

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Química-Física Aplicada**



**CARACTERIZACIÓN, FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA  
Y BIOACTIVIDAD DE PROTEÍNAS LÁCTEAS  
GLICOSILADAS VÍA REACCIÓN DE MAILLARD**

**MARTA CORZO MARTÍNEZ**

**Tesis doctoral**  
Noviembre 2010

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Física Aplicada

**CARACTERIZACIÓN, FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA  
Y BIOACTIVIDAD DE PROTEÍNAS LÁCTEAS  
GLICOSILADAS VÍA REACCIÓN DE MAILLARD**

Memoria presentada por

**MARTA CORZO MARTÍNEZ**

Para optar al grado de

**Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

Directores:

**Drs. Mar Villamiel Guerra y Fº Javier Moreno Andújar**

Instituto de Fermentaciones Industriales

Consejo Superior de Investigaciones Científicas





MINISTERIO  
DE CIENCIA  
E INNOVACIÓN



CSIC  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES

D<sup>a</sup>. Mar Villamiel Guerra, Dra. en Farmacia, Investigadora Científica del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C. y D. F<sup>o</sup> Javier Moreno Andújar, Dr. en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Científico Titular del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C.

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado **“Caracterización, funcionalidad tecnológica y bioactividad de proteínas lácteas glicosiladas vía reacción de Maillard”**, y que constituye la memoria que presenta D.<sup>a</sup> Marta Corzo Martínez para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos, ha sido realizado en el Departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C., bajo su dirección.

Y para que así conste firman el presente certificado en Madrid a quince de Noviembre de dos mil diez.

Fdo. D.<sup>a</sup> Mar Villamiel Guerra

Fdo. D. F<sup>o</sup> Javier Moreno Andújar



## ÍNDICE

- ❖ **ÍNDICE DE CONTENIDOS**
- ❖ **ÍNDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS Y TABLAS**
- ❖ **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS EMPLEADOS**





# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1.-INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1.- Proteínas lácteas .....	5
1.1.1.- Características estructurales .....	5
1.1.1.1.- $\beta$ -lactoglobulina bovina .....	5
1.1.1.2.- Caseínas y caseinato sódico .....	8
1.1.2.- Funcionalidad tecnológica .....	11
1.1.2.1.- Solubilidad .....	12
1.1.2.2.- Propiedades emulsionantes y espumantes .....	13
1.1.2.3.- Propiedades reológicas: viscosidad y propiedades gelificantes .....	17
1.1.3.- Funcionalidad biológica .....	17
1.1.3.1.- Propiedades nutricionales .....	18
1.1.3.1.1.- Digestibilidad .....	18
1.1.3.1.2.- Calidad proteica .....	18
1.1.3.2.- Propiedades bioactivas .....	19
1.1.4.- Alergenicidad .....	22
1.1.4.1.- Alergia a la leche y productos lácteos .....	22
1.1.4.2.- Proteínas lácteas como alérgenos .....	25
1.2.- Glicosilación de proteínas vía reacción de Maillard .....	30
1.2.1.- Química de la reacción de Maillard .....	30
1.2.2.- Factores que afectan el progreso de la reacción de Maillard .....	35
1.2.3.- Galactosa, tagatosa, lactosa y dextrano .....	38
1.2.3.- Inhibidores del avance de la reacción de Maillard: Piridoxamina .....	44
1.3.- Efecto de la glicosilación vía reacción de Maillard sobre la funcionalidad de las proteínas .....	45
1.4.1.- Efectos potencialmente negativos .....	45
1.4.2.- Influencia sobre la alergenidad proteica .....	48
1.4.3.- Modificación de la funcionalidad tecnológica .....	49
1.4.4.- Modificación de la funcionalidad biológica .....	52
<b>2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	58
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	66
<b>PARTE I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GLICOCONJUGADOS</b>	
3.1.- Obtención de los glicoconjugados .....	66

3.1.1.- Glicación de la $\beta$ -lactoglobulina con galactosa, tagatosa, lactosa y dextrano de 10 y 20 kDa .....	66
3.1.2.- Glicación del caseinato sódico con galactosa, lactosa y dextrano de 10 kDa .....	67
3.2.- Purificación de los glicoconjugados .....	68
3.3.- Caracterización de los glicoconjugados .....	68
3.3.1.- Determinación del avance de la reacción de Maillard .....	68
3.3.1.1.- Evaluación de las etapas iniciales .....	68
3.3.1.2.- Evaluación de las etapas avanzadas .....	71
3.3.1.3.- Evaluación de las etapas finales .....	71
3.3.1.4.- Cuantificación de los grupos amino primarios libres .....	71
3.3.1.4.1.- Método del TNBS .....	72
3.3.1.4.2.- Método del OPA .....	72
3.3.1.5.- Cuantificación de la pérdida total de carbohidratos en presencia y ausencia de piridoxamina .....	73
3.3.2.- Caracterización estructural de los glicoconjugados .....	74
3.3.2.1.- Cromatografía líquida en fase inversa con detección ultravioleta (RP-LC-UV) .....	74
3.3.2.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida por isoelectroenfoque (IEF) ..	75
3.3.2.3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) .....	76
3.3.2.4.- Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) .....	76
3.3.2.5.- Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray (LC-ESI-MS) .....	77
3.3.2.6.- Cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....	78
3.3.2.7.- Espectroscopía de correlación de fotones .....	80
3.3.2.8.- Determinación de la fluorescencia intrínseca .....	80
3.3.2.9.- Determinación de la hidrofobicidad superficial .....	80
3.3.2.9.1.- Capacidad de unión al ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico	80
3.3.2.9.2.- Capacidad ligante de retinol .....	81

## **PARTE II: FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA DE LOS GLICOCONJUGADOS**

3.4.- Determinación de la solubilidad .....	82
3.5.- Determinación de las propiedades reológicas .....	82
3.5.1.- Curvas de fluidez y viscosidad .....	84
3.5.2.- Determinación de la viscoelasticidad .....	86
3.6.- Determinación de las propiedades emulsionantes .....	87
3.6.1.- Preparación de las emulsiones de aceite en agua por ultrasonidos .....	87

3.6.2.- Optimización del proceso de emulsificación por ultrasonidos .....	87
3.6.3.- Determinación de la actividad y estabilidad emulsionante de los glicoconjugados de caseinato sódico .....	89
3.7.- Propiedades interfaciales y espumantes .....	91
3.7.1.- Determinación de las propiedades interfaciales .....	91
3.7.1.1.- Cinética de adsorción .....	91
3.7.1.2 - Propiedades superficiales dilatacionales .....	93
3.7.2.- Determinación de las propiedades espumantes .....	94
3.7.2.1.- Capacidad espumante .....	96
3.7.2.2.- Estabilidad de la espuma .....	97

### **PARTE III: DIGESTIBILIDAD, INMUNORREACTIVIDAD Y FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DE LOS GLICOCONJUGADOS**

3.8.- Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	98
3.8.1.- Análisis de los digeridos derivados de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	101
3.8.1.1.- Cromatografía líquida en fase inversa con detección ultravioleta (RP-LC-UV) .....	101
3.8.1.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) .....	102
3.8.1.3.- Cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....	102
3.8.1.4.- Caracterización del perfil peptídico por LC-ESI-MS <sup>n</sup> .....	103
3.8.2.4.1.- Glicación del tetrapéptido sintético acetil-SDKP con galactosa y tagatosa .....	103
3.8.2.4.2.- Análisis por LC-ESI-MS <sup>n</sup> .....	103
3.9.- Ensayos de inmunorreactividad: ELISA directo e indirecto .....	105
3.10.- Estudios de fermentación <i>in vitro</i> .....	107
3.10.1.- Crecimiento de microorganismos en forma de cultivos puros .....	108
3.10.1.1.- Cepas bacterianas y medios de cultivo empleados .....	108
3.10.1.2.- Ensayos de fermentación <i>in vitro</i> .....	110
3.10.2.- Crecimiento de microorganismos en forma de cultivos mixtos procedentes de muestras fecales .....	110
3.10.2.1.- Ensayos de fermentación <i>in vitro</i> a pequeña escala .....	110
3.10.2.2.- Cuantificación de las poblaciones bacterianas mediante hibridación con fluorescencia <i>in situ</i> (FISH) .....	111
3.10.2.3.- Determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) y ácido láctico .....	113
3.11.- Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antiadherente .....	114
3.11.1.- Cepas bacterianas y medios de cultivo empleados .....	114
3.11.2.- Ensayos de adhesión a mucina .....	115

3.11.3.- Ensayos competitivos de adhesión en presencia de lectinas .....	116
3.11.4.- Amplificación de genes de factores de virulencia .....	116
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>120</b>
<b>PARTE I: CARACTERIZACIÓN DE LOS GLICOCONJUGADOS .....</b>	<b>120</b>
4.1.- Glicoconjugados de $\beta$ -lactoglobulina .....	120
4.1.1.- Determinación del avance de la reacción de Maillard .....	120
4.1.1.1.- Etapas iniciales .....	120
4.1.1.2.- Etapas avanzadas y finales .....	124
4.1.2.- Caracterización estructural de los glicoconjugados .....	125
4.1.2.1.- Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa con detección ultravioleta (RP-LC-UV) .....	125
4.1.2.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida por isoelectroenfoque (IEF) ..	126
4.1.2.3.- Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) .....	127
4.1.2.4.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) .....	129
4.1.2.5.- Cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....	130
4.1.2.6.- Determinación de la fluorescencia intrínseca .....	133
4.1.2.7.- Determinación de la hidrofobicidad superficial .....	134
4.1.3.- Efecto de la piridoxamina sobre la glicosilación de la $\beta$ -lactoglobulina con galactosa y tagatosa vía reacción de Maillard .....	137
4.1.3.1.- Etapas iniciales de la RM .....	138
4.1.3.1.1.- Determinación de los aductos piridoxamina : galactosa / tagatosa por RP-LC-UV .....	141
4.1.3.2.- Etapas avanzadas y finales .....	145
4.1.3.2.1.- Determinación del grado de agregación .....	145
4.1.3.2.2.- Medida del pardeamiento no enzimático .....	148
4.2.- Glicoconjugados de caseinato sódico .....	151
4.2.1.- Determinación del avance de la reacción de Maillard .....	151
4.2.1.1.- Etapas iniciales .....	151
4.2.1.2.- Etapas avanzadas y finales .....	152
4.2.2.- Caracterización estructural de los glicoconjugados .....	153
4.2.2.1.- Análisis por espectrometría de masas: LC-ESI-MS .....	153
4.2.2.2.- Cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....	159
4.2.2.3.- Determinación del tamaño medio de partícula .....	162
4.2.2.4.- Determinación de la hidrofobicidad superficial .....	163

## PARTE II: FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA DE LOS GLICOCONJUGADOS

4.3.- Propiedades reológicas .....	166
4.3.1.- Comportamiento de flujo y viscosidad .....	166
4.3.2.- Propiedades viscoelásticas .....	170
4.4.- Propiedades emulsionantes .....	174
4.4.1.- Emulsificación convencional y por ultrasonidos .....	175
4.4.2.- Optimización del proceso de emulsificación por ultrasonidos .....	176
4.4.3.- Propiedades emulsionantes de los glicoconjugados de caseinato sódico .....	178
4.4.3.1.- Efecto del tratamiento térmico .....	178
4.4.3.2.- Efecto de la glicosilación vía reacción de Maillard .....	180
4.4.3.2.1.- Etapas iniciales .....	180
4.4.3.2.2.- Etapas avanzadas .....	182
4.5.- Propiedades interfaciales y espumantes .....	183
4.5.1.- Glicoconjugados de $\beta$ -lactoglobulina .....	184
4.5.1.1.- Solubilidad .....	184
4.5.1.2.- Propiedades interfaciales .....	185
4.5.1.2.1.- Cinética de adsorción .....	185
4.5.1.2.2.- Propiedades superficiales dilatacionales .....	188
4.5.1.3.- Propiedades espumantes .....	193
4.5.1.3.1.- Capacidad para formar espumas .....	193
4.5.1.3.2.- Capacidad para estabilizar espumas .....	196
4.5.2.- Glicoconjugados de caseinato sódico .....	198
4.5.2.1.- Solubilidad .....	198
4.5.2.2.- Propiedades interfaciales .....	199
4.5.2.2.1.- Cinética de adsorción .....	199
4.5.2.2.2.- Propiedades superficiales dilatacionales .....	201
4.5.2.3.- Propiedades espumantes .....	204
4.5.2.3.1.- Capacidad para formar espumas .....	204
4.5.2.3.2.- Capacidad para estabilizar espumas .....	207

## PARTE III: DIGESTIBILIDAD, INMUNORREACTIVIDAD Y FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DE LOS GLICOCONJUGADOS

4.6.- Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	210
4.6.1.- Efecto de la glicosilación vía reacción de Maillard sobre la digestibilidad de la $\beta$ -lactoglobulina .....	210
4.6.1.1.- Efecto del grado de glicación .....	210
4.6.1.2.- Efecto del grado de agregación proteica .....	214

4.6.2.- Efecto de la glicosilación vía reacción de Maillard sobre la digestibilidad del caseinato sódico .....	217
4.6.3.- Caracterización del perfil peptídico por LC-ESI-MS <sup>n</sup> .....	220
4.6.3.1.- Análisis por LC-ESI(+)-MS <sup>2</sup> .....	220
4.6.3.1.1.- Caracterización de los péptidos no glicosilados .....	221
4.6.3.1.2.- Caracterización de los péptidos glicosilados .....	221
4.6.3.2.- Análisis de los péptidos glicosilados por LC-ESI(+)-MS <sup>3</sup> y MS <sup>4</sup> .....	229
4.7.- Inmunorreactividad <i>in vitro</i> .....	234
4.7.1.- Glicoconjugados de β-lactoglobulina .....	234
4.7.1.1.- Reactividad IgG de la β-lactoglobulina glicosilada sin digerir .....	235
4.7.1.1.1.- Efecto del grado de glicosilación .....	235
4.7.1.1.2.- Efecto de la agregación proteica .....	236
4.7.1.2.- Inmunorreactividad de la β-Lg glicosilada y sometida a digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	237
4.7.1.2.1.- Efecto del grado de glicosilación .....	237
4.7.1.2.2.- Efecto de la agregación proteica .....	241
4.7.2.- Glicoconjugados de caseinato sódico .....	243
4.8.- Efecto sobre la microbiota intestinal .....	245
4.8.1.- Análisis por cromatografía de exclusión molecular de los glicoconjugados digeridos .....	246
4.8.2.- Estudios de fermentación <i>in vitro</i> .....	248
4.8.2.1.- Determinación del crecimiento de microorganismos puros .....	249
4.8.2.1.1.- Glicoconjugados de β-lactoglobulina .....	249
4.8.2.1.2.- Glicoconjugados de caseinato sódico .....	254
4.8.2.2.- Determinación del crecimiento de microorganismos en cultivos mixtos procedentes de muestras fecales .....	259
4.8.3.- Propiedades antiadherentes .....	264
4.8.3.1.- Efecto de los glicoconjugados digeridos sobre la adhesión bacteriana a mucina .....	266
4.8.3.2.- Ensayos competitivos de adhesión en presencia de lectinas .....	269
4.8.3.3.- Detección de factores de virulencia .....	272
<b>5.- CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>277</b>
<b>6.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>281</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS Y TABLAS

### FIGURAS

- Figura I1.** Estructura tridimensional del monómero de  $\beta$ -lactoglobulina (izquierda) y estructura del monómero con una molécula de ácido palmítico (C16:0) en el barril  $\beta$  (derecha) (estructura tomada de la base de datos de proteínas Brookhaven (PDB), depositada por Wu y col., 1999) ..... 6
- Figura I2.** Estructura tridimensional del dímero de  $\beta$ -lactoglobulina bovina (isoformas A y B). Estructura tomada de la PDB, depositada por Oliveira y col., 2001 ..... 7
- Figura I3.** Proceso de adsorción de las proteínas a las interfases aceite:aire/agua..... 14
- Figura I4.** Clasificación de las reacciones adversas a los alimentos (Fernández-Rivas y Miles, 2004)..... 23
- Figura I5.** Mecanismo del desarrollo de una reacción alérgica. Fuente: [http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/imagenes/tec\\_jrregueiro2\\_2.jpg](http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/imagenes/tec_jrregueiro2_2.jpg)..... 23
- Figura I6.** Alergia a alimentos mediada por IgE. Causas de alergia a alimentos en la Población Española. Datos obtenidos a partir de: Fernández-Rivas, 2009..... 24
- Figura I7.** Estructuras de los epítops presentes en los antígenos. Fuente: Molina y col., 2009 ..... 26
- Figura I8.** Etapas iniciales de la reacción de Maillard con D-glucosa (reordenamiento de Amadori) y con D-fructosa (reordenamiento de Heyns), siendo el compuesto de Heyns mayoritario el de la derecha (Dills, 1993)..... 32
- Figura I9.** Vías principales de degradación del compuesto de Amadori durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard (de acuerdo a Hodge, 1967)..... 33
- Figura I10.** Estructuras propuestas para algunos de los AGEs formados durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard (Henle, 2005 and Oliver y col., 2006a)..... 34



<b>Figura I11.</b> Proyecciones de Fischer de la D-Glucosa, D-Galactosa, D-Fructosa y D-Tagatosa (Stryer y col., 2003).....	39
<b>Figura I12.</b> Estructuras de la lactosa. Fuente: Fox y Kelly, 2006.....	41
<b>Figura I13.</b> Derivados de la lactosa de grado alimentario.....	42
<b>Figura I14.</b> Estructura del dextrano.....	43
<b>Figura I15.</b> Estructura de la piridoxamina.....	44
<b>Figura M1.</b> Reacción global del TNBS con los grupos amino primarios libres de las proteínas, dando lugar a derivados N-trinitrofenilo, los cuales absorben en el espectro de luz UV (340-365 nm) y visible (415-420 nm).....	72
<b>Figura M2.</b> Reacción global del OPA con los grupos amino primarios libres de las proteínas, en presencia de un agente reductor, dando lugar a compuestos altamente fluorescentes (isoindoles) que pueden ser cuantificados por espectrofluorimetría.....	73
<b>Figura M3.</b> Cromatograma obtenido por SEC de la mezcla de proteínas estándar. [1] Dextrano azul 2000; [2] albúmina sérica bovina; [3] ovoalbúmina; [4] $\alpha$ -quimotripsinógeno; [5] ribonucleasa A.....	79
<b>Figura M4.</b> Curvas de fluidez características de los fluidos newtonianos, pseudoplásticos y dilatantes.....	85
<b>Figura M5.</b> Sonificador empleado para formar las emulsiones. La figura ampliada muestra la sonda empleada para el control de la temperatura de la muestra.....	87
<b>Figura M6.</b> Cálculo de la constante de difusión ( $K_{Dif}$ ) de la proteína .....	92
<b>Figura M7.</b> Tensiómetro de gota (Tracker).....	92
<b>Figura M8.</b> Columna de espumas (Foamscan).....	95
<b>Figura M9.</b> Evolución del volumen de líquido, volumen de espuma y conductividad de la espuma. $\theta_f$ es el tiempo final de burbujeo.....	96

<b>Figura M10.</b> Especificidad de corte de las enzimas que participan durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	101
<b>Figura R1.</b> Evolución del contenido de 2-furoil/furil-metil-aminoácidos derivados de los compuestos de Amadori y de Heyns durante la formación de los conjugados $\beta$ -Lg:Gal/Tag: —■— $\beta$ -Lg:Gal 40°C; —■— $\beta$ -Lg:Gal 50°C; —◆— $\beta$ -Lg:Tag 40°C; —◆— $\beta$ -Lg:Tag 50°C. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.....	121
<b>Figura R2.</b> Determinación de la pérdida de grupos amino libres primarios de la $\beta$ -Lg durante la incubación con Gal o Tag a 40°C y 50°C por el método del TNBS (A) y del OPA (B). —■— $\beta$ -Lg:Gal 40°C; —■— $\beta$ -Lg:Gal 50°C; —◆— $\beta$ -Lg:Tag 40°C; —◆— $\beta$ -Lg:Tag 50°C.....	122
<b>Figura R3.</b> Representación de las formas acíclicas de los compuestos de Amadori y de Heyns, resaltándose el grupo ceto y el grupo aldeído, respectivamente, de los mismos.....	123
<b>Figura R4.</b> Evolución de la fluorescencia extrínseca (A) y de la absorbancia a 420 nm (B) durante la formación de los conjugados $\beta$ -Lg:Gal/Tag: —■— $\beta$ -Lg:Gal 40°C; —■— $\beta$ -Lg:Gal 50°C; —◆— $\beta$ -Lg:Tag 40°C; —◆— $\beta$ -Lg:Tag 50°C.....	124
<b>Figura R5.</b> Perfiles cromatográficos obtenidos mediante RP-LC-UV de la $\beta$ -Lg control calentada y glicada a 40°C durante 96 h con ambos azúcares y a 50°C durante 24 h con Gal y 48 h con Tag .....	125
<b>Figura R6.</b> Perfil electroforético de la $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40°C (A) y 50°C (B), obtenido tras el análisis de las muestras por IEF en un rango de pH 3-7.....	127
<b>Figura R7.</b> Espectros superpuestos de MALDI-TOF-MS de la $\beta$ -Lg nativa e incubada con Gal o Tag a 40°C durante 144 h.....	128
<b>Figura R8.</b> Perfiles electroforéticos de la $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40°C (A) y 50°C (B) obtenidos por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras.....	129
<b>Figura R9.</b> Perfiles cromatográficos, obtenidos por SEC bajo condiciones no desnaturizantes, de la $\beta$ -Lg incubada con Gal y Tag a 40°C durante 24 h (A) y a 50°C durante 48 h (B) y 144 h (C) .....	131

**Figura R10.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal o Tag durante 96 h a 40°C y durante 48 h a 50°C. —  $\beta$ -Lg nativa; \*  $\beta$ -Lg control calentada 96 h a 40°C y 48 h a 50°C; \*  $\beta$ -Lg control calentada 144 h a 40 y 50°C;  $\beta$ -Lg:Gal incubada — 96 h a 40 °C y — 48 h a 50 °C;  $\beta$ -Lg:Tag incubada — 96 h a 40 °C y — 48 h a 50 °C..... 133

**Figura R11.** Capacidad ligante de retinol de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag a 50°C. —  $\beta$ -Lg nativa; \*  $\beta$ -Lg control calentada 48 h; \*  $\beta$ -Lg control calentada 144 h; —  $\beta$ -Lg:Gal o —  $\beta$ -Lg:Tag 48 h; —  $\beta$ -Lg:Gal o —  $\beta$ -Lg:Tag 144 h..... 136

**Figura R12.** Espectros de MALDI-TOF-MS de la  $\beta$ -Lg nativa e incubada con Gal y Tag a 50 °C durante 144 h en presencia y en ausencia de PM..... 138

**Figura R13.** Evolución del contenido de 2-furoil/furil-metil-aminoácidos derivados de los compuestos de Amadori y de Heyns durante la incubación de la  $\beta$ -Lg con Gal/Tag en presencia y ausencia de PM, 6 días a 40 °C [—  $\beta$ -Lg:Gal; —  $\beta$ -Lg:Gal+PM; —  $\beta$ -Lg:Tag; —  $\beta$ -Lg:Tag+PM] y a 50 °C [—  $\beta$ -Lg:Gal; —  $\beta$ -Lg:Gal+PM; —  $\beta$ -Lg:Tag; —  $\beta$ -Lg:Tag+PM] ..... 140

**Figura R14.** Determinación por el método de antrona-ácido sulfúrico en microplaca de la pérdida de carbohidratos durante la incubación del control Gal/Tag y de la  $\beta$ -Lg glicada con Gal/Tag en ausencia y en presencia de PM durante 144 h a 40 y 50 °C. Gal a — 40 y — 50 °C; Gal+PM a — 40 y — 50 °C; Tag a — 40 y — 50 °C; Tag+PM a — 40 y — 50 °C;  $\beta$ -Lg:Gal a — 40 y — 50 °C;  $\beta$ -Lg:Gal+PM a — 40 y — 50 °C;  $\beta$ -Lg:Tag a — 40 y — 50 °C;  $\beta$ -Lg:Tag+PM a — 40 y — 50 °C..... 141

**Figura R15.** Cromatogramas de RP-LC-UV para la reacción entre la piridoxamina (PM) y la galactosa (Gal) o tagatosa (Tag), en ausencia de  $\beta$ -Lg, durante 24 h a 40°C y 50°C ..... 142

**Figura R16.** Cromatogramas de RP-LC-UV para la reacción entre la piridoxamina (PM) y la galactosa (Gal) o tagatosa (Tag), en presencia de  $\beta$ -Lg, durante 24 h a 40°C y 50°C ..... 143

**Figura R17.** Cromatogramas obtenidos por SEC bajo condiciones no desnaturizantes de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag incubados durante 48 y 144 h a 50°C en presencia y ausencia de PM..... 146

**Figura R18.** Evolución de la absorbancia a 420 nm de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag con y sin PM (A), de la Gal/Tag con y sin PM (B) y de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag con y sin PM, sustrayéndose la absorbancia debida a la interacción PM-carbohidrato (C). [A-B = C].  $\square$   $\beta$ -Lg:Gal ó Gal + PM 50°C;  $\diamond$   $\beta$ -Lg:Tag ó Tag + PM 50°C;  $\square$   $\beta$ -Lg:Gal ó Gal + PM 40°C;  $\diamond$   $\beta$ -Lg:Tag ó Tag + PM 40°C;  $\square$   $\beta$ -Lg:Gal ó Gal 50°C;  $\diamond$   $\beta$ -Lg:Tag ó Tag 50°C;  $\square$   $\beta$ -Lg:Gal ó Gal 40°C;  $\diamond$   $\beta$ -Lg:Tag ó Tag 40°C..... 149

**Figura R19.** Evolución del contenido en furosina derivada de los productos de Amadori (A y C) y desarrollo de color (Abs 420 nm) (B y D) durante el almacenamiento durante 96 h a 50 °C (A y B) y 24 h a 60 °C (C y D) de los glicoconjugados  $\square$  SC:Gal a 50 °C,  $\square$  SC:Gal a 60 °C,  $\diamond$  SC:Lac a 50 °C,  $\diamond$  SC:Lac a 60 °C,  $\ast$  SC:DX<sub>10</sub> a 50 °C y  $\ast$  SC:DX<sub>10</sub> a 60 °C ..... 152

**Figura R20.** Cromatogramas UV (A) y de la corriente total de iones (B) del SC nativo tras su análisis por LC-ESI-MS..... 154

**Figura R21.** Espectros deconvolucionados de ESI-MS para las formas glicadas de las fracciones 1, 3 y 4 (B) del conjugado SC:Lac (8 h, 60 °C) ..... 156

**Figura R22.** Cromatogramas UV y de la corriente total de iones del sistema SC:Lac (8 h, 60 °C) tras su análisis por LC-ESI-MS ..... 158

**Figura R23.** Cromatogramas obtenidos por SEC del  $\text{—}$  SC nativo y del  $\text{---}$  SC tratado con urea y DTT..... 160

**Figura R24.** Perfil de elución obtenido por SEC del SC glicado con Gal a 50 °C durante  $\text{—}$  4 h,  $\text{—}$  48 h,  $\text{—}$  72 h y  $\text{—}$  96 h..... 161

**Figura R25.** Variación del tamaño medio de partícula en función del tiempo de incubación para el SC control calentado y glicado con Gal, Lac y DX<sub>10</sub> a 50 y 60 °C..... 163

**Figura R26.** Cambios en el coeficiente de consistencia, K, y en el índice de flujo, n, del  $\text{—}$  SC control calentado, control calentado + carbohidrato [SC+Gal a  $\text{---}$  50 y  $\text{---}$  60 °C; SC+Lac a  $\text{---}$  50 y  $\text{---}$  60 °C; SC+DX<sub>10</sub> a  $\text{---}$  50 y  $\text{---}$  60 °C] y glicado [SC:Gal a  $\text{---}$  50 y  $\text{---}$  60 °C; SC:Lac a  $\text{---}$  50 y  $\text{---}$  60 °C; SC:DX<sub>10</sub> a  $\text{---}$  50 y  $\text{---}$  60 °C], incubados a 50 °C durante 96 h y a 60 °C durante 24 h. Todas las determinaciones se hicieron por

duplicado. Los datos representan la media, siendo la desviación estándar en todos los casos < 0,01..... 167

**Figura R27.** Variación de la viscosidad aparente con la velocidad de deformación para el SC nativo + carbohidrato [■ SC+Gal a t=0; ◆ SC+Lac a t=0] y SC glicado con Gal y Lac a 50 y 60 °C durante 96 y 24 h, respectivamente [SC:Gal a 50 °C ■ 4, ■ 48 y ■ 72 h; SC:Gal a 60 °C ■ 2, ■ 4 y ■ 8 h; SC:Lac a 50 °C ◆ 4, ◆ 48, ◆ 72 y ◆ 96 h; SC:Lac a 60 °C ◆ 2, ◆ 4, ◆ 8 y ◆ 24 h] ..... 169

