa, arabinosa y, en menor medida, con ramnosa, galactosa, glucosa y lactosa poseía actividad captadora de radicales libres. Esta capacidad antioxidante es, generalmente, atribuida a la formación de pirroles, melanoidinas y heterociclos que tiene lugar durante las etapas avanzadas y finales de la RM (Lee y Shibamoto, 2002).

Como consecuencia de los efectos de la glicosilación en la conformación, la solubilidad y las propiedades interfaciales de las proteínas, es de esperar que su susceptibilidad a la proteólisis se vea alterada. Los cambios, tanto *in vitro* como *in vivo*, en la digestibilidad de las proteínas glicosiladas pueden tener importantes consecuencias en sus propiedades nutritivas y biológicas, al condicionar la producción de péptidos bioactivos y su absorción intestinal. Así, la BSA bovina glucosilada

no-enzimáticamente en condiciones pseudo-fisiológicas fue más resistente a la digestión con tripsina que la proteína nativa (Lapolla y col., 2001), debido probablemente a una menor reactividad de esta enzima frente a los residuos de Lys y Arg modificados (Henle y Klostermeyer, 1993; Morgan y col., 1997). Recientemente, Sanz y col. (2007) y Moreno y col. (2008) encontraron resultados similares con la β -Lg bovina glicosilada vía RM con galactooligosacáridos. Por el contrario, Bouhallab y col. (1999), en un estudio con la β -Lg lactosilada, observaron la formación de un estado dimérico estable, intermedio en el proceso de desnaturalización térmica, con una conformación, menos compacta y más expandida, muy susceptible a las enzimas proteolíticas.

Por otro lado, se ha descrito que la lactosa unida a la β -Lg a través de la RM es resistente a la acción de la β -galactosidasa, debido, principalmente, a la estructura compacta y globular que presentan los conjugados β -Lg-lactosa. Sin embargo, es posible lograr una mejor accesibilidad de la lactosa conjugada, mediante proteólisis o desnaturalización por calor de los conjugados antes de la adición de la β -galactosidasa (Morgan y col., 1999c).

También debe resaltarse que las proteínas glicosiladas vía RM pueden presentar propiedades inmunoquímicas alteradas que modifiquen su alergenicidad (Matsuda y col., 1985). La glicosilación no-enzimática de las proteínas podría influir en su alergenicidad por dos vías: i) a nivel de su absorción gastrointestinal, ya que se piensa que uno de los requisitos que debe cumplir una proteína alimentaria para ser alergénica es que su estructura tridimensional sea al menos parcialmente estable al entorno adverso del tracto gastrointestinal (acción hidrolítica de las proteasas digestivas, pH ácido, acción de surfactantes como sales biliares), conservando su actividad inmunológica una vez absorbidos a nivel de la mucosa intestinal (Metcalf y col., 1996); ii) a nivel estructural, como consecuencia de que la interacción con

azúcares pueda enmascarar los epítomos de los alérgenos y, por tanto, reducir su alergenicidad (Kato, 2002). Los alérgenos más importantes del lactosuero son la β -Lg y la α -La (Wal, 2001). En una serie de trabajos, Hattori y col. realizaron inmunoensayos con β -Lg modificada con dextrano carboximetilado (1994), quitosano (2000) y oligosacáridos derivados del ácido alginico (2004) indicando que estos conjugados presentaban una menor antigenicidad e inmunogenicidad que la β -Lg nativa. Enomoto y col. (2007; 2008) también lograron reducir parcialmente la inmunogenicidad de la β -Lg y BSA tras su conjugación con maltopentaosa.

Finalmente, también se ha estudiado el posible efecto antimicrobiano de los productos derivados de la RM de la β -Lg con diversos carbohidratos y quitosanos con resultados dispares. Mientras que Chevalier y col. (2001b) no encontraron ningún efecto inhibitor de la β -Lg glicosilada con pentosas (ribosa, arabinosa), hexosas (ramnosa, galactosa, glucosa) o disacáridos (lactosa) sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua* y *Streptococcus mutans*, Miralles y col. (2007) indicaron que la β -Lg conjugada vía RM con quitosanos durante 2 días a 40°C con una a_w de 0.79 presentó una actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* dos veces superior a la actividad presentada por el quitosano sin conjuguar. Aunque el mecanismo por el cual la glicosilación no-enzimática podría provocar un aumento de la actividad bactericida no está aún elucidado, se ha postulado que el desarrollo de la RM podría contribuir a un aumento de la carga neta positiva de los quitosanos. En este sentido, Babiker (2002) indicó que este aumento potencia la actividad antimicrobiana del quitosano frente a bacterias gram-negativas.