**Figura R28.** Efecto de la glicosilación vía RM sobre la viscosidad aparente del SC glicado con Gal y Lac a 50 y 60 °C..... 170

**Figura R29.** Variación del módulo de almacenamiento (G') en función de la frecuencia aplicada (f, rad/s) y del tiempo de almacenamiento (t, h) para el SC control calentado y glicado con Gal y Lac, incubado durante 96 h a 50 °C y durante 24 h a 60 °C ..... 171

**Figura R30.** Dependencia de los módulos G' (símbolo cerrado) y G'' (símbolo abierto) de la frecuencia aplicada para los glicoconjugados SC:Gal a 50 °C ■ 48, ■ 72 y ■ 96 h (A); SC:Gal a 60 °C ■ 8 y ■ 24 h (C); SC:Lac a 50 °C ◆ 72 y ◆ 96 h (B); SC:Lac a 60 °C ◆ 8 y ◆ 24 h (D)..... 172

**Figura R31.** Aspecto de las emulsiones de SC inmediatamente después de su formación mediante homogeneización con el Ultra-turrax convencional o mediante ultrasonidos de alta intensidad (HI-US) ..... 175

**Figura R32.** Efecto del tratamiento térmico, del carbohidrato libre en solución y de la glicosilación vía RM con Gal, Lac y DX<sub>10</sub>, tanto en estados iniciales como avanzados, sobre el índice de actividad (EAI) (A) y estabilidad (ΔEAI, %) (B) emulsionante del SC. Los datos representan la media de 3 determinaciones realizadas por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar..... 179

**Figura R33.** Adsorción de la proteína glicada a la interfase aceite/agua durante la formación de la emulsión..... 181

<b>Figura R34.</b> Solubilidad a pH 7 y 5 de la $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, respectivamente.....	184
<b>Figura R35.</b> Variación de la presión superficial ( $\pi$ ) con el tiempo ( $\theta$ ) de las películas de proteína adsorbida ( <b>A</b> y <b>B</b> ) y comportamiento cinético durante la etapa de difusión ( <b>C</b> y <b>D</b> ) de la $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, respectivamente, a pH 7 ( <b>A</b> y <b>C</b> ) y pH 5 ( <b>B</b> y <b>D</b> ) .....	187
<b>Figura R36.</b> Variación del módulo dilatacional superficial (E) y del ángulo de fase ( $\phi$ ) con el tiempo ( $\theta$ ) ( <b>A</b> y <b>C</b> ) y con la presión superficial ( $\pi$ ) ( <b>B</b> y <b>D</b> ) de las películas de proteína adsorbida de $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, respectivamente, a pH 7.....	190
<b>Figura R37.</b> Variación del módulo dilatacional superficial (E) y del ángulo de fase ( $\phi$ ) con el tiempo ( $\theta$ ) ( <b>A</b> y <b>C</b> ) y con la presión superficial ( $\pi$ ) ( <b>B</b> y <b>D</b> ) de las películas de proteína adsorbida de $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, respectivamente, a pH 5.....	192
<b>Figura 38.</b> Valores obtenidos para los parámetros de formación de espumas OFC, FC, MD y $C_f$ con la $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h a pH 7 (barras rayadas) y pH 5 (barras sólidas) .....	194
<b>Figura R39.</b> Relación entre la velocidad de difusión ( $K_{Dif}$ ) hacia la interfase aire/agua y la capacidad total de espumeo (OFC) de la $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, respectivamente, a pH 7 ( <b>A</b> ) y pH 5 ( <b>B</b> ) .....	195
<b>Figura R40.</b> Estabilidad (tiempo de vida media, $\theta_{1/2}$ ) a pH 7 ( <b>A</b> ) y pH 5 ( <b>B</b> ) de las espumas con $\beta$ -Lg nativa, control calentada o glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, como agente estabilizante.....	196
<b>Figura R41.</b> Solubilidad a pH 7 y 5 del SC nativo, control calentado y glicado con Gal a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente.....	198
<b>Figura R42.</b> Variación de la presión superficial ( $\pi$ ) con el tiempo ( $\theta$ ) de las películas de proteína adsorbida ( <b>A</b> y <b>B</b> ) y comportamiento cinético durante la etapa de difusión ( <b>C</b> y <b>D</b> )	

del SC nativo, control calentado y glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente, a pH 7 (A y C) y pH 5 (B y D) ..... 200

**Figura R43.** Variación del módulo dilatacional superficial (E) y del ángulo de fase ( $\phi$ ) con el tiempo ( $\theta$ ) (A y C) y con la presión superficial ( $\pi$ ) (B y D) de las películas de proteína adsorbida del SC nativo, control calentado y glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente, a pH 7..... 202

**Figura R44.** Variación del módulo dilatacional superficial (E) y del ángulo de fase ( $\phi$ ) con el tiempo ( $\theta$ ) (A y C) y con la presión superficial ( $\pi$ ) (B y D) de las películas de proteína adsorbida del SC nativo, control calentado y glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente, a pH 5..... 204

**Figura R45.** Valores obtenidos para los parámetros de formación de espumas OFC, FC, MD y  $C_f$  con el SC nativo, control calentado y glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h a pH 7 (barras rayadas) y pH 5 (barras sólidas) ..... 205

**Figura R46.** Relación entre la velocidad de difusión ( $K_{Dif}$ ) hacia la interfase aire/agua y la capacidad total de espumeo (OFC) del SC nativo, control calentado y glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente, a pH 7 (A) y pH 5 (B) ..... 206

**Figura R47.** Estabilidad (tiempo de vida media,  $\theta_{1/2}$ ) a pH 7 (A) y pH 5(B) de las espumas con SC nativo, control calentado o glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, como agente estabilizante..... 207

**Figura R48.** Cromatogramas de RP-LC-UV de la  $\beta$ -Lg control calentada (A y B) y glicada (C y D) digeridas con pepsina durante 0 (A y C) y 120 min (B y D) ..... 211

**Figura R49.** Análisis por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (A) y perfiles cromatográficos obtenidos por RP-LC-UV (B) de la  $\beta$ -Lg control calentada (a) y glicada con Gal (b) o Tag (c) incubadas a 40°C durante 24 h, sometidas a digestión pepsinolítica durante 2 h seguida de digestión con tripsina/quimotripsina durante 15 min. M: marcadores de peso molecular..... 212

**Figura R50.** Perfiles cromatográficos obtenidos por RP-LC-UV de la  $\beta$ -Lg control calentada 36 h a 60 °C;  $\beta$ -Lg control calentada 60 h a 60 °C;  $\beta$ -Lg:DX<sub>10</sub> 36 h a 60 °C;  $\beta$ -Lg:DX<sub>20</sub> 60 h a

60 °C, sometidas a digestión con pepsina durante 2 h seguida de digestión con tripsina/quimotripsina durante 15 min..... 214

**Figura R51.** Perfiles cromatográficos obtenidos por RP-LC-UV de la  $\beta$ -Lg glicada con Gal o Tag incubadas 48 h a 50°C con y sin PM, sometidas a digestión con pepsina durante 2 h seguida de digestión con tripsina/quimotripsina durante 15 min..... 215

**Figura R52.** Análisis por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras de la  $\beta$ -Lg control calentada sin PM (a),  $\beta$ -Lg:Gal sin (b) y con (c) PM y  $\beta$ -Lg:Tag sin (d) y con (e) PM incubadas 48 h a 50°C, sometidas a digestión con pepsina durante 2 h seguida de digestión con tripsina/quimotripsina durante 15 min. M: marcadores de peso molecular..... 216

**Figura R53.** Cromatogramas de RP-LC-UV de: (A) el SC nativo sin digerir y control calentado digerido con pepsina durante 30 min, y (B) SC nativo sin digerir y glicosilado con Gal digerido con pepsina durante 30 min..... 218

**Figura R54.** Perfiles cromatográficos obtenidos por RP-LC-UV de: (A) el SC nativo sin digerir y control incubado digerido con pepsina durante 2 h y con tripsina/quimotripsina durante 15 min, y (B) el SC nativo sin digerir y glicado con Gal digerido con pepsina durante 2 h y con tripsina/quimotripsina durante 15 min..... 219

**Figura R55.** Rutas de disociación propuestas para los péptidos glicado con aldo- y ceto-hexosas tras el análisis por ESI(+)-MS<sup>2</sup>..... 224

**Figura R56.** Espectros de MS<sup>2</sup> de los iones monocargados correspondientes a: (A) el péptido de la  $\beta$ -Lg <sup>9</sup>GLDIQK\*VAGTWY<sup>20</sup> glicado con Gal a 40 °C durante 24 h; (B) el péptido de la  $\beta$ -Lg <sup>9</sup>GLDIQK\*VAGTWY<sup>20</sup> glicado con Tag a 40 °C durante 24 h; y (C) el péptido de la  $\beta$ -Lg <sup>9</sup>GLDIQK\*VAGTWY<sup>20</sup> glicado con Tag a 50 °C durante 48 h..... 225

**Figura R57.** Espectro de MS<sup>2</sup> del ión monocargado correspondiente al péptido sintético acetil- SDK\*P glicado con Gal a 40 °C durante 24 h..... 226

**Figura R58.** Espectros de MS<sup>3</sup> de iones monocargados correspondientes al péptido de la  $\beta$ -Lg <sup>9</sup>GLDIQK\*VAGTWY<sup>20</sup> glicado con Gal a 40 °C durante 24 h obtenidos a partir (A) del ión iminio ([M+H]<sup>+</sup> - 150) y (B) del ión del péptido no glicado ([M+H]<sup>+</sup> - 162) generados por colisión y derivados del análisis por MS<sup>2</sup>. La nomenclatura empleada para los fragmentos



iónicos fue la de Roepstorff y col. (1984) y Johnson y col. (1987); <sup>0</sup> indica la pérdida neutra de una molécula de agua..... 231

**Figura R59.** Espectros de MS<sup>3</sup> (A) y MS<sup>4</sup> (B) de los iones monocargados correspondientes al péptido de la β-Lg 71IAEK\*TK\*IPAVF<sup>82</sup> diglicado con Gal a 40 °C durante 24 h obtenido a partir del ión generado por colisión correspondiente al péptido no glicado ([M+H]<sup>+</sup> - 162) (denotado como X) derivado de los análisis por MS<sup>2</sup> y MS<sup>3</sup>, respectivamente. La nomenclatura empleada para los fragmentos iónicos fue la de Roepstorff y col. (1984) y Johnson y col. (1987); <sup>0</sup> indica la pérdida neutra de una molécula de agua..... 232

**Figura R60.** Efecto de la glicación sobre la reactividad IgG de la β-Lg a 40°C (A) y 50°C (B). A 40 °C: —●— β-Lg control calentada; —■— β-Lg:Gal; —◆— β-Lg:Tag. A 50 °C: β-Lg control calentada —○— con y —●— sin PM; β-Lg:Gal —□— con y —■— sin PM; β-Lg:Tag —◇— con y —◆— sin PM. Los datos representan la media de tres determinaciones..... 236

**Figura R61.** Reactividad IgG de la β-Lg nativa sin digerir y de los hidrolizados (pepsina 2 h + tripsina/quimotripsina 15 min) de la β-Lg control calentada y glicada, incubadas durante 24 h a 40°C..... 237

**Figura R62.** Secuencia primaria de la β-Lg bovina (variante genética B). En rojo aparecen marcados los epítomos lineales de unión a IgE de la β-Lg. Asimismo, los péptidos que sobreviven a la digestión gastrointestinal, cuya secuencia aminoacídica coincide con la de los epítomos de unión a IgE conocidos están subrayados. Los números indican la posición en la secuencia..... 240

**Figura R63.** Reactividad IgG de la β-Lg nativa sin digerir y de los hidrolizados (digestión con pepsina 2 h + digestión con tripsina/quimotripsina 15 min) de la β-Lg control calentada y glicada, incubadas durante 48 h a 50°C en presencia (A) y en ausencia (B) de PM..... 242

**Figura R64.** Perfiles electroforéticos obtenidos por SDS-PAGE de la β-Lg control calentada 24 h a 40 °C (a) y 48 h a 50 °C (c) y de la β-Lg incubada con Gal 24 h a 40 °C (b) y 48 h a 50 °C (d) tras su digestión gastrointestinal *in vitro*. M: marcadores de peso molecular..... 243

**Figura R65.** Estructuras de la tagatosa y lactulosa y de los compuestos de Amadori derivados de la glicación con Gal y Lac..... 246

**Figura R66.** Perfiles cromatográficos obtenidos por SEC de los glicoconjugados sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro* SC:Gal (A), SC:Lac (B),  $\beta$ -Lg:Gal (C) y  $\beta$ -Lg:Lac (D). Las posiciones de elución de las proteínas estándar aparecen indicadas por flechas: **a**, lisozima (14,4 kDa); **b**, aprotinina (6,5 kDa); **c**, insulina cadena B (3,5 kDa); **d**, insulina cadena A (2,5 kDa); **e**, triptófano (204 Da) ..... 247

**Figura R67.** Curvas de crecimiento de las bacterias ácido-lácticas aerobias estudiadas con glucosa, tagatosa y lactulosa y con los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal y Lac..... 250

**Figura R68.** Curvas de crecimiento de las bacterias ácido-lácticas aerobias estudiadas con glucosa, tagatosa y lactulosa y con los hidrolizados de la SC nativo, control calentado y glicado con Gal y Lac..... 256

**Figura R69.** Fotografías de las poblaciones de *Bifidobacterium* (A), *Clostridium* (B) y *Lactobacillus* (C) obtenidas de los medios de fermentación conteniendo muestras fecales y los sustratos estudiados sometidas a un procedimiento FISH para su recuento por el microscopio de fluorescencia..... 260

**Figura R70.** Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) (mM) a las 0 h y después de 10 h de fermentación en ausencia de carbohidrato (control 10h) y en presencia de tagatosa, lactulosa, el digerido de la  $\beta$ -Lg control calentada 24 h a 40 °C y el digerido del conjugado  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] ..... 263

**Figura R71.** Modelo de acción directa de oligosacáridos análogos a los receptores bacterianos en la prevención de infecciones. (A) Las adhesinas tipo lectinas bacterianas reconocen los receptores oligosacáridos en las células del epitelio intestinal; (B) inhibición de la adhesión bacteriana por carbohidratos estructuralmente similares a los glicanos receptores..... 265

**Figura R72.** Unión de lectinas (aglutinina de soja, SBA; aglutinina de cacahuete, PNA; y aglutinina de *Helix pomatia*, HPA) a diferentes depas de *E. coli* (CBL2, CBL8 y CBM1) (A) y efecto de los glicoconjugados digeridos  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] y SC:Gal [4 h, 60 °C] sobre la unión a SBA de las diferentes cepas de *E. coli* (B).....270

**Figura R73.** Genes de factores de virulencia detectados en las diferentes cepas de *E. coli* (CBL2, CBL8 y CBM1) ensayadas; antígenos fimbriales (K99, F41 y K88) y toxina termolábil (Hlt) ..... 273

## ESQUEMAS

<b>Esquema O1.</b> Esquema general del plan trabajo.....	63
<b>Esquema M1.</b> Modelo de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> empleado, consistente de dos fases consecutivas, una gástrica y otra duodenal.....	100
<b>Esquema M2.</b> Esquema de los métodos de ELISA directo e indirecto.....	106
<b>Esquema M3.</b> Esquema del método empleado para la determinación del crecimiento microbiano con los glicoconjugados de $\beta$ -Lg y SC digeridos como fuente de carbono.....	109
<b>Esquema M4.</b> Esquema del principio de la hibridación con fluorescencia <i>in situ</i> (FISH)..	112
<b>Esquema R1.</b> Rutas principales de formación de los principales productos derivados de la interacción entre la PM y aldohexosas. Basado en Adrover y col. (2007) .....	144

## TABLAS

<b>Tabla I1.</b> Características de las principales fracciones de caseína .....	10
<b>Tabla I2.</b> Aplicaciones industriales de los concentrados (WPC) y aislados (WPI) de seroproteínas y del caseinato sódico (SC). Datos adaptados de Cayot y Lorient, 1997 y Southward, 1989 .....	12
<b>Tabla I3.</b> Calidad de diversas proteínas alimentarias según la puntuación PDCAAS.....	19
<b>Tabla I4.</b> Principales secuencias de la $\beta$ -Lg propuestas como epítomos a partir de inmunoensayos realizados con sueros de individuos alérgicos a las proteínas de la leche de vaca .....	27
<b>Tabla I5.</b> Principales secuencias de las caseínas propuestas como epítomos a partir de inmunoensayos realizados con sueros de individuos alérgicos a las proteínas de la leche de vaca .....	28
<b>Tabla M1.</b> Condiciones de incubación de la $\beta$ -Lg y del SC con Gal, Lac, DX <sub>10</sub> y DX <sub>20</sub> .....	67
<b>Tabla M2.</b> Resumen de los análisis llevados a cabo con los glicoconjugados obtenidos para determinar el avance de la reacción de Maillard y su caracterización estructural .....	69
<b>Tabla M3.</b> Gradiente lineal empleado en la separación de los derivados ácidos de los compuestos de Heyns y Amadori por RP-LC-UV (Resmini y col., 1990) .....	70
<b>Tabla M4.</b> Gradiente lineal empleado en la separación de los conjugados $\beta$ -Lg:Gal/Tag por RP-LC-UV .....	74
<b>Tabla M5.</b> Gradiente lineal empleado en la separación de los compuestos de interacción PM-Gal/Tag por RP-LC-UV (Adrover y col., 2005) .....	75
<b>Tabla M6.</b> Programa empleado para la migración electroforética en geles Novex® IEF ...	75
<b>Tabla M7.</b> Gradiente lineal empleado en la separación de los conjugados SC:Gal/Lac por LC-ESI-MS .....	78

<b>Tabla M8.</b> Resumen de los estudios de funcionalidad tecnológica llevados a cabo con los glicoconjugados correspondientes .....	83
<b>Tabla M9.</b> Variables y niveles empleados en el diseño Box-Behnken .....	88
<b>Tabla M10.</b> Resumen de los estudios de funcionalidad biológica llevados a cabo con los glicoconjugados correspondientes .....	99
<b>Tabla M11.</b> Gradiente lineal empleado en la separación de los glicoconjugados digeridos <i>in vitro</i> por RP-LC-UV (Moreno y col., 2004) .....	102
<b>Tabla M12.</b> Gradiente lineal empleado en la separación de las mezclas de digestión tanto de la $\beta$ -Lg glicada como sin glicar por LC-ESI-MS <sup>n</sup> .....	104
<b>Tabla M13.</b> Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de factores de virulencia .....	117
<b>Tabla R1.</b> Número medio de moléculas de Gal o Tag unidas a la $\beta$ -Lg glicada estimado por MALDI-TOF- MS .....	129
<b>Tabla R2.</b> Porcentaje de las formas dimérica, trimérica y oligomérica de la $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 144 h, estimado tras su análisis por SEC bajo condiciones no desnaturalizantes .....	132
<b>Tabla R3.</b> Hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ), medida como fluorescencia del ANS, de la $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal o Tag incubada durante 144 h a 40 y 50 °C .....	135
<b>Tabla R4.</b> Promedio de moléculas, estimado por MALDI-TOF-MS, de Gal o Tag unidas a la $\beta$ -Lg tras la glicosilación no-enzimática en presencia y ausencia de PM .....	139
<b>Tabla R5.</b> Porcentaje de las formas dimérica, trimérica y oligomérica de $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con PM a 40 y 50°C durante 144 h, estimado después de su análisis por SEC en condiciones no desnaturalizantes. También se muestran las relaciones polímero/dímero obtenidas en ausencia de PM .....	147

<b>Tabla R6.</b> Masas moleculares de la $\kappa$ -caseína (variante genética A), $\alpha_{s1}$ -caseína (variante genética B) y $\beta$ -caseína (variante genética A2) y número de moléculas de Gal y Lac unidas al SC tras su glicación, estimado por LC-ESI-MS .....	157
<b>Tabla R7.</b> Porcentaje de las fracciones de alto ( $AP_m$ ) y bajo ( $BP_m$ ) peso molecular (kDa) del SC nativo, control calentado y glicado con Gal, Lac y DX <sub>10</sub> a 50 y 60 °C, estimado por SEC bajo condiciones no desnaturizantes .....	162
<b>Tabla R8.</b> Hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ), medida como fluorescencia del ANS, del SC nativo, control calentado y glicado con Gal, Lac y DX <sub>10</sub> .....	164
<b>Tabla R9.</b> Diseño Box-Behnken con los valores obtenidos experimentalmente para los índices de actividad (EAI) y estabilidad ( $\Delta$ EAI, %) emulsionante de las emulsiones con SC (0,5 mg·mL <sup>-1</sup> ) como agente emulsionante .....	177
<b>Tabla R10.</b> Péptidos no glicosados identificados por LC-ESI-MS <sup>2</sup> en los digeridos de la $\beta$ -Lg control calentada y glicada con Gal y Tag .....	222
<b>Tabla R11.</b> Péptidos glicosados identificados por LC-ESI-MS <sup>2</sup> en los digeridos de la $\beta$ -Lg glicada con Gal y Tag .....	227
<b>Tabla R12.</b> Efecto de la glicación con Gal y posterior digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> sobre la respuesta contra anticuerpos IgE de la $\beta$ -Lg .....	238
<b>Tabla R13.</b> Epítomos IgE lineales mayoritarios en la $\beta$ -Lg .....	239
<b>Tabla R14.</b> Efecto de la glicación con DX <sub>10</sub> y DX <sub>20</sub> y posterior digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> sobre la respuesta contra anticuerpos IgE de la $\beta$ -Lg .....	241
<b>Tabla R15.</b> Efecto de la glicación con Gal y posterior digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> sobre la reactividad IgE del SC .....	244
<b>Tabla R16.</b> Velocidades máximas de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ , h <sup>-1</sup> ) y tiempos de fase de latencia (lag, h) de las bacterias ácido-lácticas ensayadas tras la fermentación con glucosa, tagatosa, lactulosa y los digeridos de los conjugados $\beta$ -Lg:Gal/Lac como fuente de carbono (datos normalizados) .....	251

**Tabla R17.** Valores de densidad óptica ( $DO_{600}$ ) después de 24 h de crecimiento de las cepas anaerobias utilizando como fuentes de carbono glucosa, lactulosa, tagatosa y los digeridos de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Lac ..... 253

**Tabla R18.** Velocidades máximas de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ,  $h^{-1}$ ) y tiempos de fase de latencia (lag, h) de las bacterias ácido-lácticas ensayadas tras la fermentación con glucosa, tagatosa, lactulosa y los digeridos de los conjugados SC:Gal/Lac como fuente de carbono (datos normalizados) ..... 257

**Tabla R19.** Valores de densidad óptica ( $DO_{600}$ ) después de 24 h de crecimiento de las cepas anaerobias utilizando como fuentes de carbono glucosa, lactulosa, tagatosa y los digeridos de los conjugados SC:Gal/Lac ..... 258

**Tabla R20.** Cambios en las poblaciones bacterianas ( $\text{Log}_{10}$  células/mL muestra) de los cultivos fecales *in vitro* tras 10 h de incubación en presencia de los diferentes sustratos estudiados ..... 261

**Tabla R21.** Efecto de los diferentes glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC digeridos sobre la adhesión (expresada como porcentajes de fluorescencia) de las cepas de *E. coli* CBL2, CBL8 y CBM1 a mucina ..... 268



## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS EMPLEADOS**

En este apartado se detallan las abreviaturas y acrónimos utilizados en esta Memoria, así como sus correspondientes significados. Si bien la mayor parte de términos de origen inglés han sido traducidos al español de acuerdo con las reglas existentes sobre nomenclatura, se han mantenido, en su versión original, aquellos términos o acrónimos cuya traducción al castellano no está suficientemente implantada y cuyo empleo podría dar lugar a confusión.

**AAE:** Aminoácidos esenciales

**ANS:** ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico

**AGEs:** Advanced glycation endproducts

**$\alpha$ -CN:**  $\alpha$ -Caseína

**$\alpha$ -La:**  $\alpha$ -Lactalbúmina

**$\beta$ -CN:**  $\beta$ -Caseína

**$\beta$ -Lg:**  $\beta$ -Lactoglobulina

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**DAPI:** 4,6-Diamidino-2-fenilindol

**D.O:** Densidad óptica

**DX<sub>10</sub>:** Dextrano de 10 kDa

**DX<sub>20</sub>:** Dextrano de 20 kDa

**E:** Enzima

**FISH:** Fluorescencia con hibridación *in situ*

**IEF:** Electroforesis en geles de poliacrilamida por isoelectroenfoque

**Gal:** Galactosa

**GRAS:** Generally recognized as safe

**$\kappa$ -CN:**  $\kappa$ -Caseína

**Lac:** Lactosa

**LC-ESI-MS:** Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray.

**MALDI-TOF-MS:** Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción con láser asistida por matriz.

**MS:** Espectrometría de Masas

**OPA:** Oftaldehído

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDCAAS:** Protein digestibility corrected amino acid score.

**PM:** Piridoxamina

**PRM:** Producto de la reacción de Maillard

**RET:** Retinol

**RM:** Reacción de Maillard

**RP-LC-UV:** Cromatografía líquida em fase inversa con detección ultravioleta

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

**S:** Sustrato

**SC:** Caseinato sódico

**SCFAs:** Ácidos grasos de cadena corta

**SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

**SEC:** Cromatografía de exclusión molecular.

**Tag:** Tagatosa

**TNBS:** ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

## **1. INTRODUCCIÓN**



El **suero de quesería o lactosuero**, el cual se define como la fracción de leche que permanece en disolución tras la precipitación ácida (suero ácido) o coagulación enzimática (suero dulce) de las caseínas en la elaboración del queso, es el subproducto más importante de la industria láctea. Se estima que, aproximadamente, el 90% del total de la leche utilizada en la elaboración del queso se elimina como lactosuero, el cual retiene cerca del 55% del total de ingredientes de la leche original (Liu y col., 2005), siendo las proteínas solubles (proteínas del lactosuero o seroproteínas) y la lactosa los nutrientes mayoritarios. Según Almécija (2007), la distribución de la producción de lactosuero en el mundo en el año 2005 (últimos datos disponibles) fue: Europa 53% (España 1%), América del Norte y central 28%, Asia 6%, África 5%, Oceanía 4% y América del Sur 4%. Anualmente, estos porcentajes representan 110-115 millones de toneladas métricas de lactosuero (Briczinski y Roberts, 2002; Revillion y col., 2003; Londoño, 2006).

Debido a la gran cantidad de materia orgánica presente en su composición, el lactosuero es un producto con una demanda bioquímica de oxígeno muy elevada (DBO<sub>5</sub>, 35000-50000 mg de oxígeno/L fluyente), siendo uno de los residuos más contaminantes de la industria alimentaria (Ghaly y Kamal, 2004; Mukhopadhyay y col., 2005; Koutinas y col., 2009; Almeida y col., 2009). Hoy en día, la importancia del cuidado del medio ambiente ha hecho necesario el tratamiento del suero, previo a su eliminación, el cual resulta antieconómico dada la gran inversión necesaria para la instalación de una planta de tratamiento, siendo ésta comparable a la inversión de una planta productora de ingredientes derivados (Peters, 2005). Esto, junto con la fuerte demanda mundial de fuentes adicionales de proteínas y el reconocimiento de la calidad de las seroproteínas, ha promovido un cambio de actitud hacia el suero lácteo (Johnson y Lucey, 2006), considerándolo, en la actualidad, uno de los ingredientes más valorados tanto por el valor nutricional de sus componentes como por la funcionalidad de los mismos. En este sentido, el desarrollo de la técnicas de filtración por membranas a gran escala, económicamente viables, y su integración a la industria láctea ha contribuido en gran medida al aprovechamiento del lactosuero, posibilitando la separación, recuperación y concentración de sus constituyentes, así como la creación de nuevos productos (Pouliet, 2008).

Actualmente, en países con una industria láctea desarrollada, el suero es procesado, obteniéndose, lactosuero en polvo, concentrados (WPC, con un 35, 50, 65 y 80% de proteína) y aislados (WPI, > 88% de proteína) proteicos, siendo la  **$\beta$ -lactoglobulina bovina ( $\beta$ -Lg)**, proteína mayoritaria del lactosuero, la principal responsable de la funcionalidad de tales productos (Christiansen y col., 2004; Neiryneck y col., 2004; Firebaugh y Daubert, 2005; Herceg y col., 2007). Estos son utilizados como ingrediente para la mejora de una amplia

variedad de alimentos y bebidas para consumo humano (entre ellos, productos lácteos, cárnicos, derivados de cereales, bebidas derivadas de frutas, salsas, sopas, pasta, suplementos dietéticos y bebidas para deportistas) y, en menor medida, en alimentación animal (Foegeding y col. 2002; Henning y col., 2006).

Por otro lado, las **caseínas**, proteínas mayoritarias de la leche, se llevan extrayendo a partir de la leche, principalmente por precipitación ácida (caseína ácida), desde el siglo pasado, obteniéndose alrededor de 3 Kg. de producto por cada 100 L de leche desnatada tratada (Southward, 1989).

Hasta la década de los 60, su aplicación consistió básicamente en la elaboración de productos no alimentarios, como pegamentos, pinturas, plásticos y cubiertas protectoras (p.ej, acabado del cuero y fibras sintéticas, recubrimiento de papel y películas de envoltura en embalajes). Sin embargo, el reconocimiento de su calidad proteica y funcionalidad ha llevado, en los últimos años, a un creciente interés por su aplicación como ingrediente en la formulación de múltiples productos alimenticios, con el fin de incrementar su valor nutricional y carácter funcional (Southward, 1989). Sin embargo, debido a la insolubilidad de la caseína ácida, para uso alimentario se emplean, fundamentalmente, los caseinatos, obtenidos a partir de ésta por neutralización con diferentes álcalis (hidróxido de sodio, potasio, calcio o amonio), los cuales presentan una mayor solubilidad y, por tanto, un mayor rango de aplicación que la caseína original.

Actualmente, la producción mundial anual de caseína y caseinatos es de alrededor de 250.000 toneladas (Law y Leaver, 2007), siendo Australia y Nueva Zelanda los principales productores. Ambos países destinan aproximadamente el 70% del caseinato producido a alimentación, siendo los caseinatos cálcico y, especialmente, sódico los elegidos para este fin (Southward, 1989). Concretamente, el caseinato sódico (SC) es uno de los ingredientes más versátiles empleados en la industria alimentaria debido a su elevada solubilidad, mayor que la de las caseínas y otros caseinatos, como el cálcico y el potásico, y a sus excelentes propiedades funcionales, siendo profusamente empleado como ingrediente funcional en la elaboración de galletas, cereales de desayuno, margarinas bajas en calorías, mezclas para helado, crema para café, cremas al licor, cremas batidas, derivados cárnicos, embutidos y fiambres (Vega, 2006).

## **1.1 PROTEÍNAS LÁCTEAS**

La funcionalidad tecnológica y biológica de las proteínas está determinada en gran medida por sus características estructurales, incluyendo tamaño molecular, conformación, composición y secuencia de aminoácidos, carga neta, distribución de carga, hidrofobicidad/hidrofilicidad, estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, flexibilidad molecular y rigidez (Fox, 2003). De modo que, con el fin de profundizar en la búsqueda de procedimientos para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas del lactosuero y caseínas y, así, ampliar su rango de aplicabilidad en la industria, en primer lugar, es necesario conocer su estructura en detalle.

### **1.1.1 Características estructurales**

#### **1.1.1.1 $\beta$ -lactoglobulina bovina**

La  $\beta$ -lactoglobulina bovina ( $\beta$ -Lg), con una concentración aproximada en la leche de 3 g/L, representa el 10 % del contenido proteico total de la leche y alrededor del 50 % de la fracción proteica del lactosuero (Creamer y Sawyer, 2003). Además de estar presente en la leche de vaca, la  $\beta$ -Lg también se encuentra en la leche de la mayoría de los mamíferos, excepto en la de roedores, lagomorfos y humanos (Kontopidis y col., 2004).

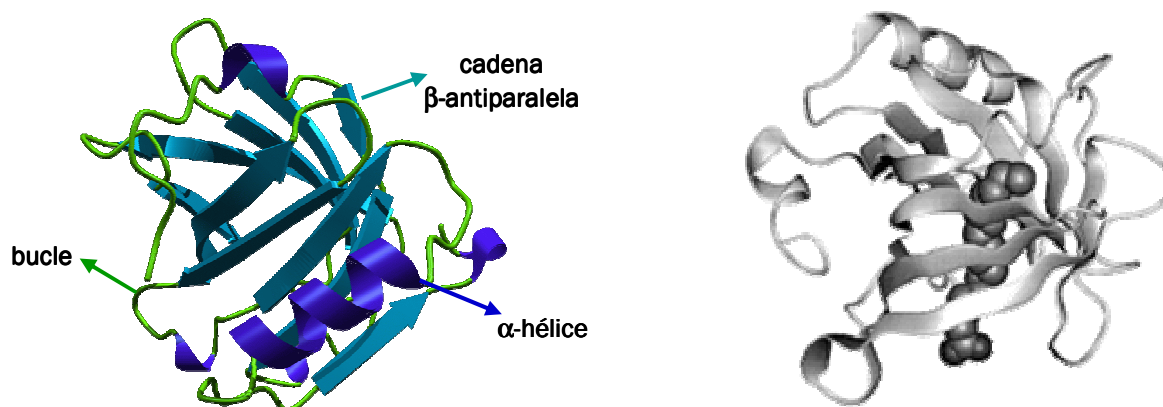
La  $\beta$ -Lg bovina madura es una proteína globular de pequeño tamaño, formada por una sola cadena polipeptídica de 162 aminoácidos, con un peso molecular de 18.4 kDa y un punto isoelectrico de 5.2 aproximadamente (Pervaiz y Brew, 1985; Zydney, 1998; Sawyer y Kontopidis, 2000). Existen al menos 9 variantes genéticas, siendo las más comunes las llamadas A y B, que difieren en dos aminoácidos. La variante A tiene un Asp<sub>64</sub> y una Val<sub>118</sub>, mientras que la variante B presenta Gly<sub>64</sub> y Ala<sub>118</sub>. Esta pequeña diferencia da lugar a variantes con un comportamiento distinto durante el procesado y el predominio de una u otra va a influir notablemente en las propiedades de la leche.

La determinación de la estructura terciaria o conformación tridimensional de la  $\beta$ -Lg se ha llevado a cabo por cristalografía de rayos X (Papiz y col., 1986; Brownlow y col., 1997) y técnicas de RMN (Uhrinova y col., 1998). La  $\beta$ -Lg, al igual que el resto de las proteínas del lactosuero, es una proteína muy compacta y altamente estructurada, con un alto nivel de  $\alpha$ -hélices y cadenas  $\beta$  antiparalelas. En concreto, su estructura nativa está formada

principalmente por nueve cadenas  $\beta$  antiparalelas (nombradas A-I) y una  $\alpha$ -hélice en el extremo C-terminal de la molécula. Ocho de las nueve cadenas  $\beta$  (A-H), conectadas entre sí por 7 bucles, se pliegan para formar una estructura denominada barril  $\beta$ . La cavidad central de éste proporciona a la  $\beta$ -Lg un sitio de unión de ligandos hidrofóbicos, característico de las proteínas de la familia de las lipocalinas. Sobre la superficie externa del barril  $\beta$ , entre las cadenas G y H, está la  $\alpha$ -hélice de triple giro (Kontopidis y col., 2004) (**Figura I1**).

La  $\beta$ -Lg contiene dos puentes disulfuro intramoleculares (Cys<sup>106</sup>-Cys<sup>119</sup> y Cys<sup>66</sup>-Cys<sup>160</sup>) y un grupo tiol libre (Cys<sup>121</sup>) (McKenzie, 1971), que participan en la estabilización de la estructura terciaria de la  $\beta$ -Lg en el medio acuoso, junto con otras interacciones del tipo puentes de hidrógeno, hidrofóbicas y electrostáticas.

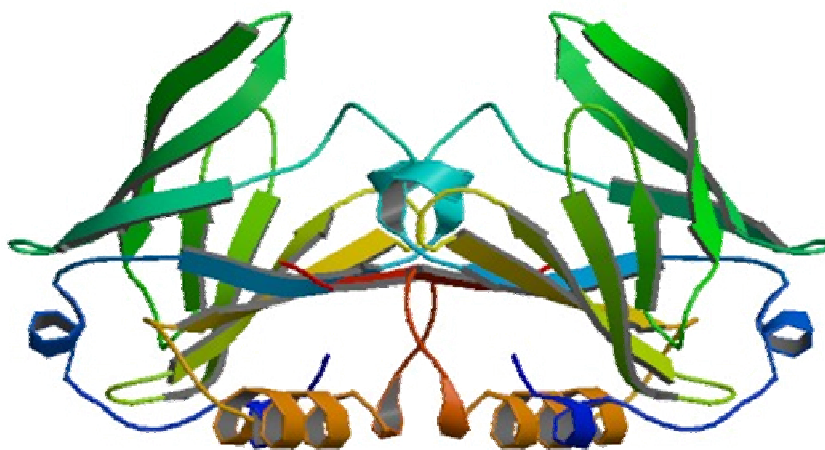
La distribución de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de la cadena polipeptídica de la  $\beta$ -Lg es bastante aleatoria. Tras el plegamiento de la molécula, la mayoría de los residuos apolares quedan ocultos en el interior de la proteína y los polares en la superficie, en contacto con el solvente, de forma que, a pesar de ser la más hidrofóbica de las proteínas del lactosuero, la  $\beta$ -Lg presenta una elevada solubilidad en agua (Delaney, 1976; Kinsella, 1984; Robin y col., 1993), lo cual va a determinar en gran medida su funcionalidad.



**Figura I1.** Estructura tridimensional del monómero de  $\beta$ -lactoglobulina (izquierda) y estructura del monómero con una molécula de ácido palmítico (C16:0) en el barril  $\beta$  (derecha) (estructura tomada de la base de datos de proteínas Brookhaven (PDB), depositada por Wu y col., 1999).



A temperatura ambiente y pH de la leche (aprox. 6.7), la  $\beta$ -Lg se encuentra principalmente en forma de dímero ( $P_m \sim 36$  kDa), estabilizado por interacciones no covalentes (**Figura I2**). Sin embargo, se ha observado que la  $\beta$ -Lg experimenta una serie de cambios conformacionales en función del pH del medio, que van a influir en gran medida tanto en su funcionalidad tecnológica como biológica.



**Figura I2.** Estructura tridimensional del dímero de  $\beta$ -lactoglobulina bovina (isoformas A y B). [Estructura tomada de la PDB, depositada por Oliveira y col., 2001.](#)

A pH 5 - 8 la  $\beta$ -Lg se encuentra en forma de dímero, el cual, entre pH 6,5 y 7,8, experimenta una serie de cambios conformacionales reversibles que, en conjunto, reciben el nombre de “Transición Tanford”. Durante ésta, uno de los 7 bucles que unen las cadenas  $\beta$  antiparalelas al barril  $\beta$ , concretamente, el bucle EF (residuos 85-90), experimenta un cambio conformacional en función del pH, actuando, de este modo, como una puerta de entrada al sitio de unión de ligandos situado en el interior del barril  $\beta$  (Tanford y Nozaki, 1959; Brownlow y col., 1997; Qin y col., 1998; Uhrinova y col., 2000; Ragona y col., 2003; Kontopidis y col., 2004).

A valores de pH extremos ( $< 2$  o  $> 8$ ) la  $\beta$ -Lg existe, principalmente, en forma monomérica y a pH  $> 9$  se produce la desnaturalización irreversible del monómero por álcali, la cual se acelera a temperaturas de refrigeración (Georges y Guinand, 1960; McKenzie y Sawyer, 1967; Waissbluth y Grieger, 1974; Azuaga y col., 1992). Además, la variante A tiene la particularidad de formar octámeros (4 dímeros) entre pH 3,5 y 6,5 (con un máximo a pH

4,5), especialmente a bajas temperaturas (Pessen y col., 1985). Este comportamiento de asociación-disociación dependiente del pH, proporciona a la  $\beta$ -Lg una estructura altamente rígida y compacta, directamente relacionada con su elevada estabilidad estructural frente a los cambios en el pH y fuerza iónica del medio, así como con su gran resistencia frente a la proteólisis enzimática y pH ácido del estómago.

Asimismo, a temperaturas elevadas, la  $\beta$ -Lg experimenta un proceso de desnaturalización, el cual va a alterar su estructura de la siguiente manera:

**1. Disociación del dímero y desnaturalización parcial de la proteína nativa:** a  $5,2 \leq \text{pH} < 7,4$  y a temperaturas  $> 30^\circ\text{C}$  se produce la disociación del dímero de  $\beta$ -Lg en monómeros. Estos van perdiendo su estructura terciaria rígida y parte de su estructura secundaria a medida que aumenta la temperatura, lo cual resulta muy evidente a pH neutro y  $55\text{-}60^\circ\text{C}$  (Belloque y Smith, 1998; Sawyer, 2003; Rytönen, 2006).

**2. Agregación inducida por calor:** la proteína desnaturalizada experimenta un cambio conformacional irreversible que resulta en una mayor exposición de los grupos hidrofóbicos y del grupo tiol libre, anteriormente ocultos en el interior de la molécula (McKenzie y Sawyer, 1967; Cairoli y col., 1994; Hoffmann y col., 1997). Este cambio conformacional promueve la agregación de las moléculas desnaturalizadas vía interacciones no covalentes (iónicas, van der Waals e hidrofóbicas) entre los grupos expuestos y, principalmente, vía reacciones de intercambio tiol-disulfuro, que promueven la formación de puentes disulfuro intermoleculares (Hoffmann y van Mil, 1999). La agregación irreversible es bastante evidente a pH neutro y temperaturas entre  $70$  y  $80^\circ\text{C}$ .

Este proceso puede tener lugar durante los tratamientos a los que se somete el lactosuero (evaporación, concentración, secado...) para la obtención de los WPC y WPI y/o durante el procesado de los alimentos a los que estos sean adicionados. Como consecuencia de las modificaciones producidas en la estructura de la  $\beta$ -Lg, la funcionalidad de los WPC y WPI en los alimentos se va a ver afectada.

#### **1.1.1.2 Caseínas y caseinato sódico**

La fracción caseínica de la leche, la cual representa aproximadamente el 80% de su contenido proteico, es una fracción heterogénea constituida esencialmente por 4 familias diferentes de caseínas:  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ - ( $\alpha_{S1}$ -CN,  $\alpha_{S2}$ -CN,  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN), las cuales

representan aproximadamente un 38%, 10%, 36% y 12% de la caseína completa. El resto son fragmentos de las caseínas principales, especialmente de la  $\beta$ - y  $\alpha_{s2}$ -CN, formados como resultado de la acción proteolítica de la plasmina presente en la leche. Los péptidos resultantes incluyen las  $\gamma$ - y  $\lambda$ - caseínas y proteosa-peptonas.

Las  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ - CN maduras son proteínas de pequeño tamaño, todas ellas constituidas por una sola cadena polipeptídica y con diversas variantes genéticas, la cuales difieren en su secuencia de aminoácidos (variación de uno o dos aminoácidos), peso molecular, punto isoelectrico, existencia de puentes disulfuro intra- e intermoleculares (sólo en el caso de las  $\alpha_{s2}$ - y  $\kappa$ -CN, únicas con residuos de Cys) y grado de glicosilación (sólo en el caso de la  $\kappa$ -CN, única proteína glicosilada de la leche) (**Tabla I1**). Además, tras la biosíntesis, las  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ - CN experimentan fosforilación en los residuos de serina y, ocasionalmente, de treonina, siendo el grado de fosforilación otro factor de variabilidad entre las distintas familias de caseína, así como entre las distintas variantes genéticas de una misma familia (**Tabla I1**).

Asimismo, se ha observado que existe una relación directa entre el grado de fosforilación y su tendencia a agregarse y precipitar en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, las  $\alpha_{s1}$ - y  $\alpha_{s2}$ -CN, con el número más elevado de residuos de serina fosforilados en su estructura (ver **Tabla I1**), son las más sensibles al calcio, mientras que la  $\kappa$ -CN, con un sólo grupo serina fosfato (ver **Tabla I1**), es la única caseína soluble en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . De manera que, en condiciones normales, las moléculas de  $\kappa$ -CN se asocian con el resto de las moléculas de caseína, protegiéndolas de la precipitación en presencia de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  de la leche y formando complejas estructuras micelares que se mantienen en suspensión al pH de la leche (Horne, 2006). Durante la producción de caseinato sódico (SC), sin embargo, la precipitación ácida y posterior neutralización rompe la estructura micelar, disponiéndose las moléculas de caseína en forma de ovillos aleatorios.

**Tabla 11.** Características de las principales fracciones de caseína.

Proteína	Concentración (g/L)	Rango de peso molecular (Da)	Peso molecular medio (Da)	pI	Residuos de amino ácidos			Variantes genéticas	
					Total	Pro	Cys		
$\alpha_{1s1}$ -caseína	10	22.066 - 23.722	23.164	4,91 - 5,35	199	17	0	8	A, B, C, D, E, F, G, H
$\alpha_{1s2}$ -caseína	2,6	25.148 - 25.388	25.388	5,19 - 5,39	207	10	2	10 - 13	A, B, C, D
$\beta$ -caseína	9,3	23.939 - 24.089	23.983	5,11 - 5,85	209	35	0	5	A <sup>1</sup> , A <sup>2</sup> , A <sup>3</sup> , B, C, D, E, F, G
$\kappa$ -caseína	3,3	11.600 - 20.500	19.038	5,8 - 6,0	169	20	2	1	A, B, C, D, E, F <sup>s</sup> , F <sup>i</sup> , G <sup>s</sup> , H, I, J

Datos adaptados de Fox, 2003 y van der Ven, 2002.





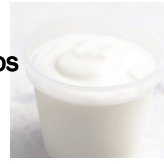
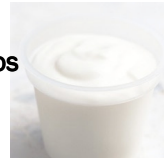
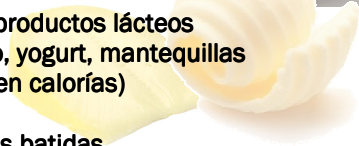


En cuanto a la estructura tridimensional de las caseínas, varios análisis por dicroísmo circular, espectrometría infrarroja, dispersión óptica rotatoria y RMN han evidenciado la limitada estructura secundaria y terciaria de las caseínas en disolución acuosa (Sawyer y Holt, 1992), como consecuencia de la abundancia y distribución uniforme de residuos de prolina a lo largo de la cadena polipeptídica de todas las caseínas, especialmente de la  $\beta$ -CN. De modo que, las caseínas poseen una conformación abierta y muy flexible, la cual está relacionada con su elevada hidrofobicidad superficial, susceptibilidad a la proteólisis y estabilidad al calor (Fox y Kelly, 2006). Además, la desestabilización micelar durante la producción del SC proporciona a las moléculas de caseína una estructura más abierta y flexible, lo que mejora notablemente la funcionalidad del SC con respecto a la de las caseínas y otros productos derivados, tales como los concentrados y aislados de caseína, con una estructura fundamentalmente micelar.

Por otro lado, la distribución de residuos polares y apolares a lo largo de la secuencia aminoacídica de las caseínas es bastante irregular, presentando áreas fuertemente hidrofóbicas y áreas hidrofílicas (constituidas por residuos de serina fosforilados y, por tanto, fuertemente aniónicas) a lo largo de la cadena polipeptídica, que proporcionan una elevada hidrofobicidad superficial y carga neta a la proteína. Asimismo, debido a su elevado carácter hidrofóbico, las caseínas aisladas en disolución, especialmente la  $\beta$ -CN, tienen una alta tendencia a asociarse con otro material hidrofóbico, así como a agregarse con ellas mismas. A pH neutro, los agregados de caseína se mantienen en disolución, sin embargo, la reducción del pH hasta un próximo a su  $pI$  o la adición de iones  $Ca^{2+}$ , u otros iones cargados, produce su agregación a través de interacciones hidrofóbicas y su precipitación.

### **1.1.2 Funcionalidad tecnológica**

La funcionalidad tecnológica de la  $\beta$ -Lg y del SC está principalmente determinada por sus propiedades emulsionantes, espumantes y reológicas, así como por su solubilidad, de la cual van a depender en gran medida las anteriores (Dalglish, 2006; Damodaran, 1997). En la [Tabla I2](#) se recogen algunos de los productos alimenticios en los que los WPC, WPI y SC encuentran aplicación gracias a tales propiedades.

**Tabla I2.** Aplicaciones industriales de los concentrados (WPC) y aislados (WPI) de seroproteínas y del caseinato sódico (SC). Datos adaptados de Cayot y Lorient, 1997 y Southward, 1989.

<b>Aplicación industrial</b>	<b>Propiedad tecno-funcional</b>	<b>Proteína empleada</b>
 <b>Productos de panadería</b>	Capacidad de retención de agua	<b>WPC, WPC+SC</b>
 <b>Confitería y repostería</b>	Agente emulsionante Texturizante	<b>WPC+SC</b>
 <b>Chocolate de repostería</b>	Agente espumante	<b>WPC</b>
 <b>Elaboración de galletas</b>	Capacidad de retención de agua Dispersibilidad de la grasa	<b>WPI, SC</b>
 <b>Elaboración de cereales de desayuno</b>	Agente estabilizador de la emulsión Agente espumante Agente gelificante	<b>WPC</b>
 <b>Helados</b>	Agente emulsionante y estabilizador de la emulsión Agente espumante Agente gelificante	<b>WPC+SC</b>
 <b>Otros productos lácteos (queso, yogurt, mantequillas bajas en calorías)</b>	Agente estabilizador de la emulsión Capacidad de retención de agua Agente gelificante	<b>SC, WPC+SC, WPI</b>
<b>Cremas batidas</b>	Agente emulsionante y estabilizante	<b>SC</b>
<b>Crema para café</b>	Agente emulsionante	<b>SC</b>
 <b>Bebidas alcohólicas (cremas al licor)</b>	Agente estabilizador de la emulsión Aspecto turbio	<b>WPC+SC, WPC, WPI</b>
<b>Pasta y snacks</b>	Texturizante	<b>SC</b>
 <b>Productos cárnicos</b>	Agente emulsionante Capacidad de retención de agua (textura cremosa y suave) Adhesividad	<b>WPC, WPI, WPI+SC</b>
<b>Salsas y sopas</b>	Agente estabilizador de la emulsión Agente espesante	<b>WPC+SC</b>

### **1.1.2.1 Solubilidad**

La solubilidad de las proteínas está fundamentalmente relacionada con su balance de hidrofobicidad/hidrofilicidad superficial y con su carga superficial (capacidad de hidratación). Además, la solubilidad proteica en disolución acuosa depende de las condiciones del medio,

entre ellas el pH, la temperatura, la fuerza iónica y la interacción con otros componentes químicos (Damodaran, 1997a; Kiosseoglou, 2003).

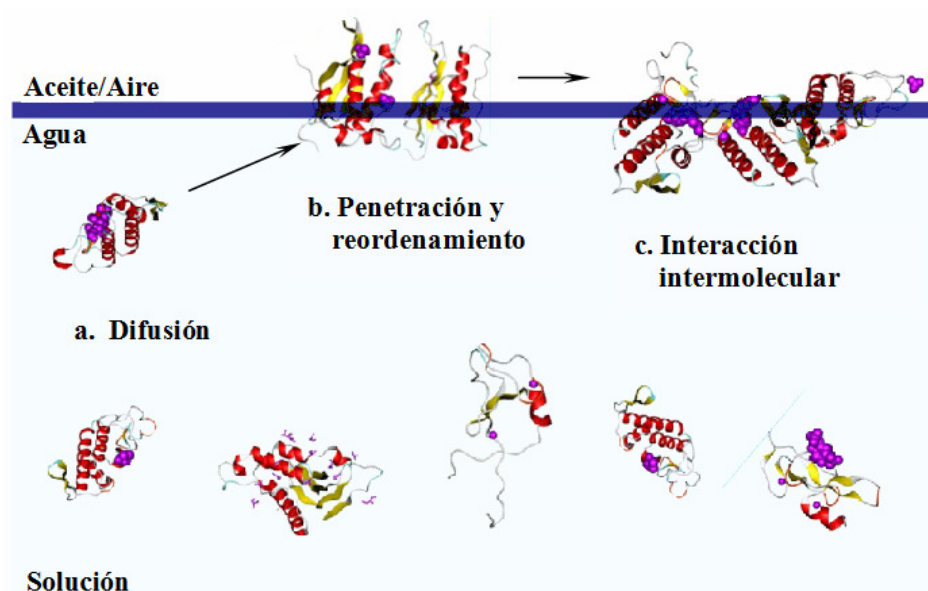
En general, a  $\text{pH} > \text{pI}$ , el **SC** presenta una elevada solubilidad en agua, la cual mejora al aumentar el pH del medio y la temperatura. Sin embargo, en las proximidades de su  $\text{pI}$ , pH 3-5, cuando la repulsión electrostática entre las moléculas de proteína y la hidratación iónica son mínimas y la interacción hidrofóbica entre los grupos apolares de la superficie proteica es máxima, el SC es insoluble, lo cual restringe su empleo en alimentos ácidos (Zayas, 1997).

Por el contrario, la  $\beta$ -Lg en estado nativo mantiene una elevada solubilidad en un amplio rango de pH, incluso en las proximidades de su  $\text{pI}$  ( $\text{pH} = 4,8-5,2$ ), debido a su elevada estabilidad estructural frente a los cambios en el pH del medio, así como al elevado número de grupos hidrofílicos que presenta en superficie, cuya hidratación crea fuerzas de repulsión lo suficientemente grandes como para contrarrestar la agregación vía interacciones hidrofóbicas, promovida por la proximidad al  $\text{pI}$  (Damodaran, 1997a). Esto hace que el empleo de la  $\beta$ -Lg nativa como agente activo sea adecuado en alimentos ácidos, tales como bebidas carbonatadas o bebidas fortificadas con proteínas, como zumos de frutas y bebidas para deportistas (Chatterton y col., 2006). Sin embargo, a diferencia de las caseínas y del SC, altamente termoestables, la desnaturalización y agregación irreversible de la  $\beta$ -Lg por encima de 70 °C la hace sensible a los cambios en el pH del medio, presentando la  $\beta$ -Lg desnaturalizada una solubilidad mínima a pH 4,6 (Zhu y Damodaran, 1994).

#### **1.1.2.2 Propiedades emulsionantes y espumantes**

Las dispersiones alimentarias (emulsiones y espumas) son sistemas termodinámicamente inestables, al presentar mayor energía libre que las fases que los constituyen por separado. Por ello, no se forman espontáneamente, sino que requieren un aporte de energía para aumentar el área interfacial de la fase dispersa, es decir, romper las gotas de aceite o burbujas de aire en otras más pequeñas, así como la presencia de *surfactantes* o *tensioactivos*, como por ejemplo las proteínas. Éstas, debido a su carácter anfílico, tienen una elevada afinidad por las interfases fluido/fluido, siendo capaces de difundir desde el seno de la disolución acuosa y adsorberse a las mismas, reduciendo su tensión interfacial y estabilizando el sistema.

En la **Figura 13**, se muestran las principales etapas que pueden tener lugar durante la adsorción de las proteínas a las interfases aceite:aire/agua, las cuales pueden darse por separado, superponerse u ocurrir al mismo tiempo.



**Figura 13.** Proceso de adsorción de las proteínas a las interfases aceite:aire/agua.

### ➤ **Propiedades emulsionantes**

A  $\text{pH} \neq \text{pI}$ , el **SC** se distingue por su excelente capacidad para formar emulsiones alimentarias, debido a su elevada hidrofobicidad superficial y solubilidad en el medio acuoso y, por tanto, a su fuerte tendencia a adsorberse a las interfases aceite/agua. Asimismo, el SC da lugar a emulsiones muy estables, lo cual se ha atribuido principalmente a su gran flexibilidad conformacional y elevada carga neta. La flexibilidad de la cadena polipeptídica permite el despliegue y reordenamiento de las moléculas de proteína adsorbidas a la interfase, de forma que los segmentos hidrofóbicos quedan inmersos en la interfase, ejerciendo una elevada presión superficial, mientras que los segmentos hidrofílicos, con residuos de serina fosforilados y, por tanto, fuertemente aniónicos, quedan suspendidos en el medio acuoso, favoreciendo la estabilización de la emulsión frente a la floculación (agregación de dos o más gotas colindantes) y coalescencia (ruptura de la película adsorbida por colisión entre gotas) por repulsión estérica y electrostática entre las gotas. Sin embargo, la insolubilidad del SC a valores de pH por debajo de 5,5, próximo a su pI, afecta en gran



medida sus propiedades emulsionantes, retardando la difusión del mismo hacia la interfase, así como induciendo su precipitación en la interfase y, consecuentemente, la desestabilización de la emulsión por coalescencia.

En cuanto a la  $\beta$ -Lg, a pesar de no presentar una hidrofobicidad superficial muy elevada y de poseer una conformación rígida y compacta, es también un agente emulsionante altamente eficiente, frecuentemente empleado en productos lácteos, como el helado, para prevenir la agregación y coalescencia de los glóbulos de grasa. Esto se debe a que, a diferencia de otras proteínas globulares, como la  $\alpha$ -lactalbúmina, la  $\beta$ -Lg es capaz de desnaturalizarse fácilmente en la interfase aceite/agua, lo cual la proporciona una mayor actividad superficial. Además, la  $\beta$ -Lg da lugar a emulsiones altamente estables, por un lado, mediante la formación de películas resistentes y rígidas, como resultado de su polimerización interfacial vía reacciones de intercambio tiol-disulfuro, y por otro lado, impidiendo la floculación y coalescencia de las gotas de aceite a través de la repulsión estérica ejercida por las regiones de proteína no desnaturalizada que quedan suspendidas en el medio acuoso. Asimismo, se ha observado que, debido a su elevada solubilidad en un amplio rango de pH, sus propiedades emulsionantes se van a ver afectadas en menor medida que las del SC en las proximidades de su pI (Foley y O'Connell, 1990). Además, varios estudios han mostrado que la desnaturalización térmica controlada de la  $\beta$ -Lg da lugar a pequeños agregados a pH 5 y a pequeños polímeros a pH 7, lo cual facilita la gelificación de la proteína en la interfase, incrementando, así, su habilidad para formar una interfase cohesiva y, por tanto, una emulsión más estable. Por el contrario, cuando la  $\beta$ -Lg se somete a un tratamiento térmico severo (especialmente a pH 5, pero también a pH 7) sus propiedades emulsionantes disminuyen, debido a la formación de complejos de elevado peso molecular, que ralentizan la adsorción de la proteína a la interfase aceite/agua (Foley y O'Connell, 1990).