3. Conclusiones y tendencias futuras

La obtención de proteínas glicosiladas vía RM es un método eficaz para mejorar o incluso generar nuevas propiedades funcionales y biológicas, produciendo glicoconjugados de gran interés tecnológico. Asimismo, constituye una alternativa muy atractiva a la modificación de proteínas mediante la utilización de agentes químicos. Sin embargo, dada la complejidad de la RM, es necesario profundizar en el estudio de parámetros que permitan un control aún más exhaustivo de dicha reacción. En este sentido, el empleo de inhibidores de grado alimentario de las etapas más avanzadas de la RM, que pueden conducir a la formación de compuestos con cierta actividad mutagénica o citotóxica, combinado con la optimización de condiciones de calentamiento podría garantizar la inocuidad de los glicoconjugados obtenidos.

Por otra parte, no es menos importante el desarrollo de métodos industrialmente rentables que permitan la producción de glicoconjugados con una óptima funcionalidad y su inclusión como nuevos ingredientes en alimentos. Este punto es crítico si se desea transferir al mercado el potencial que presenta este tipo de glicoproteínas como nuevos ingredientes funcionales. Finalmente, un mayor conocimiento y control de los efectos del proceso de glicosilación no-enzimática sobre las propiedades estructurales de las seroproteínas permitiría tanto una producción más segura como el diseño de ingredientes con una funcionalidad más específica y, por tanto, más dirigida a satisfacer las demandas concretas del consumidor.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por diferentes proyectos de investigación: CYTED N° XI.24; ALIBIRD S-0505/AGR/000153 de la Comunidad de Madrid y CONSOLIDER Ingenio 2010 (FUN-C-FOOD):CSD 2007-00063 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Referencias

- Alaiz, M., Hidalgo, F. J., Zamora, R. (1997). Comparative antioxidant activity of Maillard- and oxidized lipid-damaged bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3250-3254
- Aoki, T., Kitahata, K., Fukumoto, T., Sugimoto, Y., Ibrahim, H. R., Kimura, T., Kato, Y., Matsuda, T. (1997). Improvement of functional properties of β -lactoglobulin by conjugation with glucose-6-phosphate through the Maillard reaction. *Food Research International*, 30, 401-406.
- Babiker, E. E. (2002) Effect of chitosan conjugation on the functional properties and bactericidal activity of gluten peptides. *Food Chemistry*, 79, 367-372.
- Barth, C.A., Behnke, U. (1997). Nutritional significance of whey and whey components *Nahrung*, 41, 2-12.
- Bouhallab, S, Morgan, F., Henry, G., Mollé, D., Léonil, J. (1999). Formation of covalent dimer explains the high solubility at pH 4.6 of lactose- β -lactoglobulin conjugates heated near neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1489-1494.
- Browdy, A. A., Harris, N. D. (1997). Whey improves oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Science*, 62, 348-350
- Considine, T., Patel, H.A., Anema, S.G., Singh, H., Creamer, L. K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments. A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 1-23.
- Chevalier, F., Chobert, J.M., Molle, D., Haertlé, T. (2001a). Maillard glycation of β -lactoglobulin with several sugars: comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Lait*, 81, 651-666.
- Chevalier, F., Chobert, J.M., Genot, C., Haertlé, T. (2001b) Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin glycated with several sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5031-5038.
- Christiansen, K.F., Vegarud, G., Langsrud, T., Ellekjaer, M.R., Egelanddal, B. (2004). Hydrolyzed whey proteins as emulsifiers and stabilizers in high-pressure processed dressing. *Food Hydrocolloids*, 18, 757-767.
- Dickinson, E., Galazka, V.B. (1991) Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 5, 281-296.
- Dunlap, C.A., Côté, G.L. (2005). β -lactoglobulin-dextran conjugates: effect of polysaccharide size on emulsion stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 419-423.