#### ➤ **Propiedades espumantes**

Debido a su elevada flexibilidad e hidrofobicidad superficial y molecular, el **SC** presenta una elevada tendencia a adsorberse a la interfase aire/agua. Sin embargo, se ha observado que éste no da lugar a espumas estables, ya que, debido a su elevado carácter hidrofóbico, las interacciones intermoleculares en la interfase van a ser débiles, principalmente de naturaleza hidrofóbica, dando lugar a películas frágiles, es decir, sin una fuerza mecánica lo suficientemente grande como para estabilizar la espuma, la cual se rompe al poco tiempo de su formación. Por este motivo, el SC no se emplea, apenas, como agente espumante. En

algunos casos, se usa para dar expansión a la espuma en combinación con otros materiales, especialmente grasa, la cual es parcialmente emulsionada por el SC, proporcionando la rigidez a la interfase aire/agua.

A diferencia del SC, la  $\beta$ -Lg da lugar a espumas altamente estables, debido a su capacidad para formar fuertes puentes disulfuro en la interfase, los cuales aportan rigidez y un elevado carácter viscoelástico a la película interfacial. Asimismo, se ha observado que los aislados de  $\beta$ -Lg presentan una mayor capacidad estabilizante que la  $\alpha$ -La y que los WPC, siendo, por este motivo, esencial el contenido de  $\beta$ -Lg para las propiedades espumantes de estos últimos (Charbonnel y col., 1994). Por todo ello, los aislados de  $\beta$ -Lg son ampliamente usados por la industria alimentaria como agentes espumantes, principalmente, en productos de confitería, proporcionando, además, una alternativa más económica a la albúmina de la clara de huevo en merengues y productos similares (Holt, 2000; Euston y col., 2001; Christiansen y col., 2004; Firebaugh y Daubert, 2005; Foegeding y col., 2006; Herceg y col., 2007). Asimismo, se ha observado que la  $\beta$ -Lg en estado nativo da lugar a espumas altamente estables a un pH próximo a su pl y que su desnaturalización térmica controlada mejora su capacidad para estabilizar espumas, especialmente a pH 2 y 5 (Closs, 1990).

### **1.1.2.3 Propiedades reológicas: viscosidad y propiedades gelificantes**

La elevada flexibilidad molecular y conformación abierta del **SC** proporcionan a éste un elevado volumen hidrodinámico (volumen efectivo ocupado por las moléculas), el cual está directamente relacionado con su habilidad para retener considerables cantidades de agua, dando lugar a dispersiones con una viscosidad mayor que la de dispersiones constituidas por una concentración similar de proteínas globulares, como por ejemplo la  $\beta$ -Lg. Por este motivo, el SC se emplea a menudo como agente espesante en varios alimentos líquidos y semi-sólidos (como salsas, sopas y algunas bebidas), mejorando su textura y consistencia.

Por el contrario, la estructura altamente compacta de la  $\beta$ -Lg es la responsable de su pequeño volumen hidrodinámico y baja capacidad de retención de agua, haciendo que las disoluciones de  $\beta$ -Lg sean poco viscosas, incluso a elevadas concentraciones de proteína. Sin embargo, se ha observado que la desnaturalización parcial por calor de la  $\beta$ -Lg resulta en un aumento de su volumen hidrodinámico y, por tanto, en una mayor capacidad de retención de agua, haciendo posible la obtención de soluciones más viscosas. Esto permite la aplicación de la  $\beta$ -Lg en productos cárnicos, de confitería, derivados de pescado y otros

muchos productos prefabricados, a los que confiere jugosidad y estabilidad después del cocinado.

Con respecto a las propiedades gelificantes de las proteínas, se ha descrito que éstas están determinadas principalmente por la flexibilidad molecular de las mismas, incluyendo su habilidad para desnaturalizarse y dar cadenas extendidas, y especialmente, para entrecruzarse y formar redes tridimensionales (Oakenfull y col., 1997).

Los geles de **caseínas/caseinatos** se forman por tratamiento con enzimas proteolíticas o por acidificación (precipitación isoeléctrica). Sin embargo, a pesar de su buena capacidad de retención de agua y elevada viscosidad de sus dispersiones, las caseínas/caseinatos no son capaces de formar geles fuertes por sí mismos, no pudiéndose emplear en alimentos con este fin.

Con respecto a las proteínas del lactosuero, la gelificación inducida por calor, mediante la desnaturalización y posterior agregación de las proteínas, es la más habitual. Debido a sus buenas propiedades de gelificación por calor, la  **$\beta$ -Lg** encuentra aplicación en alimentos donde se requieren una elevada capacidad de retención de agua y texturización, incluyendo productos cárnicos, de confitería y derivados de pescado, entre otros. Además, la opacidad y elasticidad de los geles formados a partir de la  $\beta$ -Lg pueden ser manipuladas fácilmente mediante el control de la concentración de proteína y condiciones químicas durante la gelificación (ej. pH y fuerza iónica) (Dufour y col., 1998), lo que amplía el rango de aplicación de esta proteína. Así, mientras que a pH ácido y alcalino, se forman geles viscoelásticos, fuertes y translúcidos, a valores de pH cercanos al pI se forman geles débiles y opacos.

### **1.1.3 Funcionalidad biológica**

Además de una elevada funcionalidad tecnológica, las proteínas lácteas presentan un amplio rango de propiedades bio-funcionales, incluyendo un elevado valor nutricional y múltiples propiedades bioactivas, ampliamente reconocidas. Éstas han contribuido a que las proteínas lácteas sean consideradas, hoy en día, como un ingrediente de gran interés, ampliamente utilizado en la formulación de bebidas y productos alimenticios nuevos con el fin de satisfacer las necesidades del consumidor actual.

### **1.1.3.1 Propiedades nutricionales**

#### **1.1.3.1.1 Digestibilidad**

Tanto las caseínas como las proteínas del lactosuero son altamente digeribles, sin embargo, existen diferencias en cuanto a su comportamiento durante el proceso digestivo. Al pH ácido del estómago las **caseínas** se agregan y precipitan formando coágulos y, debido a su estructura tan poco compacta, son rápida y exhaustivamente degradadas por las enzimas digestivas. La  $\beta$ -Lg, sin embargo, se caracteriza por ser muy estable, permaneciendo soluble en el medio ácido del estómago (pH 2,0 -2,5, tras la ingestión de alimentos) (Reddy y col., 1988; Dalgalarondo y col., 1995). A este pH se disocia reversiblemente dando lugar a dos monómeros iguales, que mantienen su estructura globular nativa, la cual dificulta el acceso a las enzimas proteolíticas, fundamentalmente a la pepsina del estómago (Sakai y col., 2000). Esto provoca que pueda llegar al intestino delgado prácticamente intacta, permitiendo que su absorción sea a través de un sector más largo de éste. Su largo paso por el intestino aumenta la probabilidad de absorción intestinal tanto de los péptidos formados como de la proteína sin hidrolizar y facilita una gran variedad de funciones, como la interacción con la flora gastrointestinal o con los minerales presentes en el bolo alimenticio mejorando su absorción (Jiménez-Guzmán y García-Garibay, 2006).

#### **1.1.3.1.2 Calidad proteica**

Como es bien sabido, las proteínas lácteas juegan un papel muy importante en la función nutricional de la leche consistente en satisfacer la demanda de nitrógeno para el crecimiento, la síntesis y la reparación tisular. Un concepto importante que da una idea de la capacidad de una proteína para desempeñar este papel, es la calidad proteica. Ésta está principalmente determinada por el perfil, proporción y biodisponibilidad de los aminoácidos esenciales que la componen, la cual va a variar en función de la fuente proteica, de los tratamientos a los que se someta durante el procesado y de su interacción con otros componentes de la dieta presentes en el alimento.

En la actualidad, el método sugerido para evaluar la calidad proteica es el cómputo químico o score de aminoácidos (mg de aminoácidos de la proteína en estudio/mg de aminoácidos en la proteína de referencia) corregido por la digestibilidad proteica (PDCAAS, "*protein digestibility corrected amino acid score*"), empleándose, normalmente, como proteína de referencia el patrón de aminoácidos propuesto para niños mayores de 1 año y

adultos por la FAO en 1985 o por el Instituto de Medicina (IOM) de E.E.U.U en 2002 (IOM, 2002) (Suárez López y col., 2006).

Según el PDCAAS, tanto las proteínas del lactosuero como las caseínas tienen una elevada calidad proteica, debido a su buena digestibilidad y elevado contenido en aminoácidos esenciales, siendo las proteínas del lactosuero las que presentan el valor de PDCAAS más elevado en relación al de otras proteínas alimentarias (**Tabla 13**) (Stephen, 2006; Haines, 2005).

**Tabla 13.** Calidad de diversas proteínas alimentarias según la puntuación PDCAAS.

Proteína	Gluten de trigo	Cárnica	Soja	Huevo	Caseína	Suero lácteo
<b>Total AAE<sup>a</sup></b>	---	---	49	49,97	48,9	55,67
<b>Total BCAA<sup>b</sup></b>	---	---	19,1	20,45	20,4	24,1
<b>PDCAAS</b>	0,25	1	1	1	1	1,14

<sup>a</sup> Aminoácidos esenciales: arginina, isoleucina, lisina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina (mg/100g proteína).

<sup>b</sup> Aminoácidos de cadena ramificada: leucina, isoleucina y valina.

Además, las proteínas del lactosuero son una de las fuentes más ricas en aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina), los cuales desempeñan una importante función en el organismo como reguladores de la síntesis y degradación (proteólisis) de proteínas. De forma que, bajo condiciones extremas como el ejercicio anaeróbico prolongado, favorecen la síntesis proteica y biodisponibilidad de los carbohidratos como fuente de energía, deteniendo la degradación (catabolismo) del músculo (Walzem y col., 2002).

Debido a su elevada calidad proteica, las seroproteínas y las caseínas se emplean en la elaboración de productos especiales tales como barras energéticas, así como bebidas, preparados médicos y concentrados proteicos destinados a la alimentación de los deportistas.

### **1.1.3.2 Propiedades bioactivas**

En las últimas décadas, diversas investigaciones han establecido la importante actividad biológica de las proteínas lácteas. Así, recientemente, se ha observado que las

caseínas, especialmente la  $\beta$ -CN, poseen una elevada capacidad atrapadora de radicales libres, contribuyendo a la **capacidad antioxidante** de la leche en mayor medida que la  $\beta$ -Lg. Esto está directamente relacionado con su composición aminoacídica y conformación abierta, permitiendo una exposición mayor de los residuos de Tyr y Trp, principales aminoácidos antioxidantes (Clausen y col., 2009).

Con respecto a la  $\beta$ -Lg, actualmente, se cree que ésta podría participar en la digestión, absorción intestinal y posterior metabolismo de los triglicéridos, ácidos grasos de cadena larga, esteroides y retinol durante el periodo de lactancia de los terneros (Pérez y col., 1992; Kushibiki y col., 2001; Kontopidis y col., 2004). Esta función podría estar relacionada con su elevada estabilidad frente al pH ácido del estómago y a la acción proteolítica de las enzimas digestivas, así como con su capacidad para transportar ligandos hidrofóbicos, fisiológicamente relevantes, gracias a la conformación pH-dependiente de su sitio específico de unión (Futterman y Heller, 1972; Brown, 1984; Cho y col., 1994; Sawyer y col., 1998; Wu y col., 1999).

Por otra parte, diversos estudios han mostrado que la  $\beta$ -Lg, químicamente modificada con ácido 3-hidroxiftálico anhídrido o esterificada, presenta un **efecto antiviral *in vitro***, efectivo contra ciertos virus tales como el de la inmunodeficiencia humana (VIH) 1 y 2, inmunodeficiencia de los simios, herpes simplex tipo 1 y 2 y rotavirus (Berkhout y col., 1997; Oevermann y col., 2003; Wyand y col., 1999; Sitohy y col., 2007). Asimismo, Ouwehand y col. (1997) encontraron que la **adhesión de cepas patogénas** de *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli* a glicoproteínas de la pared intestinal humana era **inhibida** por la  $\beta$ -Lg de forma dosis-dependiente, potenciando la inmunidad pasiva del neonato. Tal actividad podría estar relacionada con su contenido relativamente alto en aminoácidos azufrados. Asimismo, las proteínas del lactosuero, incluyendo la  $\beta$ -Lg, han demostrado retardar el desarrollo de tumores intestinales en ratas jóvenes más eficazmente que otras proteínas alimentarias (cárnicas o de soja). Además, entre todas las proteínas del lactosuero, sólo la  $\beta$ -Lg parece capaz de **inhibir la melanogénesis** en cultivos de melanocitos humanos (Nakajima y col., 1997; Chatterton, 2006), así como de **unir aminas heterocíclicas mutagénicas**, proporcionando, así, protección contra su efecto carcinogénico (Yoshida y col., 1991).

Adicionalmente, también hay que considerar la actividad de **péptidos bioactivos** que, además de su valor nutricional, pueden ejercer diversas funciones fisiológicas beneficiosas. Estos péptidos se encuentran en forma inactiva dentro de la secuencia aminoacídica de las proteínas, pudiendo ser liberados, bien durante el procesado del alimento o la digestión gastrointestinal, o bien, mediante hidrólisis enzimática o fermentación *in vitro*.

Según varios estudios la digestión de la  **$\beta$ -Lg** con distintas enzimas proteolíticas da lugar a diversos péptidos con **actividad antihipertensiva**, entre ellos el  $\beta$ -lactosin B (residuos 142-145; secuencia ALPM), inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, y la  $\beta$ -lactorfina (residuos 102-105; secuencia YLLF), **agonista del receptor opioide**, el cual potencia notablemente la relajación muscular *in vitro* en ratas espontáneamente hipertensas, mejorando, por tanto, su función arterial (Sipola y col., 2002; Murakami y col., 2004; Chatterton y col., 2006); **actividad hipocolesterolémica *in vivo*** (residuos 71-75; secuencia IIAEK) mayor que la del  $\beta$ -sitosterol (hipocolesterolémico comercial) (Nagaoka y col., 2001); **actividad antioxidante**, presentando el péptido con la secuencia WYSLAMAASDI una actividad antioxidante ligeramente mayor que la del antioxidante comercial BHA (butilhidroxianisol) (Hernandez-Ledesma y col., 2008); **actividad inmunoestimuladora *in vitro*** (capacidad para mejorar el funcionamiento fagocítico celular) (Biziulevičius y col., 2006); y **actividad antimicrobiana *in vivo*** contra cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Pihlanto-Leppälä y col., 1999; El-Zahar y col., 2004).

Las **caseínas** parecen ser, sin embargo, la fuente más importante de péptidos bioactivos. Entre ellos, se han aislado péptidos con **actividad opiácea**, tales como las casomorfina, derivados de la  $\alpha$ -CN (exorfina) y  $\beta$ -CN ( $\beta$ -casomorfina) (Schanbacher y col., 1998), capaces, éstas últimas, de modular el transporte intestinal de aminoácidos, así como de reducir la secreción gástrica y la motilidad intestinal, por lo que actualmente existe un gran interés por su posible papel beneficioso en el tratamiento de la diarrea (Daniel y col., 1993; Defilippi y col., 1995; Meisel, 1998). También se han descrito los péptidos de **actividad opioide antagonista**, como las casoxinas, derivadas de la  $\kappa$ -CN, las cuales podrían antagonizar el efecto de inhibición de la motilidad gástrica inducida por las  $\beta$ -casomorfina (Creamer y MacGibbon, 1996). Asimismo, se ha descrito que la  $\beta$ -casoquinina (en el extremo C-terminal de la  $\beta$ -CN) y el péptido YGG de la  $\kappa$ -CN inducen una **proliferación significativa de linfocitos** en ratas y humanos, respectivamente (Coste y col., 1992; Kayser y Meisel, 1996). Con **actividad antimicrobiana**, se han descubierto fragmentos de la  $\alpha$ -CN, conocidos como isracidina, que muestran *in vivo* un efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* (Lahov y Regelson, 1996). Asimismo, los denominados **caseínofosfopéptidos** pueden funcionar como transportadores de diferentes minerales, especialmente calcio y hierro (Sato y col., 1986; Kitts y Yuan, 1992) y como factores anticariogénicos, al inhibir la formación de caries a través de la recalcificación del diente (Reynolds, 1987). La digestión de las caseínas puede también dar lugar a péptidos con diversos efectos sobre el sistema cardiovascular. En concreto, se han descrito tres péptidos de la  $\alpha_{s1}$ -CN y dos de la  $\beta$ -CN, con **actividad antihipertensiva** (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina) (Schlimme y

Meisel, 1995), y péptidos derivados del extremo C-terminal de la  $\kappa$ -CN, las casoplatelinas, con **actividad antitrombótica** (Jollés y col., 1986). Por último, cabe destacar al **caseínmacropéptido bovino (CMP)**, al cual posee numerosas funciones biológicas, la mayoría de ellas atribuidas a su contenido en ácidos siálicos, tales como el ácido N-acetil-neuramínico. Entre ellas, cabe destacar su capacidad para: modular la secreción pancreática y del vaciamiento gástrico; estimular el crecimiento de bacterias lácticas y bifidobacterias con carácter probiótico (Azuma y col., 1984; Bouhallab y col., 1993; Idota y col., 1994); prevenir la formación de la placa y caries dental (Neeser, 1987; Neeser y col., 1988, 1994); modular el desarrollo cerebral del lactante; inhibir la infección por el virus de la gripe (Kawasaki y col., 1993); y prevenir los desórdenes gastrointestinales causados por la adhesión de patógenos tales como el *Vibrio cholerae* (Kawasaki y col., 1992).

#### **1.1.4 Alergenicidad**

A pesar de los numerosos efectos beneficiosos que presentan tanto la  $\beta$ -Lg como las caseínas, su aplicación como ingredientes alimentarios puede verse limitada por su alergenidad (Wal, 2001; El-Agamy, 2007).

##### **1.1.4.1 Alergia a la leche y productos lácteos**

Las **alergias alimentarias** se definen como aquellas reacciones adversas a los alimentos, debidas a su ingestión, contacto o inhalación, las cuales implican una respuesta anormal, exagerada, del sistema inmune a ciertos componentes de los mismos (alérgenos alimentarios) (Bush y Efle, 1996), siendo las alergias más frecuentes las mediadas por anticuerpos o inmunoglobulinas de la clase E (IgE) (hipersensibilidad de tipo I o alergia de tipo inmediato). Es importante diferenciarlas de las reacciones tóxicas provocadas por los alimentos, así como de las intolerancias alimentarias (**Figura I4**). La etiología de las alergias mediadas por IgE conlleva una primera fase de sensibilización (producida en la primera ingestión del alimento que contiene el alérgeno), durante la cual se estimula el sistema inmune y la producción de anticuerpos IgE específicos, y una segunda fase de reacción cruzada (producida en un contacto subsiguiente con el alérgeno), durante la cual se produce la interacción antígeno-anticuerpo, que desencadena la activación de los mastocitos y la liberación del contenido de sus gránulos, incluyendo histamina y otras sustancias químicas que inducen los síntomas clínicos específicos (**Figura I5**).



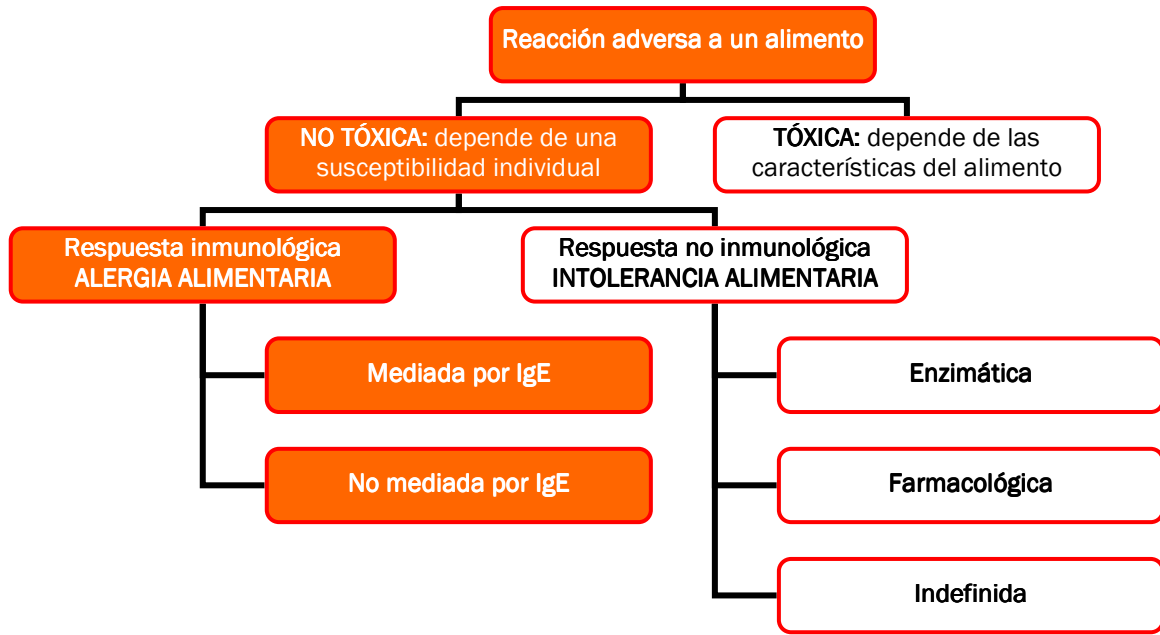


Figura I4. Clasificación de las reacciones adversas a los alimentos (Fernández-Rivas y Miles, 2004).

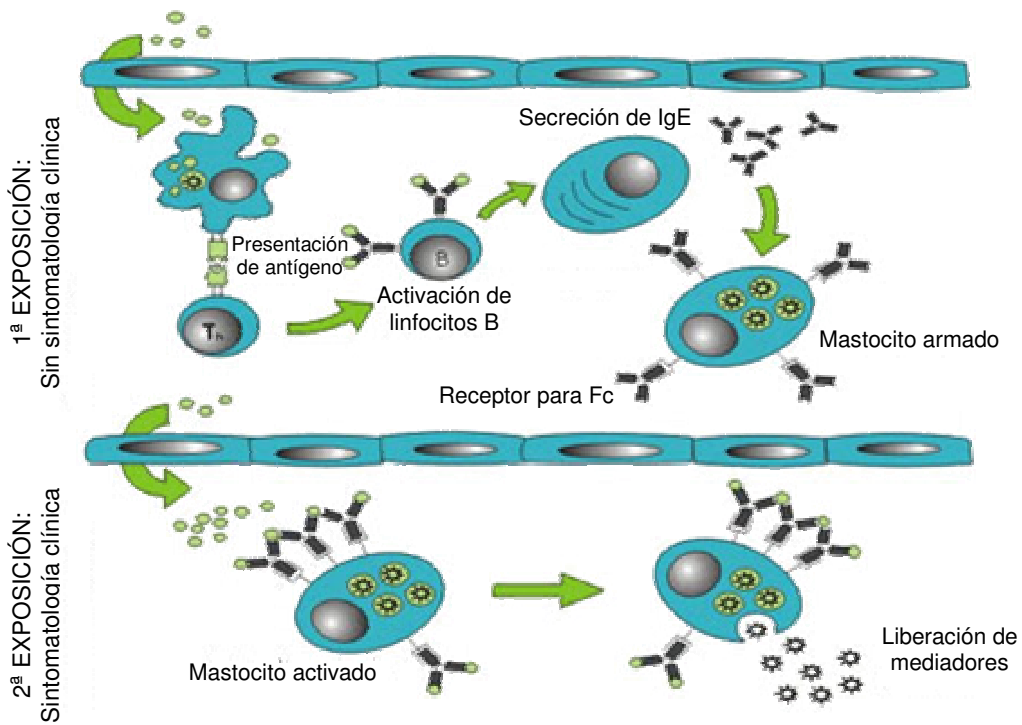
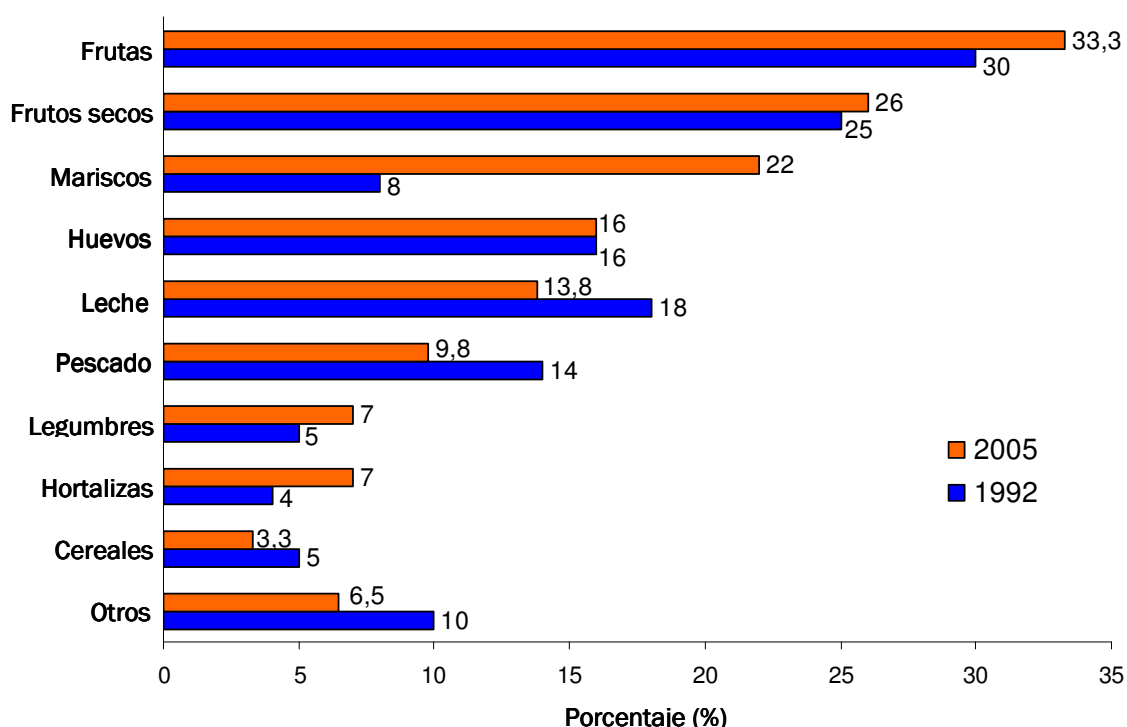


Figura I5. Mecanismo del desarrollo de una reacción alérgica.

Fuente: [http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/imagenes/tec\\_jrregueiro2\\_2.jpg](http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/imagenes/tec_jrregueiro2_2.jpg).

Hoy en día, las alergias alimentarias constituyen un problema de salud pública, especialmente, en los países industrializados, donde su prevalencia (actualmente del 3-4% en adultos y hasta del 6-8% en niños menores de 3 años) (Sicherer y Sampson, 2009) está aumentando progresivamente, debido a factores genéticos, ambientales y nutricionales, con síntomas que afectan seriamente a la calidad de vida de los individuos alérgicos, y que pueden ser leves o graves (incluso mortales) (Molina y col., 2009). Hasta el momento se han identificado alrededor de 200 alimentos capaces de producir reacciones alérgicas (Hefle y col., 1996). Concretamente, en España, los alimentos que provocan un mayor número de reacciones alérgicas son las frutas, frutos secos, mariscos, huevos, leche, pescados, legumbres, hortalizas y cereales con gluten (**Figura I6**).



**Figura I6.** Alergia a alimentos mediada por IgE. Causas de alergia a alimentos en la Población Española. Datos obtenidos a partir de: Fernández-Rivas, 2009.

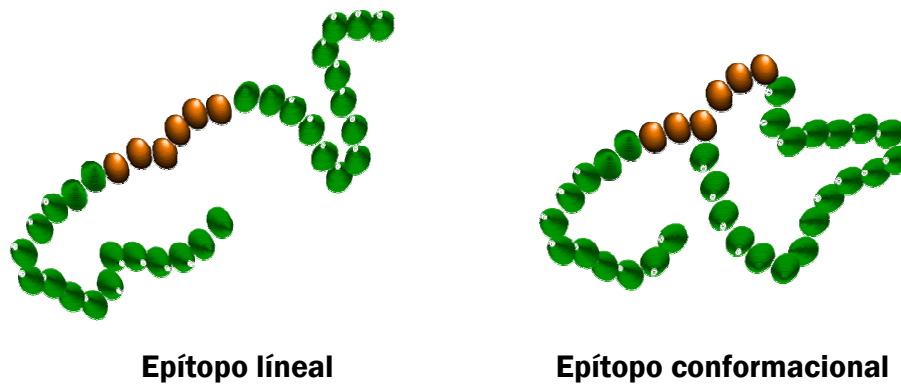
La introducción en la dieta de nuevos productos y cada vez a más temprana edad, así como la supresión temprana de la lactancia materna para pasar al biberón, son factores que explican el incremento de las alergias, concretamente a la leche de vaca (Molina y col., 2009). La leche de vaca es, junto con el huevo, el principal alimento que afecta a la

población alérgica infantil (Fernández-Rivas, 2009; Sicherer y Sampson, 2009), y es la principal causa de reacciones alérgicas en los niños durante sus primeros meses de vida, cuando la leche materna es sustituida parcial o totalmente por fórmulas infantiles, fundamentalmente basadas en leche bovina. La leche de vaca constituye, por tanto, el primer alérgeno que entra en contacto con el sistema inmune de los niños, el cual aún es relativamente inmaduro y susceptible de ser sensibilizado (Besler y col., 2002). Gran parte de las alergias a la leche mediadas por IgE aparecen en los niños en sus primeros 6 meses de vida, lo que supone un grave problema por la relevancia de este alimento en la dieta infantil.

La prevalencia de la alergia a leche de vaca en niños se sitúa entre el 2-3 % (Høst, 2002). No obstante, las alergias infantiles a leche tienden a evolucionar hacia la tolerancia en los primeros 3 o 4 años de vida, aunque en algunos individuos la alergia a la leche puede persistir en la edad adulta, estimándose una prevalencia en este grupo de alrededor del 1% de la población total (Kanny y col., 2001).

#### **1.1.4.2 Proteínas lácteas como alérgenos**

Los alérgenos capaces de sensibilizar a un individuo y desencadenar una reacción alérgica se denominan *alérgenos alimentarios verdaderos o completos*. La mayoría son glicoproteínas hidrosolubles mayoritarias en el alimento, con un tamaño molecular comprendido entre 10-70 kDa y resistentes al procesado industrial (especialmente al tratamiento térmico), así como a la digestión gastrointestinal, aunque hay excepciones (Taylor y Lehrer, 1996). Sólo algunas regiones de las proteínas alérgicas son reconocidas por el sistema inmunitario, bien por las células B, los anticuerpos IgE que producen o bien por las células T, también implicadas en el proceso. A estas regiones, generalmente de entre 8-16 aminoácidos, se las denomina epítomos y pueden ser lineales, es decir secuencias ininterrumpidas de aminoácidos, o conformacionales, reconocidos debido a su estructura tridimensional (**Figura I7**) (Huang y col., 1998; Mills y col., 2004). Dado que todos los alérgenos deben ser capaces de hacer de puente entre moléculas de IgE para causar la desgranulación de los mastocitos, han de contener al menos dos epítomos reactivos hacia dichos anticuerpos (Molina y col., 2009).



**Figura 17.** Estructuras de los epítops presentes en los antígenos. Fuente: Molina y col., 2009.

La alergia a la proteína de leche de vaca es una patología claramente asociada a la lactancia artificial, ya que sólo un 0,5% de los niños amamantados la sufre (Molina y col., 2009). Una posible explicación a los problemas asociados con la ingesta de leche de vaca por lactantes, es la existencia de importantes diferencias cuantitativas y cualitativas en su contenido proteico con respecto a la leche materna. Por un lado, el contenido proteico en la leche de vaca es tres veces mayor que en la de mujer, y por otro lado, mientras que en la leche de vaca, el balance seroproteínas:caseínas es del 20:80, en la leche de mujer dicha proporción es del 60:40 (aunque puede diferir de unas madres a otras) (Molina y col., 2009). Además, en la leche humana, la  $\beta$ -Lg no tiene homóloga, la proporción de  $\alpha_s$ -CN es muy baja y la  $\beta$ -CN presenta un perfil de fosforilación diferente y un grado global de fosforilación inferior con respecto al de la  $\beta$ -CN de leche de vaca. De hecho, distintos estudios han establecido que los alérgenos mayoritarios, es decir, aquellos a los que responden la mayoría de los individuos alérgicos a la leche (más del 50%), son la  **$\beta$ -Lg** (*Bos d 5*) y las  **$\alpha$ - y  $\beta$ -caseínas** (*Bos d 8*) (Bleumink y Young, 1968; Docena y col., 1996; Wal, 1998; El-Agamy, 2007).

En general, puede afirmarse que la  $\beta$ -Lg posee numerosos epítops distribuidos a lo largo de toda la molécula. La estructura tridimensional es una característica importante de la  $\beta$ -Lg pero, aparte de los epítops conformacionales, diversos estudios han hecho posible establecer un mapa de la  $\beta$ -Lg con los epítops lineales (**Tabla I4**).

**Tabla I4.** Principales secuencias de la  $\beta$ -Lg propuestas como epítomos a partir de inmunoensayos realizados con sueros de individuos alérgicos a las proteínas de la leche de vaca.

<b>Péptidos reconocidos por anticuerpos IgE</b>			
	<b>Inmunorreactividad alta*</b>	<b>Inmunorreactividad intermedia*</b>	<b>Inmunorreactividad baja*</b>
<b>Sélo y col. (1999)</b>	(41-60) (102-124) (149-162)	(1-8) (25-40) (92-100)	(9-14) (78-83) (84-91) 125-135)
<b>Järvinen y col. (2001)</b>	(75-86) (127-144)	(47-60) (67-78) (141-152)	(1-16) (31-48)
<b>Heinzmann y col. (1999)</b>	(94-113)	(10-30) (124-135)	
<b>Ball y col. (1994)</b>	(97-108)		
<b>Adams y col. (1991)</b>		(124-134)	

\* Inmunorreactividad alta: secuencias reconocidas por más del 90% de los sueros; inmunorreactividad intermedia: secuencias reconocidas por el 58-72% de los sueros; inmunorreactividad baja: secuencias reconocidas por el 40% de los sueros.

En cuanto a las caseínas, aunque las más alergénicas son las  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -CN, la mayoría de los pacientes alérgicos a la fracción caseínica de la leche presenta sensibilización a cada una de las 4 caseínas (Wal, 2004). Debido a la carencia de una estructura tridimensional compleja, la mayoría de los epítomos identificados en ellas son lineales (Tabla I5).

La mayoría de los alérgenos alimentarios, incluyendo las caseínas y la  $\beta$ -Lg, sensibilizan al individuo a través del tracto gastrointestinal (TGI). Por ello, el proceso de la digestión alimentaria es, probablemente, junto con la absorción intestinal, uno de los fenómenos más importantes en el desarrollo de la sensibilización alérgica y en la severidad de los síntomas asociados, ya que la exposición de las proteínas ingeridas frente al sistema inmune es el primer paso para el inicio de la respuesta inmune (Moreno, 2007). En este sentido, la estabilidad a los procesos digestivos se ha establecido como una de las características que comparten la mayoría de los alérgenos alimentarios.

**Tabla 15.** Principales secuencias de las caseínas propuestas como epítopos a partir de inmunoensayos realizados con sueros de individuos alérgicos a las proteínas de la leche de vaca.

<b>Péptidos reconocidos por anticuerpos IgE</b>		
<b><math>\alpha_{s1}</math>-caseína</b>	(123-132), (139-154), (159-174), (173-194)	<b>Chatchatee y col. (2001a)</b>
	(28-50)	<b>Cerecedo y col. (2008)</b>
<b><math>\alpha_{s2}</math>-caseína</b>	(31-44), (43-56), (83-100), (93-106), (105-114), (117-128), (143-158), (157-172), (165-188), (191-200)	<b>Busse y col. (2002)</b>
	(1-20), (13-32), (67-86), (181-207)	<b>Cerecedo y col. (2008)</b>
<b><math>\beta</math>-caseína</b>	(1-16), (45-54), (55-70), (83-92), (107-120), (135-144), (149-164), (167-184), (185-208)	<b>Chatchatee y col. (2001b)</b>
	(25-50), (52-74), (154-173)	<b>Cerecedo y col. (2008)</b>
<b><math>\kappa</math>-caseína</b>	(15-24), (37-46), (55-80), (83-92), (105-116)	<b>Chatchatee y col. (2001b)</b>
	(34-53)	<b>Cerecedo y col. (2008)</b>

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la  $\beta$ -Lg puede ser absorbida intacta a nivel gastrointestinal en cantidades inmunológicamente relevantes, debido a su gran estabilidad estructural al ambiente degradativo del TGI (Metcalfé y col., 1996). Las caseínas, en cambio, debido a su conformación abierta y flexible, son muy sensibles a la acción proteolítica de la pepsina. Estudios *in vitro* han mostrado que las caseínas son rápidamente degradadas en el estómago, lo cual es incongruente con su capacidad para sensibilizar al individuo a través del TGI. Una posible explicación podría ser la formación de grandes fragmentos proteolíticamente estables durante la digestión, capaces de unir anticuerpos IgE e iniciar la sensibilización alérgica (Moreno, 2007). Esto sugiere que la completa estabilidad estructural en el TGI no es un requisito imprescindible para que una proteína sea capaz de sensibilizar a un individuo y desencadenar una reacción alérgica.

Por el momento, el tratamiento preventivo más recomendado para la alergia a proteínas de la leche consiste única y exclusivamente en eliminar el consumo de leche y derivados de la dieta, ya que no existen fármacos ni tratamientos desensibilizantes eficaces (Nieuwenhuizen y Lopata, 2005). Una alternativa a la evitación del alimento es el consumo de alimentos o ingredientes proteicos hipoalérgicos, es decir, productos tolerables por personas alérgicas. En el caso de los niños con alergia a la leche, el uso de fórmulas infantiles hipoalérgicas resulta especialmente importante para no causar problemas nutricionales ni retraso en el crecimiento, ya que la leche es su único alimento durante los primeros meses de vida y no siempre es posible continuar con lactancia materna.

La modificación de las proteínas lácteas durante el procesado puede considerarse una estrategia sencilla y eficaz para reducir su alergenicidad y, así, aumentar su rango de aplicabilidad en la industria (Jost y col., 1991; Bonomi y col., 2003; Ehn y col., 2004). Así, por ejemplo, se ha observado que el tratamiento térmico y la hidrólisis enzimática alteran las propiedades alergénicas de la  $\beta$ -Lg, induciendo la pérdida de epítomos a través de la modificación de su estado conformacional (Davis y Williams 1998; Ehn y col., 2004; Song y col., 2005). Asimismo, ambos tratamientos aumentan la susceptibilidad de la  $\beta$ -Lg a la proteólisis por las enzimas digestivas (Reddy y col., 1988; Schmidt y van Markwijk, 1993; Guo y col., 1995), reduciendo, por tanto, la probabilidad de que sea absorbida intacta en cantidades inmunológicamente relevantes (Asselin y col., 1989; Svenning y col., 2000; Iametti y col., 2002; Rytönen y col., 2002; Ehn y col., 2005; Asselin y col., 2006; Kim y col., 2007; Moreno, 2007).

En cuanto a la capacidad alergénica de las caseínas, se ha observado que ésta se ve prácticamente inalterada tras el tratamiento térmico (Simonato y col., 2001; Kohno y col., 1994), lo cual podría ser explicado teniendo en cuenta que los epítomos presentes en las caseínas son fundamentalmente lineales y, por tanto, termoestables. En este caso, la hidrólisis enzimática limitada, capaz de romper los epítomos lineales, podría ser una alternativa más eficaz para reducir el potencial alergénico de las caseínas.

Sin embargo, ninguno de estos tratamientos ha demostrado eliminar completamente la alergenicidad de las proteínas lácteas. Diversos estudios han mostrado que las proteínas lácteas tratadas térmicamente e hidrolizadas enzimáticamente, incluso extensamente hidrolizadas (Ragno y col., 1993), siguen siendo reconocidas por anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos. Estas reacciones adversas pueden atribuirse tanto a contaminaciones cruzadas con las proteínas nativas y otros antígenos en la línea de fabricación del alimento (Høst y Halcken, 2004), como a la antigenidad residual que estas fórmulas puedan retener, ya que parte de la proteína se mantiene intacta y, por tanto, con capacidad antigénica para desencadenar síntomas en pacientes sensibilizados. Por ello se están proponiendo métodos alternativos como el uso de altas presiones hidrostáticas antes y durante la hidrólisis enzimática (Bonomi y col., 2003, Chicón y col., 2006, 2008), lo que conduce a la producción de hidrolizados con baja capacidad de unión a inmunoglobulina IgG e IgE y con potencial alergénico reducido, en comparación a los obtenidos por hidrólisis enzimática convencional (Peñas y col., 2006).

Otras estrategias empleadas para reducir la alergenicidad de las proteínas lácteas han sido: la modificación química de las proteínas, por ejemplo por esterificación (Chobert y col.,

1995); adición de agentes desnaturalizantes, como etanol y urea, al medio de proteólisis, aumentando la susceptibilidad a las enzimas digestivas (Dalgalarrodo y col., 1995; Guo y col., 1995); y fermentación con bacterias lácticas (Ehn y col., 2005).

## **1.2 GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS VÍA REACCIÓN DE MAILLARD**

En ocasiones, la utilización eficaz de las proteínas lácteas se encuentra limitada por su potencial alergénico y por la disminución de su funcionalidad durante los procesos de obtención de las mismas o durante el procesado de los alimentos a los que se adicionan, como consecuencia de las condiciones del medio (alta temperatura, pH ácido o elevada fuerza iónica). Por este motivo, es preciso disponer de métodos eficaces que aumenten el grado de aplicabilidad de estas proteínas como ingredientes alimentarios, con el fin de revalorizar los subproductos de los que proceden, rentabilizándose, así, los costes empleados en el desarrollo de nuevas y sofisticadas técnicas para su recuperación a partir de la leche.

En los últimos años la industria alimentaria ha intentado mejorar las propiedades funcionales de proteínas de distinta naturaleza, entre ellas las proteínas del lactosuero y caseínas, mediante métodos físicos, enzimáticos y/o químicos (como la acetilación, desaminación, succinilación, alquilación reductiva, etc.). Concretamente, se ha prestado especial atención al efecto que ejercen los azúcares reductores sobre la estructura y funcionalidad de las proteínas, existiendo actualmente evidencias suficientes de que el calentamiento controlado de las proteínas con azúcares reductores de distinto peso molecular para formar glicoconjugados vía reacción de Maillard (RM), es uno de los métodos más efectivos para obtener nuevas proteínas modificadas con gran interés tecnológico (Oliver y col., 2006a). Además, a diferencia de otros métodos químicos empleados para obtener proteínas modificadas, la glicosilación vía RM, también llamada glicosilación no enzimática o glicación, no implica el uso de reactivos que puedan resultar tóxicos para el consumo humano, siendo, quizás, el método más seguro para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas con fines alimentarios.

### **1.2.1 Química de la reacción de Maillard**

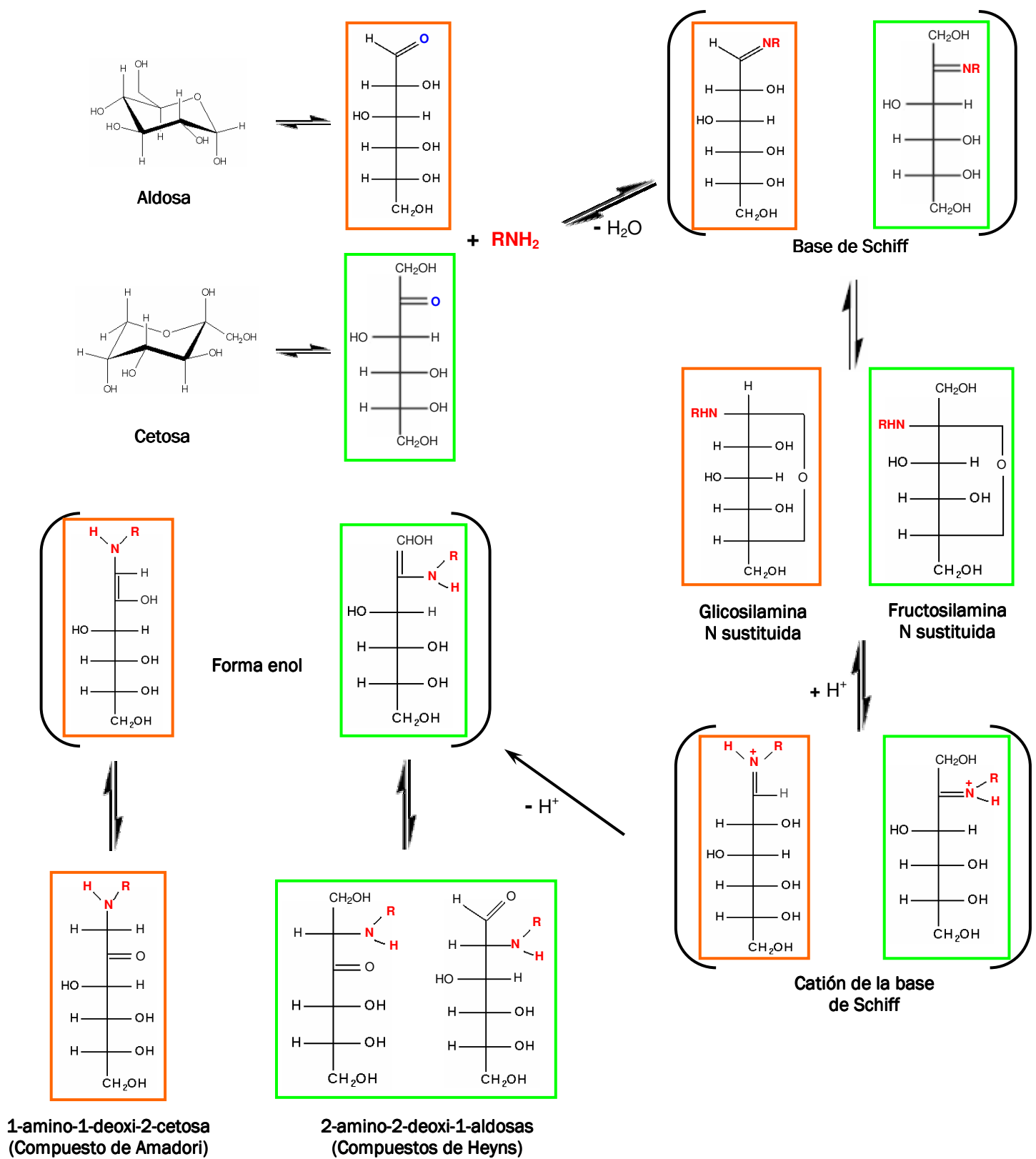
La reacción de Maillard (RM) es una de las reacciones más complejas e importantes que ocurren de forma espontánea en la gran mayoría de los alimentos cuando estos son



procesados a elevada temperatura o son almacenados durante periodos de tiempo prolongados en condiciones inadecuadas. Los compuestos que origina se encuentran presentes en la mayoría de los alimentos que se consumen diariamente en la dieta habitual (Koschinsky y col., 1997) y se han utilizado como indicadores químicos de calidad (Sanz y col., 2003; Olano y Martínez-Castro, 2004; Erbersdobler y Somoza, 2007).

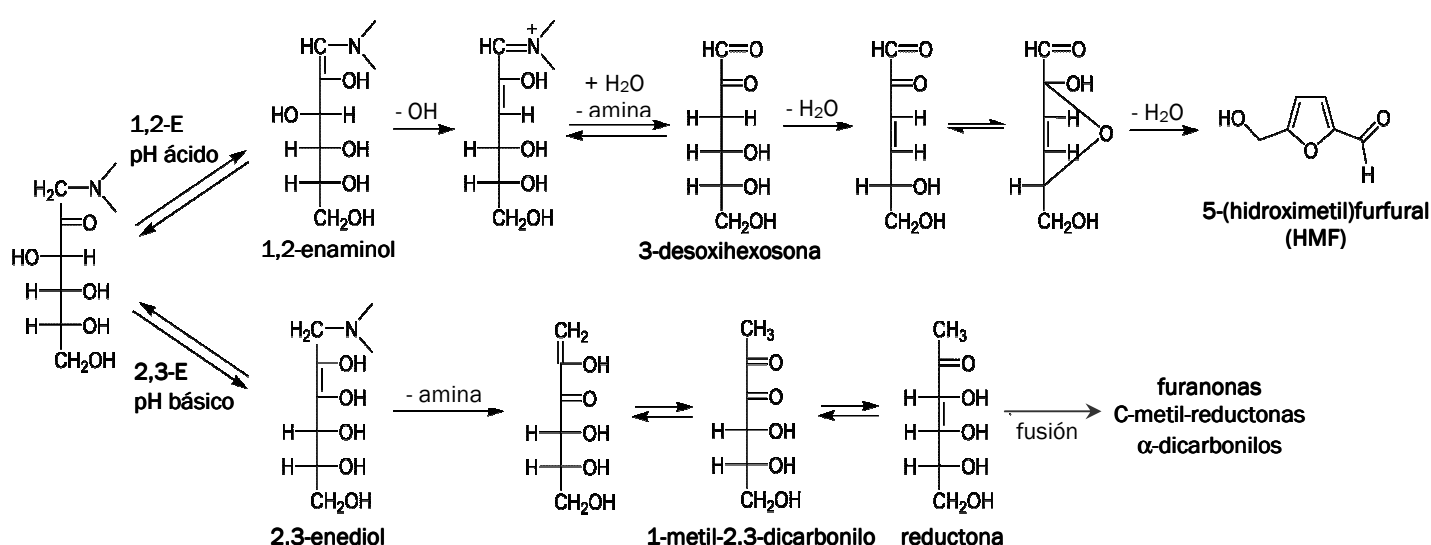
Esta reacción fue descrita por primera vez por el bioquímico francés Louis-Camille Maillard en 1912, en un artículo sobre lo que él denominaba pigmentos melanoideos, que se formaban como resultado de la reacción entre la glucosa y el aminoácido glicina (Maillard, 1912a, 1912b). Sin embargo, el primer esquema coherente de esta reacción fue propuesto por Hodge en 1953. Es generalmente aceptado que la RM engloba una serie de reacciones complejas interrelacionadas, que pueden ocurrir simultáneamente. Sin embargo, con el fin de simplificar, estas reacciones pueden ser divididas en tres etapas denominadas “inicial”, “avanzada” y “final”.

**1. Etapas iniciales: “glicosilación no enzimática o glicación”.** Es la etapa mejor caracterizada de la RM. Durante esta primera etapa se produce la unión covalente entre un grupo amino libre, no protonado, de un aminoácido, péptido o proteína y un grupo carbonilo, que procede normalmente de un azúcar reductor, aunque también puede proceder de la degradación del ácido ascórbico o de productos formados durante la oxidación lipídica (Chuyen, 1998). El producto de condensación formado pierde una molécula de agua para generar una “base de Schiff”, que, por ciclación, se transforma en la correspondiente glicosilamina *N*-sustituida, la cual es muy inestable y experimenta un reordenamiento irreversible, denominado reordenamiento de Amadori o de Heyns (Amadori, 1929; Heyns, 1953), dependiendo de si el azúcar de partida es una aldosa (D-galactosa) o una cetosa (D-tagatosa), respectivamente, para dar lugar al correspondiente compuesto de Amadori (1-amino-1-desoxi-2-cetosa) o de Heyns (2-amino-2-desoxi-aldosa), el cual es el primer producto estable de la reacción (Ames, 1992) (**Figura I8**). Durante esta primera etapa las proteínas no sufren importantes alteraciones estructurales ni hay producción de color.



**Figura 18.** Etapas iniciales de la reacción de Maillard con D-glucosa (reordenamiento de Amadori) y con D-fructosa (reordenamiento de Heyns), siendo el compuesto de Heyns mayoritario el de la derecha (Dills, 1993).

**2. Etapas avanzadas: formación de compuestos dicarbonilos y AGEs.** Durante esta etapa se produce la fragmentación de azúcares y la degradación de aminoácidos (degradación de Strecker). El compuesto de Amadori/Heyns, a pesar de ser bastante estable en alimentos con baja actividad de agua, puede experimentar varias reacciones irreversibles de degradación, que conducen a la formación de una gran cantidad de compuestos intermedios de reacción pobremente caracterizados, muchos de ellos con un aroma y sabor típicos (Ledl y Schleicher, 1990; Friedman, 1996). En función del pH, se pueden distinguir dos vías principales de degradación (Hodge, 1967) (**Figura I9**).

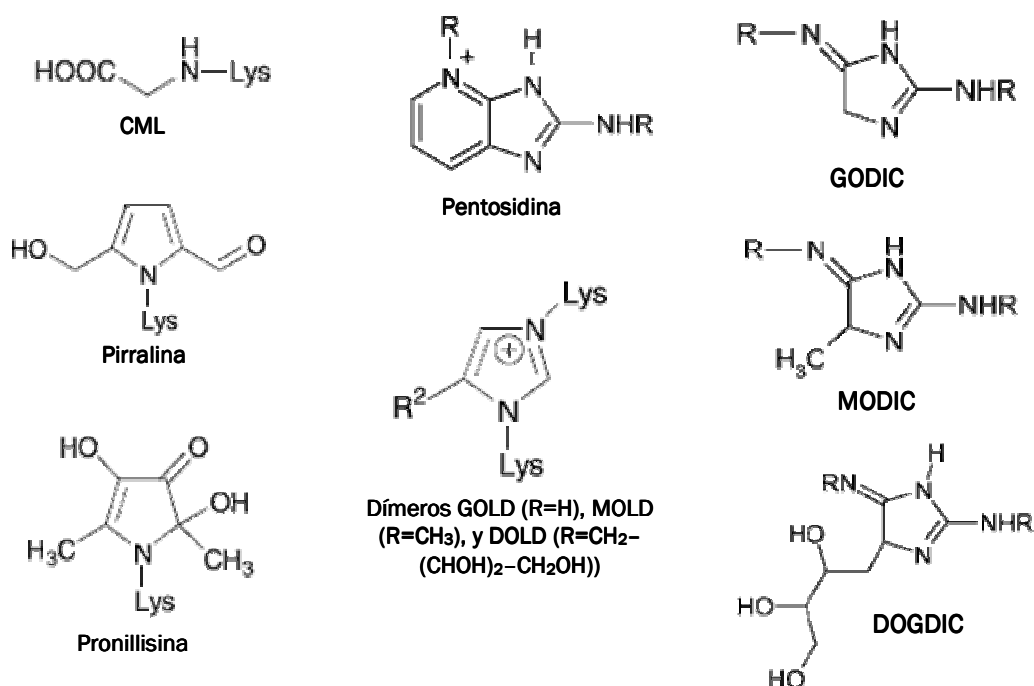


**Figura I9.** Vías principales de degradación del compuesto de Amadori durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard (de acuerdo a Hodge, 1967).

A pH ácido, se ve favorecida la enolización de los carbonos C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> y la eliminación del grupo amino en posición 1 y del grupo carboxilo en posición 3, dando lugar a compuestos 1,2-dicarbonilo (vía 1,2-E), como el metilglioxal y el glioxal (Thornalley, 1996), la 1-desoxiglucosulosa (Ishizu y col., 1967; Glomb y Pfahler, 2000) y la 3-desoxiglucosulosa (Anet, 1960), la cual puede sufrir deshidrataciones posteriores dando lugar a furfurales, como el 5-(hidroximetil)furfural (HMF), y derivados responsables del aroma (Henle, 2005). A pH básico, la enolización de los carbonos C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> y la eliminación del grupo amino en posición 1 da lugar a la formación de compuestos 2,3-dicarbonilo (vía 2,3-E), cuya fragmentación posterior origina compuestos de bajo peso molecular, algunos de ellos importantes compuestos del flavor (cetoaldehídos, reductonas, compuestos α-dicarbonílicos, etc.). A pH neutro, existe

controversia respecto a la vía mayoritaria. Martins y col. (2001) consideran que se produce la vía 1,2-E, mientras que Van Boekel (1998), indica que la vía 2,3-E es la principal. A elevadas temperaturas, estos compuestos también pueden formarse a partir de carbohidratos sin participación alguna de grupos amino, en un proceso muy común denominado “caramelización” (Hoellnagel y Kroh, 1998). Asimismo, bajo condiciones oxidantes, los 1,2-dicarbonilos pueden también formarse a partir de la base de Schiff, a través de una ruta llamada Namiki (Hayashi y Namiki, 1980; Henle, 2005). Adicionalmente, debido a su elevada reactividad con los grupos amino libres, los compuestos dicarbonilo pueden reaccionar tanto con los residuos de lisina o arginina de las proteínas, así como con intermediarios de los compuestos de Amadori/Heyns, dando lugar a la formación de derivados aminoacídicos, denominados “productos finales de las etapas avanzadas de la glicación” (“*advanced glycation endproducts*”, AGEs) (Van Nguyen, 2006), los cuales se suelen caracterizar por presentar fluorescencia.

Entre los diferentes AGEs fluorescentes que se pueden formar en los alimentos destaca la “N-ε-carboximetil-lisina” (CML), la cual resulta de la degradación oxidativa de los compuestos de Amadori/Heyns formados entre la lisina y una aldosa/cetosa (Hewedi, 1994) y es utilizada como indicador de la formación de AGEs en alimentos (Ames, 2008) (Figura I10).