- Enomoto, H., Li, C.P., Morizane, K., Ibrahim, H.R., Sugimoto, Y., Ohki, S., Ohtomo, H., Aoki, T. (2007) Glycation and phosphorylation of β -lactoglobulin by dry-heating: effect on protein structure and some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2392-2398.
- Enomoto, H., Li, C.P., Morizane, K., Ibrahim, H.R., Sugimoto, Y., Ohki, S., Ohtomo, H., Aoki, T. (2008). Improvement of functional properties of bovine serum albumin through phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate. *Journal of Food Science*, 73, C84-C91.
- Fenaille F., Morgan F., Parisod V., Tabet J-C., Guy, P.A. (2003). Solid-state glycation of β -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry and gel electrophoresis techniques. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 17, 1483-1492.
- Firebaugh, J.D., Daubert, C.R. (2005). Emulsifying and foaming properties of a derivatized whey protein ingredient. *International Journal of Food Properties*, 8, 243-253.
- FitzGerald, R. J. (1998). Potential uses of caseinophosphopeptides. *International Dairy Journal*, 8, 451-457.
- Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D., McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 151-159.
- Fox, P.F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In P.F. Fox, & P. McSweeney, *Advanced Dairy Chemistry (Vol. 1): Proteins, Part A*, 3rd edition. (pp 1-41). New York: Plenum Press.
- Groubet, R., Chobert, J-M., Haertlé, T. (1999). Functional properties of milk proteins glycated in mild conditions. *Sciences des Aliments*, 19, 423-438.
- Haertlé, T., Chobert, J.M. (1999). Recent progress in processing of dairy proteins: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 23, 367-407.
- Hattori, M., Nagasawa, K., Ametani, A., Kaminogawa, S., Takahashi, K. (1994). Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2120-2125.
- Hattori, M., Numamoto, K., Kobayashi, K., Takahashi, K. (2000). Functional changes in beta-lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2050-2056.

- Hattori, M., Miyakawa, S., Ohama, Y., Kawamura, H., Yoshida, T., To-O, K., Kuriki, T., Takahashi, K. (2004). Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4546-4553.
- Henle, T., Klostermeyer, H. (1993). The Reactivity of the Individual Protein-Bound Lysine Residues of β -Casein a1 During the Initial Stages of the Maillard Reaction. In *International Dairy Federation Special Issue 9303. Protein and Fat Globule Modifications by Heat Treatment, Homogenization, and Other Technological Means for High Quality Dairy Products*; International Dairy Federation: Brussels, Belgium, 1993; p. 183–189.
- Herceg, Z., Rezek, A., Lelas, V., Kresic G y Franetovic, M. (2007). Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 79, 279-286.
- Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., Martín-Alvárez, P.J., Olano, A., López-Fandiño, R. (2005a). Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of β -lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 19, 831-837.
- Jiménez-Castaño, L., López-Fandiño, R., Olano, A., Villamiel, M. (2005b). Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran: effect on solubility and heat stability. *Food Chemistry*, 93, 689-695.
- Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., López-Fandiño, R. (2007) Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*, 21, 433-443.
- Kato, A. (2002) Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates. *Food Science and Technology Research*, 8, 193-199.
- Kim, H.J., Choi, S.J., Shin, W-S., Moon, T.W. (2003). Emulsifying properties of bovine serum albumin-galactomannan conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1049-1056.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2004). Invited review: beta-lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*, 87, 785-796.
- Lapolla, A., Fedele, D., Martano, L., Arico, N. C., Garbeglio, M., Traldi, P., Seraglia, R., Favretto, D. (2001). Advanced Glycation End Products: A Highly Complex Set of Biologically Relevant Compounds Detected by Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 370–378.
- Lee, K.G., Shibamoto, T. (2002). Toxicology and antioxidant activities of non-enzymatic browning reaction products: review. *Food Reviews International*, 18, 151-175.