**Figura I10.** Estructuras propuestas para algunos de los AGEs formados durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard (Henle, 2005 and Oliver y col., 2006a).

Otros derivados aminoacídicos detectados en los alimentos, son: pirralina (lisina 3-deoxiglucosulosa), pronillisina (lisina acetilformoina), pentosidina (interacción de lisina y arginina con pentosas, normalmente D-arabinosa o D-ribosa, y hexosas), imidazolinona (arginina metilgloxal), pirazinonas (amino terminal-dicarbonilos) y varios dímeros de lisina resultantes del entrecruzamiento entre dos lisinas y dos compuestos dicarbonilo, entre ellos el dímero glioxal lisina (GOLD), el metilgloxal lisina (MOLD) o el 3-deoxiglucosulosa lisina (DOLD). A su vez, estos pueden reaccionar con el grupo guanidino de la arginina, dando lugar a otros entrecruzamientos, llamados GODIC (dímero glioxal lisina arginina), MODIC (dímero metilgloxal lisina arginina) y DOGDIC (dímero 3-deoxiglucosulona lisina arginina) (Figura I10).

**3. Etapas finales: formación de melanoidinas.** Las etapas finales de la RM engloban una serie de reacciones de ciclación, deshidratación, retroaldolización, reordenamiento, isomerización y condensación de los productos iniciales de la reacción, que dan lugar a oligómeros y polímeros nitrogenados de alto peso molecular, altamente coloreados e insolubles en agua, llamados melanoidinas (Friedman, 1996). Debido a su difícil aislamiento y elevada complejidad, la estructura de las melanoidinas todavía es objeto de estudio. Hasta la fecha, se han propuesto 3 estructuras posibles para las melanoidinas: (i) son sustancias coloreadas de bajo peso molecular, formadas durante las etapas avanzadas de la reacción, las cuales se entrecruzan con grupos amino libres de las proteínas (Arg, Lys), dando lugar a estructuras coloreadas de elevado peso molecular (Hofmann, 1998); (ii) son estructuras macromoleculares constituidas por unidades repetidas de furanos y/o pirroles, unidas a través de reacciones de policondensación (Tressl y col., 1998); (iii) el esqueleto de las melanoidinas está constituido principalmente por productos de degradación de los azúcares (grupos aldehído), formados durante las etapas iniciales de la RM, polimerizados y unidos por compuestos amino (Cämmerer y Kroh, 1995; Cämmerer y col., 2002).

### **1.2.2 Factores que afectan al progreso de la reacción de Maillard**

El objetivo principal de la glicosilación deliberada de proteínas vía RM es mejorar las propiedades funcionales de las mismas, las cuales, como hemos visto anteriormente, dependen en gran medida del avance de la reacción. Por ello, en función del fin que se persiga, es preciso controlar el avance de la RM seleccionando las condiciones de almacenamiento más adecuadas, siendo, probablemente, las más importantes la  $a_w$ , el pH, la temperatura y la naturaleza y concentración de los sustratos (carbohidratos y proteínas) (O'Brien y Morrissey, 1989a; Wijewickreme y Kitts, 1997; Carabasa-Giribert e Ibarz-Ribas, 2000).

➤ **Actividad de agua ( $a_w$ ):** actividades de agua entre 0,2 y 0,3 se consideran idóneas para el almacenamiento de alimentos desecados ya que, en estas condiciones, el agua se encuentra fuertemente ligada y no disponible, por lo que la reacción de Maillard es mínima (Loncin y col., 1968; Ben-Gara y Zimmerman, 1972; Kato y col., 1989). En general, al aumentar la actividad de agua se produce un aumento de la reacción de Maillard hasta alcanzar un máximo, a partir del cual se produce una disminución que parece deberse a una dilución de los reactivos (Labuza, 1970). Diversos autores han demostrado que el intervalo de actividades de agua donde la reacción se encuentra favorecida es entre 0,3 y 0,7 (Warmbier y col., 1976; Burvall y col., 1978; Kato y col., 1986, 1988; Ringe y Love, 1988; Desrosiers y col., 1989). Labuza y Saltmarch (1981), observaron, en un estudio de seroproteínas en polvo, que el avance de la reacción es máximo a una  $a_w$  de 0,44.

Parece ser que la  $a_w$  no sólo influye en la velocidad de reacción, sino también en la conformación y en la tendencia a la asociación de la proteína glicosilada. Así, Morgan y col. (1999a) realizaron ensayos de lactosilación de la  $\beta$ -Lg bovina en diferentes condiciones de  $a_w$  (en solución acuosa y en seco). Los resultados obtenidos indicaron que la lactosilación de la  $\beta$ -Lg en solución produjo profundas modificaciones estructurales que finalmente condujeron a la formación de agregados no covalentes de elevado peso molecular, mientras que en medios con baja actividad de agua (0,65), la estructura nativa de la proteína apenas se alteró. Además, los conjugados obtenidos en seco presentaron una elevada solubilidad a pH 4,6 tras calentamientos a 65-90°C (Bouhallab y col., 1999). Asimismo, las reacciones en estado sólido son más adecuadas desde un punto de vista industrial, ya que los productos en polvo tienen una mayor estabilidad y se requiere menos espacio y temperatura para llevar a cabo la interacción proteína-carbohidrato que cuando se emplean disoluciones.

➤ **pH del medio:** el desarrollo de la RM está fuertemente condicionado por el pH inicial de los reactivos así como por la capacidad tamponadora del sistema. Se ha observado que a pH ácido, cercano a un valor de 3, la velocidad de la reacción es mínima y su desarrollo es escaso (Lea y Hannan, 1949). Generalmente, la velocidad de reacción aumenta en condiciones ligeramente alcalinas (Namiki y col., 1993; Ajandouz y Puigserver, 1999). Según Alais y Linden (1990), la región comprendida entre pH 6 y 8 es la más favorable para el desarrollo de la reacción, pudiéndose ampliar este rango hasta pH 10. A pH > 10, la reacción se ralentiza, lo que puede deberse a una deficiencia de protones, necesarios para catalizar los reordenamientos de Amadori y de Heyns. Asimismo, Bell (1997), estudió el efecto del tipo y concentración del tampón sobre la degradación inicial de aminoácidos y la formación de pigmentos pardos en sistemas modelo de glicina y glucosa almacenados durante largos periodos de tiempo a 25 °C. La pérdida de glicina fue más

rápida con una elevada concentración de tampón fosfato en el medio, indicando que el tampón fosfato tiene un efecto catalizador de la reacción de Maillard.

➤ **Temperatura y tiempo de calentamiento:** la temperatura se considera el factor más determinante de la reacción de Maillard (Carabasa-Giribert e Ibarz-Ribas, 2000). El incremento tanto en la temperatura como en el tiempo de almacenamiento favorece de forma exponencial el pardeamiento no enzimático (Ryu y col., 2003).

➤ **Naturaleza y concentración de los reactantes:** en cuanto a la reactividad de los aminoácidos, los más reactivos son los “grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> libres” de la lisina, así como el “grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>” situado en el extremo amino terminal. Por tanto, un mayor contenido en residuos de lisina podría conllevar un mayor grado de glicación de la proteína. El grupo imidazol de la histidina, el grupo indol del triptófano y el grupo guanidino de los residuos de arginina también son susceptibles de reaccionar con azúcares reductores, pero en menor medida (Oliver y col., 2006a). La  $\beta$ -Lg posee 19 grupos amino libres potenciales de glicación (15 residuos de Lys, 3 residuos de Arg y el grupo amino terminal de la Leu situado en el extremo amino terminal de la proteína) y el SC presenta 37 (14 en la  $\alpha_{s1}$ -CN, 11 en la  $\beta$ -CN, 9 en la  $\kappa$ -CN y los 3 grupos amino terminales).

Con respecto al tipo de carbohidrato, se ha descrito que la reactividad de los azúcares reductores disminuye con el peso molecular (Lee y col., 1979; Tainturier y col., 1992; Prabhakaram y Ortwerth, 1994; Nacka y col., 1998). A su vez, la reactividad de los monosacáridos depende de varios factores (Bunn y Higgins, 1981; Yaylayan y col., 1993; Labuza y Baisier, 1992), incluyendo: proporción de azúcar existente en forma acíclica o abierta (forma reactiva) en disolución acuosa, presencia de grupos cargados en la molécula de azúcar (por ejemplo, grupos fosfato) y electrofilicidad del grupo carbonilo. De acuerdo con esto, en general, es aceptado que las aldosas (como la glucosa y la galactosa) son intrínsecamente más reactivas que las cetosas (como la fructosa y la tagatosa), sin embargo, en la bibliografía se encuentran datos aparentemente contradictorios sobre las reactividades de la glucosa y la fructosa (Yeboah y col., 1999). Además, se ha descrito que las cetosas podrían dar lugar a un mayor entrecruzamiento y agregación proteica que las aldosas durante las etapas avanzadas de la RM (Matsuda y col., 1991; Yeboah y col., 1999; Sun y col., 2004, 2006). Así, la reactividad de los azúcares reductores disminuiría en el siguiente orden: aldopentosas > aldohexosas > cetohehexosas > disacáridos > polisacáridos (Spark, 1969; Yeboah y col., 1999).

Por último, en cuanto a la concentración de los reactantes, varios estudios han mostrado que la reacción se ve favorecida por un exceso de azúcares en el medio (Warmbier y col., 1976), así como al aumentar la relación molar azúcar reductor:aminoácido (Wolfrom y col., 1974; Warmbier y col., 1976).

### **1.2.3 Galactosa, tagatosa, lactosa y dextrano**

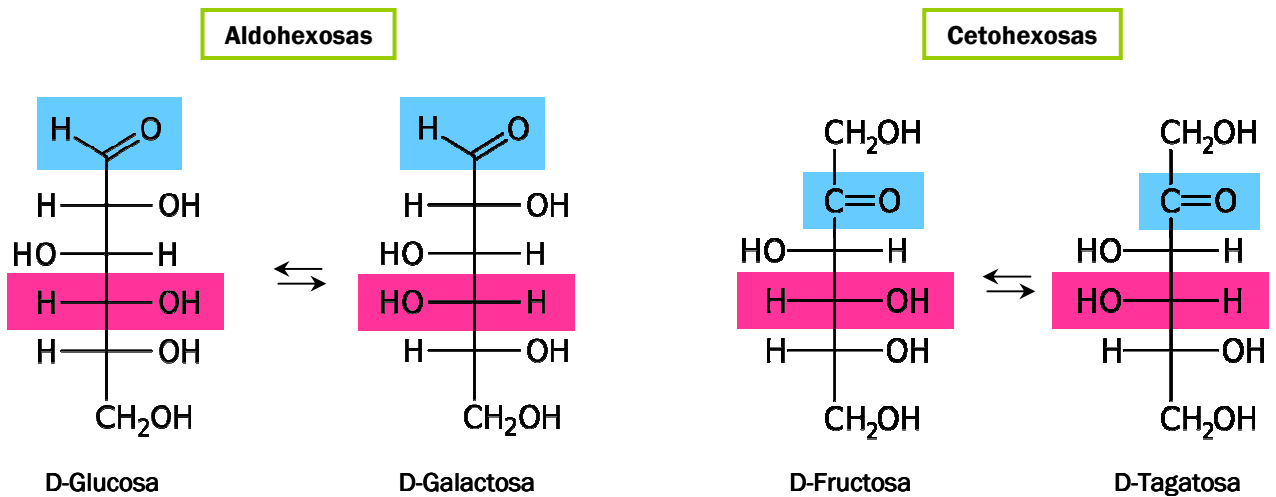
Debido a su mayor reactividad en la RM, se ha descrito que la glicación con mono- y disacáridos, como la galactosa, la tagatosa y la lactosa, podría resultar más factible industrialmente que la glicación con oligo- y polisacáridos, ya que, desde un punto de vista práctico, las condiciones de reacción requeridas para obtener proteínas modificadas con un rendimiento razonable serían más suaves.

Por otro lado, la unión covalente de polisacáridos, como el dextrano, a proteínas alimentarias también podría resultar interesante, ya que, en comparación con los mono- y disacáridos, la baja reactividad de los polisacáridos y el impedimento estérico ejercido por las moléculas de carbohidrato unidas covalentemente a la proteína impiden un mayor avance de la RM, lo que se traduce en un menor entrecruzamiento proteico y desarrollo de color, así como en una menor incidencia de reacciones secundarias (Kato, 2002).

#### **1.2.3.1 D-galactosa y D-tagatosa**

Desde un punto de vista químico, la **D-galactosa** y la **D-tagatosa** son azúcares reductores y epímeros de la D-glucosa y de la D-fructosa, respectivamente, los cuales difieren únicamente en la disposición del grupo -OH situado en el C<sub>4</sub> ([Figura I11](#)). Esta pequeña diferencia va a afectar a sus propiedades, algunas muy importantes desde el punto de vista de la tecnología de los alimentos, tales como la digestibilidad, solubilidad y poder edulcorante, siendo más dulces y solubles la glucosa y la fructosa que la galactosa y la tagatosa.





**Figura I11.** Proyecciones de Fischer de la D-Glucosa, D-Galactosa, D-Fructosa y D-Tagatosa (Stryer y col., 2003).

A pesar de que la D-galactosa (Gal) y la D-tagatosa (Tag) no son muy abundantes en la leche, ambos monosacáridos pueden obtenerse fácilmente mediante procesos económicamente viables, los cuales emplean materias primas abundantes y baratas (la lactosa) y no implican pasos de separación costosos. La **galactosa** es producida a nivel industrial mediante la hidrólisis de lactosa, reacción catalizada por la enzima  $\beta$ -galactosidasa, normalmente de origen fúngico o microbiano. De acuerdo con Kulp (1975), las mejores fuentes comerciales de  $\beta$ -galactosidasa son *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces lactis*. En cuanto a la obtención de **tagatosa**, Beadle y col. (1991,1992) patentaron el primer proceso de producción económicamente viable, adecuado para la producción de Tag a gran escala y sin efectos medioambientales adversos. Este proceso consiste en dos pasos: (i) isomerización de la D- o L-Gal (obtenida a partir de la lactosa) a D- o L-Tag, respectivamente, en presencia de hidróxido cálcico como catalizador ( $\text{pH} > 10$ ) y a una temperatura relativamente baja ( $-15$  a  $40^\circ \text{C}$ ), y (ii) neutralización con ácido (hasta  $\text{pH} < 7$ ) del complejo metal hidróxido-Tag, dando lugar a la Tag y una sal. Posteriormente, Ibrahim y Spradin (2000) patentaron un proceso de isomerización enzimática, usando la arabinosa isomerasa procedente de bacterias lácticas. Este proceso ofrecía varias ventajas sobre el proceso químico, incluyendo el empleo de condiciones suaves de pH y temperatura y no formación de productos secundarios.

El mayor aporte de **galactosa** procedente de la dieta proviene de la leche y productos lácteos derivados, los cuales aportan lactosa, que, por acción de la lactasa intestinal, se hidroliza en D-glucosa y D-galactosa. Otras fuentes de Gal son la remolacha azucarera y distintas gomas y mucílagos. La vía principal de utilización de la Gal procedente de la dieta es su transformación hepática en D-glucosa, proporcionando energía al organismo. El aporte

exógeno de Gal no es imprescindible, ya que ésta se puede formar a partir de la D-glucosa en el organismo, donde es necesaria para la síntesis de lactosa en la glándula mamaria (leche), así como de glucolípidos y glucoproteínas, presentes en la membrana celular, fundamentalmente, de las neuronas.

La **tagatosa** a menudo se encuentra en los productos lácteos, aunque en muy pequeñas cantidades. Desde el 2001, año en el que fue reconocida por la FAO/WHO (FAO/WHO, 2001) como GRAS (Generally Recognised As Safe), su interés como edulcorante funcional se ha incrementado debido a sus propiedades potenciadoras del sabor del flavor, así como a su funcionalidad tanto tecnológica como biológica. Así, se ha observado que la tagatosa mejora el sabor de las bebidas dietéticas, reduciendo el sabor artificial/amargo de los edulcorantes de alta intensidad empleados en este tipo de bebidas, tales como el aspartamo o el acesulfamo-K, y potenciando su sabor dulce, lo que permite reducir su empleo hasta un 25-30%, sin comprometer el sabor de la bebida. Además, la Tag presenta una textura muy similar a la sacarosa y un 92% de su capacidad edulcorante, lo que unido a su bajo valor calórico (sólo aporta el 38% de las calorías de la sacarosa) y a su mínimo efecto cariogénico y glicémico (no promueve la aparición de caries y no causa un incremento en los niveles de glucosa e insulina en sangre, al ser metabolizada por el organismo a través de rutas que difieren de las empleadas por la sacarosa y otros edulcorantes tradicionales), hacen de la tagatosa una buena alternativa a la misma sacarosa, así como a muchos polioles y edulcorantes de alta intensidad en diversos alimentos. Asimismo, gracias a sus propiedades físicas (altamente soluble, no higroscópica, fácilmente cristizable, punto de fusión relativamente alto a 134°C...) es empleada en multitud de alimentos como texturizante, humectante y estabilizante.

Por otro lado, la diferente configuración espacial del C<sub>4</sub> de la Tag va a tener importantes implicaciones en su metabolismo general. Así, la Tag ingerida apenas es absorbida en el intestino delgado (sólo 15-20%), sino que es principalmente fermentada en el ciego y colon proximal por la microbiota colónica (Laerke y Jensen, 1999; Laerke y col., 2000), pudiendo promover el crecimiento de lactobacilos y bifidobacteria, los cuales se piensa que tienen efectos beneficiosos sobre el sistema inmune, la absorción de minerales y algunos trastornos gastrointestinales, tales como el estreñimiento, la diarrea y el cáncer de colon (Madsen, 2001; Mountzouris y col., 2002). Asimismo, la fermentación de la Tag resulta en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, "*short chain fatty acids*") con una alta proporción de butirato, el cual puede tener un efecto protector frente al cáncer de colon.

Debido a todas estas propiedades, se prevé que la tagatosa sea empleada en una amplia gama de productos alimenticios, incluyendo cereales de desayuno, refrescos dietéticos, helados “light” o bajos en grasas, productos de confitería, cereales de desayuno, chicles, suplementos dietéticos y en fórmulas dietéticas sustitutivas de alguna comida.

### 1.2.3.2 Lactosa

La lactosa, carbohidrato mayoritario de la leche de vaca, es un disacárido natural constituido por  $\beta$ -D-galactopiranosil (galactosa) y  $\beta$ -D-glucopiranosil (glucosa) unidas por un enlace  $\beta$ -1-4-O-glicosídico (Figura I12). Al igual que el resto de los azúcares reductores, en disolución acuosa la lactosa existe bajo dos formas isómeras,  $\alpha$  y  $\beta$ , en un radio aproximado de 37:63 en el estado de equilibrio. Éstas se diferencian estructuralmente sólo en la posición del grupo -OH del carbono anomérico de la glucosa. Sin embargo, presentan propiedades fisicoquímicas (punto de fusión, densidad, rotación óptica específica,...) notablemente diferentes, y, consecuentemente, distintas aplicaciones comerciales.

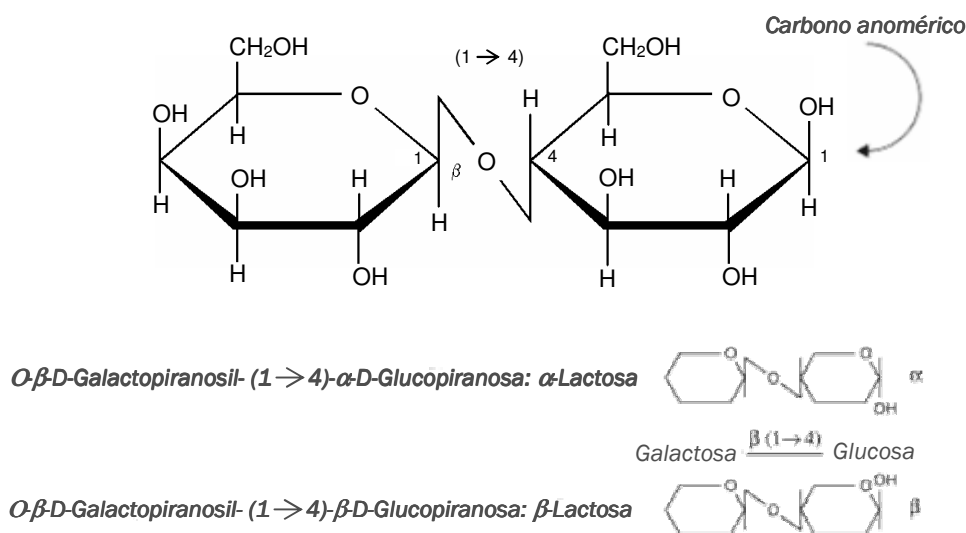


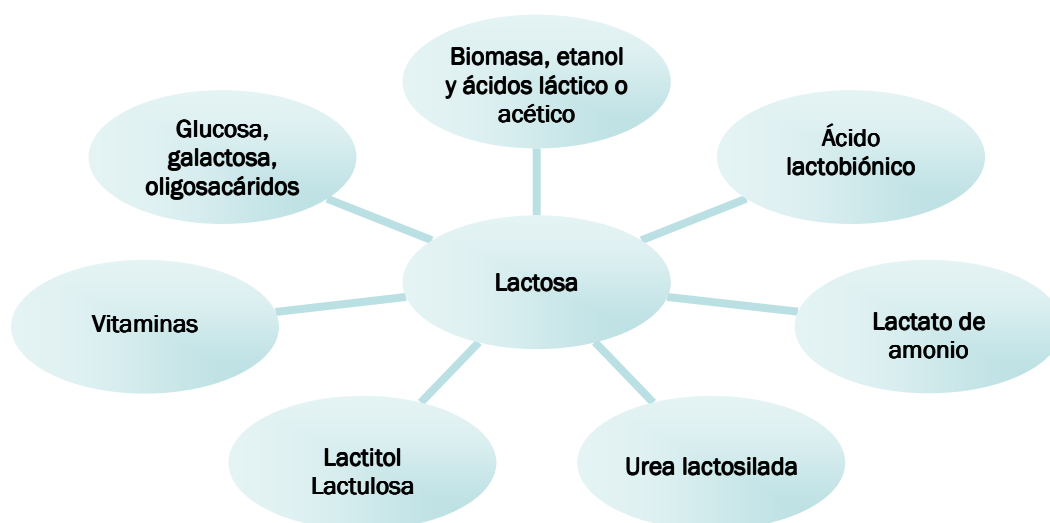
Figura I12. Estructuras de la lactosa. Fuente: Fox y Kelly, 2006.

Algunas de sus propiedades químicas y fisicoquímicas, principalmente su baja higroscopicidad, bajo poder edulcorante (30% de la sacarosa) y propiedades reductoras, la convierten en un ingrediente valioso para las industrias farmacéutica y alimentaria, lo cual

ha llevado a que su purificación a partir del lactosuero, mediante concentración, cristalización y secado, sea de gran interés para la industria láctea.

La forma más pura de  $\alpha$ -lactosa es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica como excipiente, siendo uno de los componentes más empleados como relleno en comprimidos, cápsulas y otras formas de medicamentos orales (Almécija, 2007). El polvo de lactosa cristalizada es frecuentemente empleado por la industria alimentaria debido a sus propiedades funcionales. Así, por ejemplo, se utiliza en confitería, pastelería, salsas, zumos o helados, con el fin de reducir el dulzor, aumentar la viscosidad, mejorar la textura y realzar el sabor. Por sus propiedades de solubilidad y absorción, la lactosa es muy utilizada como vehículo de sabores y colorantes alimenticios. Sin embargo, la aplicación más importante de la lactosa en la industria alimentaria es, por su balance nutricional, es su empleo como edulcorante en alimentos para diabéticos y en fórmulas infantiles, con el objetivo de asemejar su composición a la de la leche humana, ya que mientras la leche humana contiene un 7% de lactosa, la leche bovina únicamente contiene un 4,8%. Para esta aplicación el suero en polvo desmineralizado es ampliamente utilizado, ya que es más barato y más adecuado que el polvo de lactosa cristalizada por su aporte de proteínas del lactosuero. Éste ayuda a equiparar la relación caseínas:proteínas séricas de la leche bovina (80:20) a la de la leche humana (40:60).

Asimismo, a partir de la lactosa, además de galactosa y tagatosa, pueden obtenerse numerosos derivados, siendo, algunos de ellos, más valiosos y útiles que la lactosa (**Figura I13**).

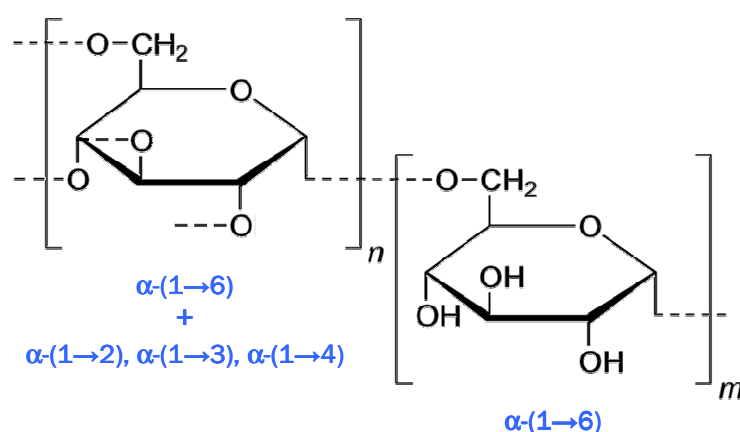


**Figura I13.** Derivados de la lactosa de grado alimentario.

### 1.2.3.3 Dextrano

El dextrano es un polímero bacteriano extracelular producido fácilmente a partir de la [sacarosa](#) por ciertas [bacterias](#) acidolácticas, de las cuales las más conocidas son [Streptococcus mutans](#) y [Leuconostoc mesenteroides](#) de las cepas NRRL B-512F, 512 y B1299, aunque sólo con la cepa B-512F se produce dextrano a escala industrial, a partir de la sacarosa comercial.

Varias son las investigaciones que han abordado la formación de glicoconjugados entre proteínas lácteas 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  $\alpha(1\rightarrow4)$  ([Figura I14](#)).



**Figura I14.** Estructura del dextrano.

Este polisacárido presenta una elevada variabilidad estructural y se caracteriza de acuerdo con su peso molecular medio (1-2000 kDa) así como con el porcentaje, naturaleza y distribución de sus enlaces, obteniéndose una gran diversidad de dextranos con distintas propiedades fisicoquímicas y, por tanto, con distintas aplicaciones industriales. En general, su alto porcentaje de uniones  $\alpha(1\rightarrow6)$  le confiere una elevada flexibilidad, solubilidad, hidrofiliidad y baja viscosidad en disolución; propiedades físicas y fisicoquímicas que, según diversos autores, podrían modificar en mayor medida la funcionalidad de las proteínas, en comparación con los carbohidratos de menor peso molecular (Kato y col., 1990, 1992, 1993; Nagasawa y col., 1996; Shu y col., 1996).

En concreto, se ha observado que la unión covalente de polisacáridos a las proteínas mejora, generalmente, las propiedades emulsionantes de las mismas, ya que combina las propiedades funcionales de las proteínas con el papel estabilizador de los polisacáridos (Dickinson y Galazka, 1991). Además, varios estudios han mostrado que la glicosilación vía RM con polisacáridos podría enmascarar los epítomos de las proteínas alergénicas más eficientemente que los mono- y disacáridos (Sehon, 1982; Hattori y col., 1994, 2000a, 2004). De modo que la glicación de alérgenos alimentarios, como las proteínas lácteas, con polisacáridos, como el dextrano, podría ser una alternativa interesante para reducir la alergenicidad proteica, pudiéndose mejorar, a su vez, otras propiedades funcionales de la proteína, tales como las emulsionantes.

#### 1.2.4 Inhibidores del avance de la reacción de Maillard: Piridoxamina

Debido a la complejidad de la RM, es necesario profundizar en el estudio de parámetros que permitan un control adicional de dicha reacción. En este sentido, el empleo de inhibidores de grado alimentario de las etapas más avanzadas de la RM podría resultar de interés.

Entre los diversos inhibidores del avance de la RM cabe destacar la **piridoxamina** (PM) (Figura I15), ya que, al ser uno de los 6 isómeros naturales de la vitamina B<sub>6</sub>, no supone ningún problema a la hora de ser incorporado a los alimentos. La piridoxamina fue identificada por primera vez en 1944 por Esmond Snell, durante ensayos microbiológicos con la vitamina B<sub>6</sub>, y purificada a partir de tejidos animales, y ha sido descrita por muchos autores como un potente inhibidor *in vivo* e *in vitro* de la formación de AGEs (Voziyan y col., 2002; Nagaraj y col., 2002; Chetyrkin y col., 2008; Amarnath y col., 2004).

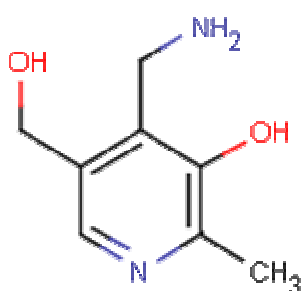


Figura I15. Estructura de la piridoxamina

Se ha descrito que la PM puede ejercer su acción inhibitoria mediante tres posibles mecanismos: (i) formando complejos moderadamente estables con ciertos cationes metálicos (preferentemente el hierro (III) y el cobre (II)) presentes en el medio de reacción, los cuales pueden oxidar al compuesto de Amadori, favoreciendo la formación de compuestos dicarbonílicos precursores de los AGEs (Wolff, 1996), y/o formar complejos capaces de catalizar la reacción (Kato y col., 1981; O'Brien y Morrissey, 1997), favoreciendo, por tanto, su desarrollo. La PM es capaz de interaccionar con estos, a través de su grupo -OH, haciéndolos significativamente menos activos como catalizadores de la reacción; (ii) inactivando las especies reactivas del oxígeno, resultantes de las reacciones oxidativas post-Amadori, mediante la donación de un átomo de hidrógeno por su grupo fenólico; (iii) interaccionando, a través de su grupo NH<sub>2</sub> libre, con los grupos carbonilo reactivos del medio, procedentes de los carbohidratos libres (Adrover y col., 2005 y 2007), o bien de sus productos de autooxidación [glioxal, metilglioxal y glicolaldehído] u otros compuestos dicarbonilo, incluyendo la 3-desoxiglucosona y 1,4 dicarbonilos, formados a partir de la degradación oxidativa de la base de Schiff o del compuesto de Amadori, todos ellos precursores de los AGEs (Voziyan y col., 2002; Nagaraj y col., 2002; Chetyrkin y col., 2008; Amarnath y col., 2004).

### **1.3 EFECTO DE LA GLICOSILACIÓN VÍA REACCIÓN DE MAILLARD SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LAS PROTEÍNAS**

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 las propiedades fisicoquímicas y/o conformación de las proteínas, pudiendo alterar positiva o negativamente su funcionalidad tecnológica, propiedades nutricionales, alergenicidad y bioactividad.

#### **1.3.1 Efectos potencialmente negativos**

El avance de la RM puede tener un efecto indeseable, tanto a nivel organoléptico y nutritivo de los alimentos como a nivel fisiológico *in vivo*, produciéndose compuestos que pueden resultar tóxicos para el organismo.

Se ha observado que, en ciertos alimentos, el avance de la reacción puede dar lugar a un pardeamiento no deseado, así como a sabores y aromas desagradables, provocando el rechazo por parte del consumidor hacia tales alimentos, e, incluso acortar la vida útil de los mismos (Oliver y col., 2006a).

Sin embargo, una de las consecuencias más importantes del avance de la RM en los alimentos es la reducción de la calidad proteica, debido fundamentalmente (i) al bloqueo de la lisina y otros aminoácidos esenciales, como la metionina, el triptófano, la arginina y la histina, por los grupos carbonilo de azúcares reductores o lípidos oxidados, impidiendo su absorción (Hurrell, 1984; Alkanhal y col., 2001; Somoza, 2005); (ii) y a la alteración de la digestibilidad proteica y, por tanto, de la biodisponibilidad de los aminoácidos (Mauron, 1990), debido al efecto del avance de la RM sobre la conformación, la solubilidad y las propiedades interfaciales de las proteínas, así como a la producción de compuestos, como las premelanoidinas, que podrían inhibir la actividad de determinados enzimas pancreáticos e intestinales, como la tripsina y la aminopeptidasa N (Öste y col., 1986; O'Brien y Morrissey, 1989b; Martins y col., 2001; Malec y col., 2002). Los cambios, tanto *in vitro* como *in vivo*, en la digestibilidad de las proteínas glicadas pueden tener importantes consecuencias en sus propiedades nutritivas y bioactivas, al condicionar su absorción intestinal y la producción de péptidos bioactivos a partir de éstas (Maleki, 2004).

Así, varios estudios metabólicos han mostrado que los productos iniciales de la RM son escasamente digeridos, disminuyendo su absorción gastrointestinal (Erbersdobler y Faist, 2001; Finot, 2005). Más recientemente, se han encontrado resultados similares con la seroalbúmina humana (HSA) y BSA glicadas (Lapolla y col., 2001 y 2004), así como con la  $\beta$ -Lg glicada con galactooligosacáridos (Sanz y col., 2007; Moreno y col., 2008). Por el contrario, Bouhallab y col. (1999), en un estudio con  $\beta$ -Lg lactosilada en fase sólida, 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 la tripsinolisis. Asimismo, Yeboah y col. (2004) mostraron una mayor digestibilidad de la lisozima glicada, lo que atribuyeron a la exposición de nuevos sitios activos de la proteína a la acción de la tripsina y quimotripsina, como consecuencia de los cambios conformacionales producidos en la proteína durante las etapas avanzadas de la RM. La controversia encontrada en los resultados derivados de los diferentes estudios acerca del efecto de la glicosilación vía RM sobre la susceptibilidad de las proteínas a la proteólisis por las enzimas digestivas podría ser atribuida a las distintas condiciones de  $a_w$ , pH, tiempo y temperatura bajo las cuales se promovió la RM en cada uno de ellos, así como al empleo de azúcares de distinta naturaleza.



Asimismo, de acuerdo con varios estudios, el valor nutritivo de los alimentos también se podría ver afectado como consecuencia de la interacción, durante la digestión, de ciertos PRM con vitaminas (algunas del grupo B y ácido pantoténico) (Finot y Furniss, 1989), aminoácidos esenciales (como la metionina, el triptófano, la arginina, la histidina y la lisina) y minerales (como el Ca, Zn, Cu, Mg y Fe) (O'Brien y Morrisey, 1997; Navarro y col., 2000; Homma y Murata, 2001), modificándose su solubilidad y, por tanto, alterándose su absorción y/o afectando a su normal metabolismo y excreción; en definitiva, alterándose su biodisponibilidad (Seiquer y col., 2000; Navarro, 2003; Delgado-Andrade y col., 2004a). Así, por ejemplo, ensayos de digestibilidad y metabolismo del nitrógeno, Ca, Mg y Fe en ratas alimentadas con dietas ricas en PRM apuntan a un cierto deterioro del Ca y Mg óseo, lo que podría vincularse con enfermedades como la osteoporosis. Asimismo, los hallazgos referidos al Fe indican alteraciones en su funcionalidad, pudiéndose materializar en el descenso de los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos (Delgado-Andrade y col., 2004b, 2006 y 2008).

Por otro lado, varios autores han demostrado la formación, durante las etapas avanzadas de la RM, de compuestos mutagénicos, tales como las aminas aromáticas heterocíclicas, y prooxidantes, como los AGEs (o ALEs, cuando el grupo carbonilo procede de un lípido oxidado). En relación a estos últimos, en varios estudios se ha descrito un efecto sinérgico entre los procedentes de la dieta y los formados *in vivo* por el organismo, concluyéndose que su acumulación en los tejidos puede promover estrés oxidativo en las células, el cual está implicado en procesos de envejecimiento celular, así como en la etiología de varias enfermedades crónicas, tales como enfermedades cardiovasculares (como arteriosclerosis), diabetes y patologías derivadas (trastornos renales y formación de cataratas), enfermedades neurodegenerativas (como la enfermedad de Alzheimer) y ciertos tipos de cáncer (Ledl y Schleicher, 1990; Ames y col., 1993; Adrover y col., 2007). Además, en pacientes hiperglicémicos, con una mayor concentración de glucosa en sangre y, consecuentemente, una mayor formación endógena de AGEs, la glicosilación no enzimática puede afectar a los nucleótidos y alterar los patrones de ADN, pudiendo inducir anomalías congénitas en niños de madres diabéticas (Bucala y col., 1984).

Por todo ello, el empleo de inhibidores de grado alimentario de las etapas más avanzadas de la RM, como la piridoxamina, combinado con la optimización de las condiciones de calentamiento, podría permitirnos controlar la funcionalidad de los glicoconjugados resultantes, así como garantizar la inocuidad de los mismos.

### 1.3.2 Influencia sobre la alergenicidad proteica

Las modificaciones que tienen lugar en la estructura de las proteínas durante la RM, podrían alterar su reconocimiento por el sistema inmune. Actualmente, los escasos trabajos existentes en la literatura acerca del efecto de la glicosilación no enzimática sobre el potencial alergénico de las proteínas sin digerir proporcionan resultados contradictorios al respecto. Esto hace pensar que el efecto de la RM sobre el reconocimiento IgE de los alérgenos alimentarios depende del azúcar empleado y del tipo de alérgeno (Taheri-Kafrani y col., 2009). Algunos autores han sugerido que la interacción con azúcares podría enmascarar los epítomos de los alérgenos, reduciendo su alergenicidad (Arita y col., 2001; Enomoto y col., 2007; Bu y col., 2009; Gruber y col., 2004; Hattori y col., 1994; Hattori y col., 2004; Kato, 2002; Nakamura y col., 2008; Taheri-Kafrani y col., 2009). También se ha descrito, que la glicación de una proteína con polisacáridos podría reducir su alergenicidad de manera más eficaz que la conjugación de proteínas con monosacáridos, ya que los polisacáridos cubrirían mejor los epítomos de los alérgenos que las moléculas de menor peso molecular (Sehon, 1982). Así, por ejemplo, Hattori y col. (1994) realizaron inmunoensayos con  $\beta$ -Lg glicosilada vía RM con dextrano carboximetilado, indicando que estos conjugados podían presentar una alergenicidad reducida. La glicosilación con mono- y disacáridos, incluyendo ribosa, arabinosa, ramnosa, glucosa, galactosa y lactosa, también ha mostrado reducir la alergenicidad de la  $\beta$ -Lg, siendo en este caso necesario un elevado grado de glicosilación de la proteína para enmascarar eficazmente sus epítomos alergénicos (Taheri-Kafrani y col., 2009). Por el contrario, otros estudios han mostrado que la glicación de los alérgenos incrementa su reconocimiento por los anticuerpos IgE (Beyer y col., 2001; Maleki y col., 2000; Nakamura y col., 2005; Pastorello y col., 2002; Simonato y col., 2001), lo cual podría ser atribuido a la creación de nuevos epítomos capaces de unir IgE como resultado de las reacciones de entrecruzamiento proteico asociadas a las etapas avanzadas de la RM (Pastorello y col., 2002). Una posible explicación para estos resultados tan contradictorios puede ser que, dada la complejidad de la RM, la naturaleza y extensión de los cambios producidos en la conformación proteica y, por tanto, el efecto de la RM sobre el potencial alergénico de las proteínas, va a depender también de las condiciones bajo la cuales se lleve a cabo la reacción, incluyendo la temperatura,  $a_w$ , duración de la incubación y naturaleza del azúcar reductor (Mills y col., 2006).

Por otro lado, puesto que la mayoría de los alérgenos alimentarios sensibilizan al individuo a través del tracto gastrointestinal (TGI), el efecto de la RM sobre su digestibilidad y posterior absorción va a ser clave a la hora de evaluar el efecto de la RM sobre la alergenicidad de las proteínas lácteas. Sin embargo, no se han encontrado trabajos en la

bibliografía que aborden el efecto de la RM sobre la digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, en condiciones fisiológicas, de las proteínas lácteas y el potencial alergénico de los digeridos resultantes.

### **1.3.3 Modificación de la funcionalidad tecnológica**

Dado que la intensidad de las modificaciones producidas en la estructura de las proteínas durante la glicosilación vía RM depende del grado de avance de la misma, las propiedades tecno-funcionales de las proteínas glicadas se van a ver alteradas de una forma u otra en función del estadio de la reacción.

#### **➤ Efecto de las etapas iniciales de la reacción de Maillard**

Se ha observado que la glicación de proteínas de diversa naturaleza, bajo condiciones de incubación que no promueven el avance de la RM, mejora su **solubilidad** en un rango de pH próximo al pI (Dziuba y col., 1998; Darewicz y col., 1999; Shepherd y col., 2000; Chevalier y col., 2001b). Esto se debe fundamentalmente al aporte de grupos hidrofílicos por las moléculas de carbohidrato unidas covalentemente a la proteína, que produce una disminución en su hidrofobicidad superficial y un aumento en su carga neta negativa, dando lugar al desplazamiento de su pI hacia un pH más ácido (Haertlé y Chobert, 1999).

Existen también numerosos estudios que demuestran un aumento de la **estabilidad térmica** de proteínas del lactosuero, incluyendo la  $\beta$ -Lg, la  $\alpha$ -La y la BSA, debido a la glicosilación, evitando su agregación y precipitación y, por tanto, mejorando su solubilidad, tras el tratamiento térmico (Aoki y col., 1997; Hattori y col., 1997; Bouhallab y col., 1999; Chevalier y col., 2001b; Jiménez-Castaño y col., 2005a, 2005b y 2007; Enomoto y col., 2007).

Asimismo, varios autores han puesto de manifiesto que la glicosilación no enzimática, en etapas iniciales de la reacción, favorece la difusión y adsorción de las proteínas a las interfases aceite:aire/agua, mejorando su **capacidad para formar emulsiones y espumas**. Esto se ha atribuido a la mayor solubilidad e hidrofobicidad superficial de los glicoconjugados, siendo ésta última consecuencia de la exposición de nuevos residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína tras su glicosilación vía RM (Hattori y col., 1997). Adicionalmente, varios estudios (Nakamura y Kato, 2000) han mostrado también una mejora

en la **capacidad de las proteínas glicadas para estabilizar dispersiones alimentarias**, con respecto a la proteína sin modificar, debido a la mayor flexibilidad y carga neta de las proteínas glicadas. Esto favorece el despliegue y el reordenamiento de las mismas en la interfase, de tal manera que las moléculas de carbohidrato quedan en contacto con el medio acuoso, aportando estabilidad estérica y/o electrostática frente a la coalescencia de las gotas de aceite o de las burbujas.

Así, distintos mono- y disacáridos, incluyendo galactosa, manosa, arabinosa o lactosa, se han empleado para mejorar la solubilidad y capacidad emulsionante de diversas proteínas lácteas, incluyendo la  $\beta$ -CN, el CMP y la  $\alpha$ -La (Cabodevilla y col., 1994; Nacka y col., 1998; Groubet y col., 1999; Moreno y col., 2002). Además, la BSA se ha glicosilado vía RM con carbohidratos de mayor peso molecular, como el dextrano, galactomanano (GM) y maltodextrina, obteniéndose glicoconjugados con mejores propiedades emulsionantes que los emulsionantes comerciales (Kato y col., 1990; Kato y Kobayashi, 1991; Kim y col., 2003). Asimismo, Enomoto y col. (2005) obtuvieron WPI con mejor estabilidad térmica, así como con propiedades emulsionantes y gelificantes mejoradas por glicosilación vía RM con el oligosacárido maltopentaosa y posterior fosforilación en presencia de pirofosfato.

Asimismo, se han obtenido conjugados de  $\beta$ -Lg con diversos mono- y disacáridos, tales como la glucosa, glucosa-6-fosfato, galactosa, manosa, ribosa, arabinosa, gliceraldehído y lactosa (Aoki y col., 1997; Nacka y col., 1998; Bouhallab y col., 1999; Morgan y col., 1999a, 1999b; Chevalier y col., 2001b; Fenaille y col., 2003; Groubet y col., 1999), con una mayor solubilidad en todo el rango de pH, estabilidad térmica y mejor capacidad espumante y emulsionante que la  $\beta$ -Lg nativa. Asimismo, la  $\beta$ -Lg se ha conjugado también vía RM con distintos oligosacáridos (derivados del ácido algínico y oligofructosa) y polisacáridos (dextrano, pectinas) observándose una mejora de sus propiedades emulsionantes y espumantes tras la glicación (Nagasawa y col., 1996; Dickinson y Galazka, 1991; Dunlap y Gote, 2004; Trofinova y Jongh, 2004; Einhorn-Stoll y col., 2005; Jimenez-Castaño y col., 2005a, 2005b; Jimenez-Castaño y col., 2007).

A diferencia de las proteínas del lactosuero, la glicosilación del SC sólo resulta en una mayor solubilidad en las cercanías de su pl. A valores de pH por encima y por debajo del pl no se observan diferencias apreciables, probablemente debido a la ya excelente solubilidad del SC a estos valores de pH (Shepherd y col., 2000; Oliver y col., 2006b). Esto va a repercutir también en sus propiedades emulsionantes. De hecho, varios trabajos han demostrado que la glicación del SC con carbohidratos de distinto peso molecular, incluyendo mono- (glucosa, ribosa y fructosa), di- (lactosa), oligo- (fructooligosacáridos (inulina)), y

polisacáridos (maltodextrinas, pectinas y dextrano), sólo mejora su capacidad para formar y estabilizar emulsiones a valores de pH próximos a su pl (pH4-6), cuando la solubilidad del SC glicosilado es mayor que la del SC sin glicosilar, no observándose un efecto apreciable en condiciones de neutralidad (Shepherd y col., 2000; Morris y col., 2004; Einhorn-Stoll y col., 2005; Oliver y col., 2006b; Fechner y col., 2007).

➤ **Efecto de las etapas avanzadas y finales de la reacción de Maillard**

Durante periodos largos de almacenamiento a temperaturas elevadas, condiciones que favorecen el avance de la RM, puede darse una disminución en la solubilidad de las proteínas debido a la desnaturalización, entrecruzamiento y agregación de las mismas, lo cual da lugar a grandes complejos insolubles de naturaleza covalente (Dills, 1993; Sakai y col., 1990; Suárez y col., 1991; Groubet y col., 1999; Yeboah y col., 1999; Chevalier y col., 2001b; Aoki y col., 2001; Katayama y col., 2002; Sato y col., 2000; Tanabe y Saeki, 2001). Por otro lado, estas reacciones de entrecruzamiento y agregación proteica podrían mejorar la **viscosidad** y las **propiedades gelificantes** de las proteínas glicosiladas con respecto a las proteínas sin modificar (Matheis y Whitaker, 1984), ya que la gelificación es una consecuencia de la formación de enlaces covalentes o no covalentes entre proteínas. Así, controlando el grado de polimerización y entrecruzamiento asociados al avance de la RM, podría ser posible obtener glicoconjugados con una mayor viscosidad y mejores propiedades gelificantes que la proteína nativa.

Se han llevado a cabo varios estudios con el fin de mejorar las propiedades gelificantes de proteínas globulares de distinta naturaleza (proteínas del lactosuero, lisozima, proteínas de la clara de huevo y aislado de proteína soja) por conjugación, vía RM, con mono-, di- y polisacáridos, tales como xilosa, ribosa, glucosa, fructosa, lactosa, pectina o GM (Armstrong y col., 1994; Cabodevila y col., 1994; Easa y col., 1996; Handa y Kuroda, 1999; Rich y Foegeding, 2000; Lauber y col., 2001; Matsudomi y col., 2002; Sun y col., 2004). Estos han demostrado que los geles de proteína glicosilada se forman en presencia de menores concentraciones de proteína y en menos tiempo, son más resistentes a la ruptura, más elásticos y presentan menor tendencia a la sinéresis (mayor capacidad de retención de agua) que los convencionales. Hill y col. (1992) observaron que a mayor reactividad del azúcar reductor, mayor es su eficacia para promover la gelificación, dando geles más fuertes, debido al mayor avance de la RM.

Con respecto al SC, Ennis y Mulvihill (2000) observaron que, a pesar de su elevada viscosidad, el SC se requiere en concentraciones relativamente altas para producir

dispersiones viscosas, resultando, por tanto, en un componente caro para la industria alimentaria. Por tanto, la mejora de sus propiedades reológicas podría conducir a una funcionalidad equivalente con una menor cantidad de proteína añadida, ayudando a reducir costes de producción. Se han llevado a cabo varios intentos para mejorar la viscosidad del SC mediante la conjugación covalente con carbohidratos a través de reacciones de alquilación con una disolución de cianoborohidruro, un agente altamente tóxico, haciendo el proceso inadecuado para su aplicación en alimentos (Colas y col., 1988; Courthaudon y col., 1989). Sin embargo, a pesar de tener una conformación más abierta y flexible que las proteínas globulares y, por tanto, más susceptible de interactuar con carbohidratos vía RM, apenas se han llevado a cabo estudios acerca del efecto de la glicosilación no enzimática sobre la viscosidad y propiedades gelificantes del SC. Sólo, recientemente, Oliver y col. (2006b) glicosilaron el SC con ribosa, glucosa, fructosa, lactosa e inulina vía RM con el objetivo de describir el efecto de las condiciones de reacción, incluyendo la humedad relativa así como el tipo y la concentración de azúcar, sobre la viscosidad del SC. Los glicoconjugados de SC obtenidos mostraron un comportamiento de flujo no newtoniano, así como una viscosidad mayor que la del SC sin glicosilar. Sin embargo, no se llevaron a cabo estudios adicionales acerca del efecto de la glicosilación sobre la viscoelasticidad y capacidad para formar geles del SC.

Por otro lado, durante las etapas avanzadas y finales de la RM se forman compuestos coloreados, como las melanoidinas, así como una gran cantidad de compuestos volátiles (aldehídos, cetonas, furanos, pirazinas, furfurales y reductonas), responsables de la aparición de nuevos aromas, olores y sabores durante el procesado doméstico e industrial de los alimentos, que, pueden mejorar sus características organolépticas y resultar agradables al consumidor (Cerny, 2008).

### **1.3.4 Modificación de la funcionalidad biológica**

La interacción covalente vía RM de las proteínas con ciertos carbohidratos no sólo puede mejorar determinadas características tecnológicas y organolépticas 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 para la industria alimentaria y aportando mayores beneficios al consumidor actual. A continuación, se muestran algunos ejemplos.

➤ **Capacidad para solubilizar el fosfato cálcico**

La modificación de las proteínas con azúcares fosforilados podría 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 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 de la  $\beta$ -lactoglobulina con glucosa-6-fosfato producía un aumento en la solubilización del fosfato cálcico. Asimismo, la glicosilación y posterior fosforilación de la  $\beta$ -Lg y la  $\alpha$ -La también resultó en una mejora de la capacidad para solubilizar fosfato cálcico de ambas proteínas (Enomoto y col., 2007 y 2009).

➤ **Actividad antiinflamatoria**

Recientemente, Enomoto y col. (2009) observaron que el efecto supresor de la  $\alpha$ -La sobre la producción de citoquinas proinflamatorias, como la IL-6 y el factor- $\alpha$  de necrosis tumoral, se incrementó significativamente por glicación de la proteína con maltopentaosa y fue, también, potenciado por fosforilación con pirofosfato después de la glicosilación.

➤ **Efecto sobre la microbiota intestinal**

Mills y col. (2008) investigaron, en ensayos *in vitro* con muestras fecales, el efecto de la glicosilación no enzimática y digestión gastrointestinal simulada de la BSA con glucosa sobre la microbiota colónica de voluntarios con colitis ulcerosa. Estos autores indicaron que la BSA glicada aumentó significativamente la población de bacterias perjudiciales y disminuyó la de bacterias beneficiosas. Asimismo, se han llevado a cabo numerosas investigaciones acerca del efecto de los productos formados durante las etapas avanzadas de la RM (PRM) sobre la microbiota intestinal (Jemmali, 1969; Horikoshi y col., 1981). Así, se ha descrito que melanoidinas procedentes de sistemas modelo glucosa-lisina estimulan el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas (Ames y col., 1999; Dell'Aquila, 2003) y se ha estudiado el potencial efecto prebiótico de las melanoidinas procedentes de bebidas como el café (Borrelli y col., 2004) y de la corteza del pan (Borrelli y Fogliano, 2005).

Asimismo, algunos autores han sugerido la capacidad de algunos PRM para inhibir la adhesión de bacterias potencialmente patógenas a la mucosa gastrointestinal. Aring (1989),

en un estudio con BSA lactosilada, mostró que la galactosa terminal de la lactosa era reconocida por las adhesinas de la *Escherichia coli* K88. Más recientemente, Hiramoto y col. (2004) indicaron que los PRM derivados de la caseína lactosilada eran capaces de inhibir a la ureasa del *Helicobacter pilory* e impedir su adherencia a la mucosa gástrica. Por otro lado, diversos estudios sugieren la actividad antibiótica (de Lara y Gilliland, 1985; Einarsson y col., 1988) y antibacteriana de algunos PRM, como los procedentes de los sistemas xilosa-arginina, glucosa-arginina y glucosa-histidina (Einarsson y col., 1983, 1987a, 1987b). Asimismo, de acuerdo con varios autores, glicoconjugados resultantes de la interacción entre proteínas alimentarias y azúcares de distinta naturaleza pueden presentar también una actividad antimicrobiana mayor que la proteína nativa (Oliver y col., 2006a). Así, por ejemplo, se ha observado que la glicosilación con distintos polisacáridos, tales como dextrano y quitosano, potencia la acción antibacteriana de la lisozima, obteniéndose glicoconjugados con un efecto bactericida efectivo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, a diferencia de la lisozima nativa, sólo capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas (Nakamura y col., 1991; Song y col., 2002).

➤ **Actividad antioxidante, antimutagénica y anticancerígena**

Otra propiedad proteica que puede verse mejorada tras su glicosilación vía RM es la actividad antioxidante. Parte de la capacidad antioxidante de los PRM radica en su habilidad para quelar metales implicados en la generación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, relacionados con multitud de patologías y procesos como el envejecimiento. Esta actividad ha sido ampliamente estudiada *in vitro* en sistemas modelo consistentes en diferentes azúcares y aminoácidos (Chen y Kitts, 2008; Jing y Kitts, 2004; Kitts y Hu, 2005; Maillard y col., 2007). Asimismo, existen numerosos trabajos que avalan la mejora de la capacidad antioxidante de ciertas proteínas alimentarias modificadas vía RM con azúcares de distinta naturaleza, entre ellas: la ovoalbúmina (Nakamura y col., 1992), la seroalbúmina bovina (Alaiz y col., 1997), la  $\beta$ -Lg (Chevalier y col., 2001a) y la caseína (McGookin y col., 1991). La oxidación lipídica mediada por radicales libres es uno de los principales factores que limitan la calidad y aceptabilidad de los alimentos durante su procesado y almacenamiento. Debido a la capacidad antioxidante de ciertos PRM, algunos autores consideran que estos compuestos podrían utilizarse como aditivos alimentarios que se incorporarían directamente al alimento, o bien se formarían durante el procesado térmico, contribuyendo así a la estabilidad oxidativa del mismo (Bressa y col., 1996; Chevalier y col., 2001a).



Por otro lado, se ha propuesto que ciertas melanoidinas podrían disminuir la absorción de compuestos tóxicos con actividad mutagénica y cancerígena, como son las aminas aromáticas heterocíclicas (Somoza, 2005), mediante la quelación de las mismas (Solyakov y col., 2002). La actividad antimutagénica de los PRM se ha estudiado en sistemas modelo glucosa-lisina, glucosa-glicina, sacarosa-glicina y xilosa-lisina (Chan y col., 1979; Kato y col., 1985; Kim y col., 1986; Yamaguchi e Iki, 1986; Yen y col., 1992), estableciéndose que esta capacidad puede deberse a la presencia de sustancias reactivas en la melanoidina que actúan como neutralizadores de radicales libres, inactivadores de mutágenos o inhibidores de enzimas (Kim y col., 1986; Hayase y col., 1989).

Dado que durante el procesado térmico de los alimentos, o bien, como resultado de la glicosilación deliberada de proteínas vía RM, también se pueden formar AGEs con capacidad prooxidante y cancerígeno, un aspecto a tener en cuenta, sería el supuesto papel que una dieta rica en PRM podría tener en la formación *in vivo* de AGEs. El consumo de dietas ricas en PRM podría resultar beneficioso siempre que no se produjera un acúmulo excesivo en el organismo de AGEs, con el consiguiente efecto prooxidante. En este sentido, Zill y col. (2003) demostraron por primera vez que los PRM ingeridos con la dieta son capaces de mantener el balance oxidativo inclinado hacia la producción de antioxidantes y de incrementar la activación de enzimas implicadas en la quimiopreención de la aparición de cáncer, como la glutatión-S-transferasa. Asimismo, un estudio reciente realizado en adolescentes sanos mostró que el consumo de una dieta con un contenido en PRM moderado proporciona protección frente a un estrés oxidativo inducido (Seiquer y col., 2008).

## **2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**



Durante los últimos años, es cada vez mayor la demanda de los consumidores hacia alimentos nuevos que, además de su valor nutritivo, presenten características organolépticas mejoradas respecto a los ya existentes y, aporten un beneficio adicional en cuanto a funcionalidad tecnológica y bioactividad. Esto ha impulsado a la industria alimentaria hacia la búsqueda de nuevos ingredientes con determinados atributos funcionales. En este sentido, el aprovechamiento de subproductos de la industria alimentaria se ha convertido en una actividad de gran importancia económica, ya que además de permitir la revalorización de los nutrientes presentes en los mismos, evita su vertido y el consiguiente deterioro medioambiental. De particular interés resulta la recuperación de las proteínas del lactosuero y, concretamente, la  $\beta$ -lactoglobulina a partir de los subproductos de la industria quesera, ya que debido a su riqueza en aminoácidos esenciales y elevada funcionalidad, presentan múltiples aplicaciones, pudiendo emplearse como ingredientes para la mejora de diversos productos alimenticios.