- Li, C. P., Enomoto, H., Ohki, S., Ohtomo, H., Aoki, T. (2005). Improvement of functional properties of whey protein isolate through glycation and phosphorylation by dry heating. *Journal of Dairy Science*, 88, 4137-4145.
- Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9, 136-156.
- Martins, S.I.F.S., Jongen, W.M.F., van Boekel, M.A.J.S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 364-373.
- Matsuda, T., Kato, Y., Watanabe, K., Nakamura, R. (1985). Immunochemical properties of proteins glycosylated through Maillard reaction: β -lactoglobulin-lactose and ovalbumin-glucose systems. *Journal of Food Science*, 50, 618-621.
- Metcalfe, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.S., Taylor, S.L., Fuchs, R.L. (1996). Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, S165-S186.
- Miralles, B., Martinez-Rodriguez, A., Santiago, A., van de Lagemaat, J., Heras, A. (2007). The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between β -lactoglobulin and chitosan. *Food Chemistry*, 100, 1071-1075.
- Moreno, F.J., Quintanilla-Lopez, J.E., Lebron-Aguilar, R., Olano, A., Sanz, M.L. (2008). Mass spectrometric characterization of glycated β -lactoglobulin peptides derived from galacto-oligosaccharides surviving the in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19, 927-937.
- Morgan, F., Leonil, J., Molle, D., Bouhallab, S. (1997). Nonenzymatic lactosylation of bovine β -lactoglobulin under mild heat treatment leads to structural heterogeneity of the glycoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 413-417.
- Morgan, F., Léonil, J., Mollé, D., Bouhallab, S. (1999a). Modification of bovine β -lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: Effect on association behaviour and protein conformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 83-91.
- Morgan, F., Mollé, D., Henry, G., Vénien, A., Léonil, J., Peltre, G., Levieux, D., Maubois, J-L., Bouhallab, S. (1999b). Glycation of bovine β -lactoglobulin: effect on the protein structure. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 429-435.

- Morgan, F., Henry, G., Le Graët, Y., Mollé, D., Léonil, J., Bouhallab, S. (1999c). Resistance of β -lactoglobulin-bound lactose to the hydrolysis by β -galactosidase. *International Dairy Journal*, 9, 813-816
- Nacka, F., Chobert, J.M., Burova, T., Léonil, J., Haertlé, T. (1998). Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 17, 495-503.
- Nagasawa, K., Ohgata, K., Takahashi, K., Hattori, M. (1996). Role of the polysaccharide content and net charge on the emulsifying properties of β -lactoglobulin-carboxymethyl-dextran conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2538-2543.
- Neiryneck, N., van der Meeren P., Gorbe, S.B., Dierckx, S., Dewettinck, K. (2004). Improved emulsion stabilizing properties of whey isolate by conjugation with pectins. *Food Hydrocolloids*, 18, 949-957.
- Oliver, C.M., Melton, L.D., Stanley, R.A. (2006). Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 337-350.
- Onwulata, C.I. (2008). Milk whey processes: current and future trends. In C.I. Onwulata, & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (pp. 369-389). Blackwell Publishing, USA.
- Rich, L.M., Foegeding, E.A. (2000). Effects of sugars on whey protein isolate gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5046-5052.
- Sanz, M. L., Corzo-Martínez, M., Rastall, R. A., Olano, A., Moreno, F. J. (2007). Characterization and in vitro digestibility of bovine β -lactoglobulin glycosylated with galacto-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7916-7925.
- Sato, R., Noguchi, T., Naito, H. (1986). Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 32, 67-76.
- Trofinova, D., Jongh, H. (2004). Modification of β -lactoglobulin by oligofructose: impact on protein adsorption at the air-water interface. *Langmuir*, 20, 5544-5552.
- Van Boekel, M.A.J.S. (2001). Kinetic aspects of the Maillard reaction: A critical review. *Nahrung*, 45, 150-159.
- Villamiel, M., del Castillo, M.D., Corzo, N. (2006). Browning reactions. In: *Food Biochemistry and Food Processing*. Ed. Y.H. Hui, Blackwell Publishing USA pp 71-100.

- Wal, J.M. (2001). Structure and function of milk allergens. *Allergy*, 56, Suppl. 67, 35-38.
- Walstra, P., Jenness, R. *Dairy chemistry and physics*. Wiley, New York (1984).
- Wooster, T.J., Augustin, M.A. (2006). β -Lactoglobulin-dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303, 564-572.
- Wooster, T.J., Augustin, M.A. (2007). Rheology of whey protein-dextran conjugate films at the air interface. *Food Hydrocolloids*, 21 1072-1080.
- Zhu, D., Damodaran, S., Lucey, J.A. (2008). Formation of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7113-7118.