Otras de las proteínas lácteas de gran aplicabilidad por su valor nutritivo y funcionalidad son las caseínas obtenidas por precipitación ácida a partir de la leche y utilizadas en forma de caseinatos para incrementar su solubilidad.

Sin embargo, una limitación para el uso de las proteínas lácteas en diversos alimentos es por un lado, su potencial alergénico, así como su susceptibilidad a cambios estructurales que pueden originarse como consecuencia de su extracción y procesamiento, siendo especialmente sensibles al pH, la fuerza iónica del medio y el tratamiento térmico. Por ello, la búsqueda de tratamientos capaces de mejorar eficientemente las propiedades funcionales de las proteínas, y, por tanto, de incrementar su grado de aplicabilidad, ha sido objeto de estudio durante los últimos años.

Existe una gran diversidad de tratamientos encaminados a la modificación de la estructura y, por tanto, de la funcionalidad de las proteínas, como por ejemplo, los métodos físicos, enzimáticos y/o químicos. Entre los últimos, se ha prestado especial atención a la interacción covalente proteína/carbohidrato vía reacción de Maillard (RM), existiendo evidencias importantes de que éste es uno de los métodos más seguros y adecuados para mejorar la funcionalidad de diversas proteínas alimentarias, ya que, a diferencia de otros métodos químicos utilizados para el mismo fin, la glicosilación vía RM no implica la utilización de reactivos tóxicos para el consumo humano.

Es bien conocido que la naturaleza del azúcar reductor, incluyendo peso molecular y grupo carbonilo, así como las condiciones de reacción, (temperatura,  $a_w$ , tiempo) determinan

el avance de la RM y, por tanto, tienen un papel fundamental en la obtención de proteínas glicosiladas con estructura y funcionalidad definidas. Así, durante la formación de los compuestos de Amadori (con aldosas) o de Heyns (con cetosas) en las etapas iniciales de la reacción, apenas se originan cambios estructurales drásticos y, consecuentemente, de funcionalidad en las proteínas. Sin embargo, durante las etapas avanzadas y finales, junto con la formación de compuestos fluorescentes y coloreados se producen modificaciones estructurales (agregación) a tal nivel que puede verse alterada la funcionalidad de las proteínas. Además, debido a los posibles efectos indeseables asociados al avance de la reacción, tales como el deterioro de las características organolépticas y del valor nutritivo de los alimentos, así como la formación de compuestos mutagénicos y prooxidantes, es necesario llevar a cabo un control más exhaustivo de la RM, para lo cual el uso de inhibidores de grado alimentario de las etapas avanzadas de la RM, tales como la piridoxamina (PM), podría resultar de gran utilidad. A pesar de los numerosos estudios existentes en la bibliografía no se han encontrado datos disponibles acerca de la utilidad de la PM como inhibidor de la RM en alimentos sólidos, y de su impacto sobre la agregación proteica asociada a estados más avanzados de la reacción. Asimismo, tampoco existen estudios sobre el efecto de la PM sobre la RM en sistemas PM-cetosa, lo cual resultaría también de interés debido a que las cetosas dan lugar a una mayor agregación proteica que las aldosas durante las etapas avanzadas de la RM.

Por otro lado, bajo condiciones controladas de reacción, la  $\beta$ -lactoglobulina y el caseinato sódico se han conjugado vía RM con distintos mono-, di-, oligo- y polisacáridos, incluyendo ribosa, arabinosa, glucosa, galactosa, fructosa, glucosa-6-fosfato, ramnosa, lactosa, lactulosa, oligofructosa, maltodextrinas, pectinas y dextrano, para mejorar su funcionalidad. Sin embargo, no se ha llevado a cabo ningún estudio comparativo sobre los cambios estructurales de dichas proteínas tras su glicación con galactosa, tagatosa, lactosa y dextrano. Puesto que las modificaciones en la estructura de la proteína nativa inducidas por la RM pueden afectar a sus propiedades funcionales, es preciso disponer de técnicas estructurales que permitan una caracterización exhaustiva de las proteínas glicadas, incluyendo los sitios de glicación. En este sentido las técnicas basadas en la espectrometría de masas constituyen unas de las herramientas más útiles para tal fin.

Con respecto a la funcionalidad tecnológica, mediante la glicación, fundamentalmente con dextrano, se han obtenido glicoconjugados de  $\beta$ -lactoglobulina y caseinato sódico con una capacidad para formar y estabilizar emulsiones alimentarias superior a la de la proteína original. En estos estudios, las emulsiones o/w se formaron con diferentes sistemas de emulsificación mecánica, siendo procesos poco eficientes, ya que la mayoría de la energía

aplicada se disipa como calor. En este sentido, la combinación de la glicosilación vía RM con el empleo de los ultrasonidos de alta intensidad (HI-US), reconocidos como una alternativa más eficiente a los sistemas de emulsificación convencionales, puede potenciar en mayor medida las propiedades emulsionantes de las proteínas lácteas.

Asimismo, apenas se han encontrado estudios acerca de la capacidad espumante de las proteínas lácteas glicosiladas. Esto puede ser debido a que tanto la  $\beta$ -Lg como las caseínas en su estado nativo, presentan una excelente capacidad espumante debido a que reducen rápidamente la tensión superficial en la interfase aire-agua. Sin embargo, en el caso del caseinato, las espumas que se originan son poco estables por lo que resulta de interés el estudio del efecto de la glicosilación de esta proteína vía RM, especialmente sobre su capacidad estabilizadora de espumas. Además, tampoco existen estudios en los que se investigue el efecto de la glicación de estas proteínas sobre sus propiedades espumantes en relación a las propiedades interfaciales de las películas de proteína glicada adsorbida.

Con respecto a la funcionalidad biológica, no se han encontrado estudios en los que se aborde el impacto de la glicosilación no enzimática de las proteínas lácteas sobre su digestibilidad y la alergenicidad de los digeridos resultantes. Además, aún no se conoce con exactitud el efecto de dicha reacción sobre la resistencia de los alérgenos proteicos a la digestión. Los trabajos realizados hasta el momento muestran resultados contradictorios, si bien estos ensayos realizados *in vitro* se llevaron a cabo sin someter a los glicoconjugados a una posterior digestión gastrointestinal. En algunos de los trabajos donde se ha observado una potencial reducción de la inmunogenicidad de las proteínas tras su conjugación con diversos carbohidratos, se ha encontrado un mayor efecto en el caso de carbohidratos de mayor peso molecular.

Otro de los aspectos importantes en la funcionalidad biológica de las proteínas glicosiladas es el potencial efecto que pudieran ejercer los glicoconjugados a nivel de la microbiota intestinal. Mientras que la tagatosa, carbohidrato con carácter prebiótico reconocido, es casi completamente fermentada en el ciego y colon proximal, varios estudios llevados a cabo acerca de la biodistribución y metabolismo de los compuestos de Amadori en humanos, indican que éstos no son digeridos en el tracto gastrointestinal, pudiendo alcanzar las zonas más distales del colon, donde tienen lugar la mayoría de los trastornos intestinales crónicos. Este hecho es de especial relevancia ya que, los productos de Amadori derivados de la glicación con galactosa (tagatosil-derivados) formados durante las etapas iniciales de la RM, podrían constituir una buena alternativa al carbohidrato prebiótico de origen.

Por otra parte, es bien conocido que un gran número de infecciones intestinales mediadas por lectinas que reconocen oligosacáridos diana son provocadas por microorganismos tales como *Escherichia coli*. En este sentido, cabe la posibilidad de que la presencia en el intestino de otras glicoproteínas, las cuales pudieran ser ingeridas como ingredientes alimentarios, pueda originar un efecto competitivo y evitar o reducir la colonización del patógeno en la mucosa intestinal. Los escasos antecedentes que existen indican que la BSA de diferentes especies, glicosilada vía reacción de Maillard podrían inhibir la adhesión de *E. coli* al intestino. En estos trabajos realizados *in vitro* no se estudió el efecto de la glicoproteína tras la digestión gastrointestinal y, además, el único carbohidrato empleado fue la lactosa.

El **OBJETIVO** de este trabajo ha sido investigar la influencia de la naturaleza del azúcar reductor sobre los cambios estructurales de la  $\beta$ -Lg y del SC debidos a la glicosilación vía reacción de Maillard, así como evaluar el efecto de tales cambios estructurales sobre las propiedades tecnológicas y bioactivas de los glicoconjugados obtenidos, con el fin de disponer de nuevos ingredientes alimentarios con funcionalidad mejorada con respecto a la proteína original.

Para conseguir este objetivo se abordó el siguiente **PLAN DE TRABAJO** resumido en el **Esquema 01**:

**1.** Glicosilación vía RM de la  $\beta$ -Lg y del SC con Gal, Tag, Lac, DX<sub>10</sub> y DX<sub>20</sub>, bajo condiciones de reacción controladas (tiempo, temperatura, actividad de agua y relación carbohidrato:proteína). Estudio del efecto de la naturaleza del carbohidrato sobre el avance de la reacción mediante la determinación del grado de glicosilación no enzimática de la  $\beta$ -Lg y del SC.

**2.** Estudio del efecto inhibitor de las etapas avanzadas de la RM de la piridoxamina, con el fin de controlar la formación de agregados proteicos.

**3.** Caracterización estructural de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC empleando técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectrométricas. Para la identificación y caracterización, incluyendo los sitios de glicación de los péptidos glicosilados, se ha desarrollado un método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.

**4.** Evaluación del efecto del grado de glicación y de agregación proteica sobre la funcionalidad tecnológica de la  $\beta$ -Lg y del SC.

- Estudio del comportamiento de flujo y viscoelástico de los glicoconjugados de SC.
- Evaluación del efecto de la glicación sobre las propiedades emulsionantes del SC, empleando ultrasonidos como procedimiento de emulsificación.
- Determinación de las propiedades espumantes de los glicoconjugados  $\beta$ -Lg/SC:Gal y relación con sus propiedades interfaciales.

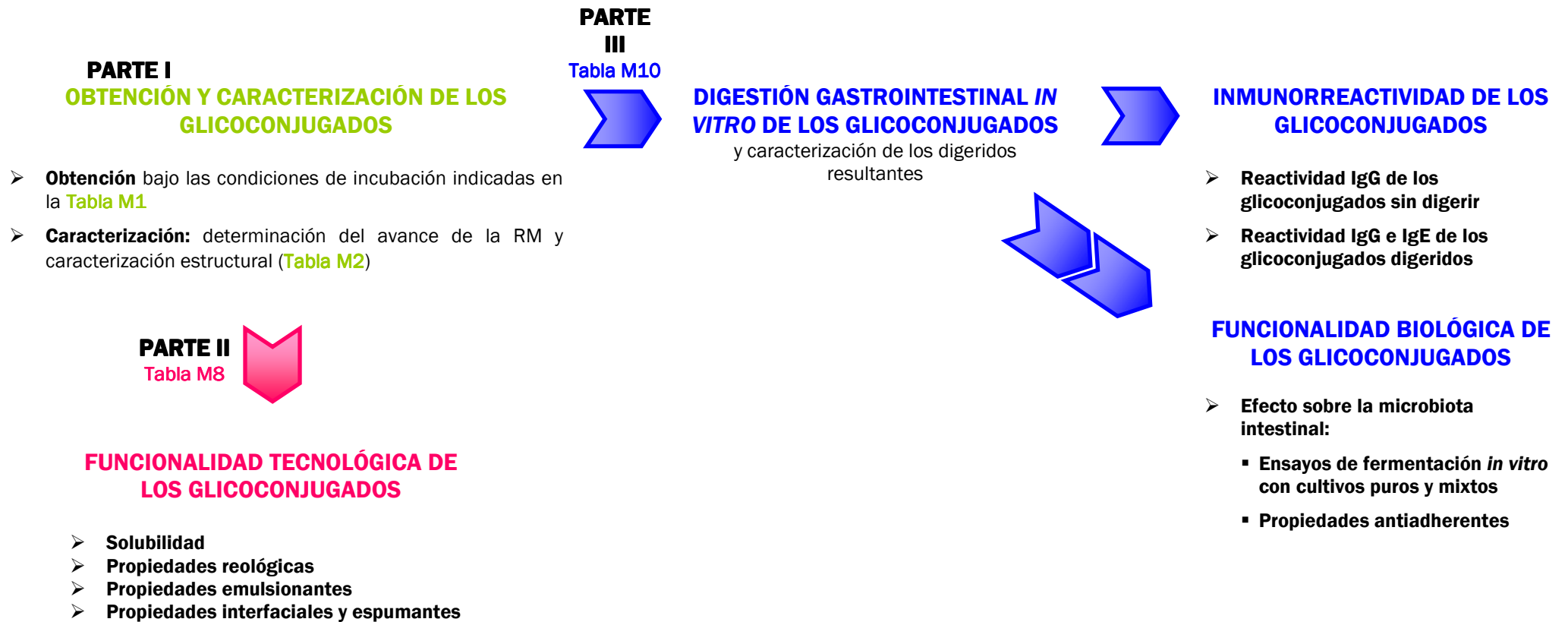
**5.** Estudio del efecto del grado de glicación y de agregación proteica sobre la digestibilidad de la  $\beta$ -Lg y del SC.

**6.** Evaluación del efecto de la glicosilación vía RM y posterior digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la funcionalidad biológica de la  $\beta$ -Lg y del SC.

- Ensayos de inmunorreactividad *in vitro* mediante ELISA directo e indirecto.
- Ensayos de fermentabilidad *in vitro* con cultivos puros de bacterias lácticas y bifidobacterias y con cultivos mixtos procedentes de muestras fecales.
- Ensayos de inhibición *in vitro* de la adhesión de *Escherichia coli* a mucina, en presencia y en ausencia de lectinas.



## ESQUEMA 01. Esquema general del plan de trabajo



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **PARTE I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GLICOCONJUGADOS**


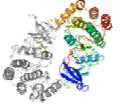
### **3.1 OBTENCIÓN DE LOS GLICOCONJUGADOS**

La  $\beta$ -Lg y el SC se glicosilaron vía reacción de Maillard (RM) con azúcares reductores de distinto peso molecular, incluyendo Gal, Tag, Lac, DX<sub>10</sub> y DX<sub>20</sub>, y bajo condiciones controladas de actividad de agua ( $a_w$ ), pH, temperatura y tiempo de incubación, con el fin de obtener glicoconjugados con distintas propiedades estructurales, en función del progreso de la RM.

#### **3.1.1 Glicación de la $\beta$ -lactoglobulina con galactosa, tagatosa, lactosa y dextrano de 10 y 20 kDa**

Los carbohidratos (Gal, Tag, Lac, DX<sub>10</sub>, DX<sub>20</sub>) y la  $\beta$ -Lg (mezcla de variantes A y B) se disolvieron en tampón fosfato sódico 0.1 M y pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en las siguientes relaciones proteína:carbohidrato (p/p): 1:1 para las mezclas  $\beta$ -Lg:Gal / Tag y 1:2 para las mezclas  $\beta$ -Lg:Lac / DX<sub>10</sub> / DX<sub>20</sub>. Los dextransos de 10 y 20 kDa fueron previamente dializados frente a agua desionizada, empleando para ello membranas de diálisis con un tamaño de corte de 3,5 kDa (Spectra/Por® 3 Biotech dialysis membrane, Spectrum Europe, Breda, Dinamarca) para eliminar los oligosacáridos de bajo peso molecular. Tras la congelación a -20 °C y posterior liofilización de las mezclas, los productos en polvo proteína-carbohidrato resultantes se incubaron en un desecador a vacío con una  $a_w$  de 0,44 ( $\beta$ -Lg:Gal / Tag / Lac) o 0,65 ( $\beta$ -Lg: DX<sub>10</sub> / DX<sub>20</sub>), obtenida mediante el equilibrado de las muestras en un desecador durante una semana con una disolución saturada de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o de IK, respectivamente (Merck, Darmstadt, Alemania), a distintas condiciones de tiempo y temperatura en función del carbohidrato empleado, con el fin de obtener productos con distinto grado de glicación y agregación (**Tabla M1**): con Gal o Tag, la  $\beta$ -Lg se incubó a 40 y 50 °C durante un tiempo máximo de 144 horas, tomando muestras a las 4, 8, 24, 48, 72, 96 y 144 horas ( $a_w = 0,44$ ); en presencia de Lac, la  $\beta$ -Lg se incubó a 60 °C durante 8 y 48 horas ( $a_w = 0,44$ ) (Fenaille y col., 2004); con DX<sub>10</sub> los glicoconjugados se obtuvieron tras la incubación de la  $\beta$ -Lg a 60 °C durante 36 horas ( $a_w = 0,44$ ) y a 55 °C durante 96 y 168 horas ( $a_w = 0,65$ ); y, por último, con DX<sub>20</sub> se obtuvieron conjugados tras la incubación de la  $\beta$ -Lg a 60 °C durante 60 horas ( $a_w = 0,44$ ) y a 55 °C durante 96 horas ( $a_w = 0,65$ ) (Jiménez-Castaño y col., 2007).

**Tabla M1.** Condiciones de incubación de la  $\beta$ -Lg y del SC con Gal, Lac y DX de 10 y 20 kDa.

Proteína *	Carbohidrato *	Condiciones de incubación **		
		Temperatura (°C)	Tiempo (h)	$a_w$
 <b><math>\beta</math>-Lg</b>	Gal	40	144	0,44
		50		
	Tag	40	144	0,44
		50		
	Lac	60	8	0,44
			48	
DX <sub>10</sub>	55	96, 168	0,65	
	60	36	0,44	
DX <sub>20</sub>	55	96	0,65	
	60	60	0,44	
 <b>SC</b>	Gal	50	96	0,67
	Lac	60	24	
	DX <sub>10</sub>			

\* La proteína y los carbohidratos se almacenaron por separado en idénticas condiciones de tiempo y temperatura (controles). \*\* Incubaciones realizadas por duplicado

Además, con el fin de estudiar el efecto de la piridoxamina (PM) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) como inhibidor de las etapas avanzadas de la RM, se realizaron almacenamientos en paralelo de las mezclas  $\beta$ -Lg:Gal / Tag en ausencia y en presencia (20 mM) de dicho inhibidor en una relación  $\beta$ -Lg:PM de 1:0,24 (p/p) (Voziyan y col., 2003).

### 3.1.2 Glicación del caseinato sódico con galactosa, lactosa y dextrano de 10 kDa

Los carbohidratos (Gal, Lac, DX<sub>10</sub>) y el SC (Rovita FN 5, Provedora Hispano Holandesa, S.A. Barcelona, España) se disolvieron en tampón fosfato sódico 0.1 M y pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en las siguientes relaciones proteína:carbohidrato (p/p): 1:0,2 para las mezclas SC:Gal / Lac y 1:2 para las mezclas SC:DX<sub>10</sub>. El dextrano de 10 kDa se dializó previamente como se ha explicado anteriormente. Tras la congelación a -20 °C y posterior liofilización de las mezclas, los productos en polvo proteína-carbohidrato resultantes se incubaron en un desecador a vacío con una  $a_w$  de 0,67 (Oliver y col., 2006b), obtenida mediante el equilibrado de las muestras en un desecador durante una semana con una disolución saturada de CuCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El almacenamiento se llevó a

cabo a 50 y 60 °C durante un tiempo máximo de 96 y 24 h, respectivamente, tomando muestras a las 4, 8, 24, 48, 72 y 96 h (a 50 °C) y a las 2, 4, 8, 24 h (a 60 °C), con el fin de obtener productos con distinto grado de glicación y agregación ([Tabla M1](#)).

## **3.2 PURIFICACIÓN DE LOS GLICOCONJUGADOS**

Tras la incubación, los productos se reconstituyeron en agua bidestilada a una concentración de proteína de 1 mg·mL<sup>-1</sup>. Con el fin de separar los carbohidratos libres (que no reaccionaron con la β-Lg/SC) y la PM en exceso de los glicoconjugados β-Lg:Gal/Tag, se ultrafiltraron 2 mL de muestra (equivalentes a 2 mg de proteína) por centrifugación a 1548 g durante 2 h a temperatura ambiente. Para ello, se emplearon membranas de ultrafiltración hidrofílicas con un tamaño de corte de 3 kDa (Centricon® YM-3, Millipore Corp., Bedford, MA), para los conjugados con Gal, Tag y Lac, o de 30 kDa para los conjugados con DX<sub>10</sub> y DX<sub>20</sub>. Por último, los retenidos se reconstituyeron con agua bidestilada hasta la concentración inicial de proteína de 1 mg·mL<sup>-1</sup>. Tanto los retenidos como los permeados se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis.

## **3.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS GLICOCONJUGADOS**

Con el fin de facilitar la lectura de este apartado, en la [Tabla M2](#) se resumen todos los glicoconjugados obtenidos bajo las distintas condiciones de glicación ensayadas y los análisis realizados para evaluar el avance de la RM y para la caracterización estructural de cada uno de ellos.

### **3.3.1 Determinación del avance de la reacción de Maillard**

#### **3.3.1.1 Evaluación de las etapas iniciales**

Las etapas iniciales de la RM se evaluaron a través de la medida de los derivados obtenidos tras las hidrólisis ácidas de los compuestos de Amadori / Heyns formados durante las etapas iniciales de la RM.

**Tabla M2.** Resumen de los análisis llevados a cabo con los glicoconjugados obtenidos para determinar el avance de la reacción de Maillard y su caracterización estructural.

<b>GLICOCONJUGADOS</b>					
	<b>SC:Gal / Lac / DX<sub>10</sub></b>	<b>β-Lg:Gal / Tag</b>	<b>β-Lg:Gal /Tag + PM</b>	<b>β-Lg:Lac</b>	<b>β-Lg:DX<sub>10</sub> / DX<sub>20</sub><sup>*</sup></b>
<b><u>Determinación del avance de la RM:</u></b>					
Etapas Iniciales (RP-LC-UV de par iónico)	✔	✔	✔		✔
Etapas avanzadas (AGEs)	✔	✔		✔	
Etapas finales (Color)	✔	✔	✔	✔	✔
Medida grupos NH <sub>2</sub> libres		✔			✔
Determinación de Carbohidratos libres			✔		
<b><u>Caracterización estructural:</u></b>					
RP-LC-UV	✔	✔			
IEF		✔			
SDS-PAGE		✔			
MALDI-TOF-MS	✔	✔	✔	✔	
LC/ESI-MS	✔				
SEC	✔	✔	✔		
Espectroscopía de correlación de fotones	✔				
Fluorescencia intrínseca		✔			
Hidrofobicidad superficial	✔	✔		✔	

\* La caracterización de estos conjugados se llevó a cabo previamente en nuestro laboratorio (Jiménez-Castaño, 2005).

Las muestras de proteína ( $\beta$ -Lg y SC) glicada (con y sin PM, en el caso de la  $\beta$ -Lg glicada con Gal y Tag), así como los controles de proteína calentada, se sometieron a hidrólisis ácida para obtener los correspondientes derivados ácidos de los compuestos de Amadori o de Heyns. Para ello, 2 mg de  $\beta$ -Lg o SC se incubaron con 400  $\mu$ L de HCl 8 N en tubos Pyrex a 110 °C durante 23 h, bajo condiciones inertes (helio). Tras la incubación, se adicionaron 2 mL de HCl 8 N y las muestras se filtraron con papel Whatman n°40 (Moreno y col., 2002). Posteriormente, 500  $\mu$ L del hidrolizado se introdujeron en un cartucho de extracción en fase sólida Sep-Pack C<sub>18</sub> (Waters, Milford, MA, USA), previamente activado con 5 mL de metanol y 10 mL de agua bidestilada. Finalmente, los compuestos retenidos en el cartucho se eluyeron con 3 mL de HCl 3 N, de los cuales 50  $\mu$ L se inyectaron en el equipo de LC. El calibrado se realizó empleando concentraciones conocidas (de 0.52 a 5.2 mg·mL<sup>-1</sup>) de un patrón comercial puro de furosina (Neosystem Laboratories, Strasbourg, Francia). Los datos se expresaron en mg de furosina por 100 mg de proteína.

El análisis de los hidrolizados se llevó a cabo por LC en fase inversa (RP-LC) de par iónico con detección UV a 280 nm, empleando una columna C<sub>8</sub> (Alltech furosine-dedicated; Alltech, Nicholasville, KY) (250 mm x 4,6 mm d.i). El equipo utilizado constó de una bomba binaria modelo 250 (Perkin-Elmer), un inyector manual Rheodyne (modelo 9125) provisto de un bucle de inyección de 50  $\mu$ L, un horno para termostatar la columna (Kariba Instruments), un detector UV de longitud de onda variable (LDC Analytical) y una interfase modelo 406 (Beckman). La adquisición y el procesado de los datos se realizó utilizando el programa System Gold versión 711 (Beckman Instruments).

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura de la columna, 37°C; flujo 1,2 mL·min<sup>-1</sup>; fase móvil: eluyente A, 0,4% ácido acético grado HPLC (Scharlau, Barcelona, España) en agua bidestilada (v/v); eluyente B, 0,3% KCl (Merck) en el eluyente A (p/v). La elución se llevó a cabo con el gradiente lineal mostrado en la [Tabla M3](#).

**Tabla M3.** Gradiente lineal empleado en la separación de los derivados ácidos de los compuestos de Heyns y Amadori por RP-LC-UV (Resmini y col., 1990).

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	100	0
12,5	100	0
19,5	50	50
22	50	50
24	100	0
32	100	0



### **3.3.1.2 Evaluación de las etapas avanzadas**

Los AGEs (“*advanced glycation endproducts*”), formados durante las etapas avanzadas de la RM, presentan una fluorescencia característica, claramente distinguible de la del triptófano en proteínas, con un máximo de excitación y de emisión a longitudes de onda entre 340 y 370 nm y entre 420 y 450 nm, respectivamente. Por ello, la intensidad de fluorescencia de los AGEs es ampliamente utilizada como indicador de las etapas avanzadas de la RM, tanto en sistemas modelo como en muestras biológicas (Leclère y Birlouez-Aragon, 2001; Rufian-Henares y col., 2002; Matiacevich, 2006).

La fluorescencia de los AGEs (fluorescencia extrínseca) se midió en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 (Shimadzu Co., Kyoto, Japón) y a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) de 340 nm y de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 415 nm, de acuerdo con el método de Ponger y col. (1984). Para ello, las muestras de proteína ( $\beta$ -Lg/SC) nativa, control calentada y glicada, se disolvieron en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7) hasta una concentración final de proteína de 1 mg·mL<sup>-1</sup>.

### **3.3.1.3 Evaluación de las etapas finales**

La formación de los compuestos poliméricos pardos, característicos de las etapas finales de la RM, se estimó mediante la medida de la absorbancia a 420 nm ( $A_{420}$ ) de los glicoconjugados, tanto de  $\beta$ -Lg como de SC, usando un espectrofotómetro Beckman DU 70 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). Además, en el caso del estudio acerca del efecto del inhibidor PM sobre el avance de la RM, también se midió la absorbancia a 420 nm de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag con y sin PM, así como de los carbohidratos Gal /Tag incubados en ausencia de  $\beta$ -Lg con y sin PM.

### **3.3.1.4 Cuantificación de los grupos amino primarios libres**

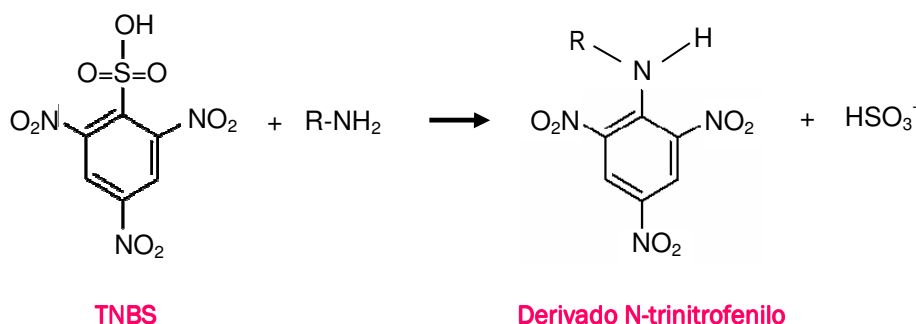
La medida de la pérdida de grupos amino primarios libres es una herramienta que contribuye a la estimación del grado de modificación de las proteínas vía RM (Ajandouz y col., 2001; Benjakul y col., 2005; Chevalier y col., 2001a y 2001b; Rufián-Henares y col., 2002).

En el presente trabajo, la pérdida de grupos amino libres de la  $\beta$ -Lg glicada durante el avance de la RM se determinó mediante espectrofluorimetría empleando ácido 2,4,6-

trinitrobenzensulfónico (TNBS) (McKellar, 1981) (Figura M1) y o-ftaldehído (OPA) (Ramírez-Jímenez y col., 2004) (Figura M2).

#### 3.3.1.4.1 Método del TNBS

Cada una de las muestras (0,2 mL, equivalentes a 0,2 mg de  $\beta$ -Lg) se incubó con 2 mL de borato sódico 0,4 M pH 9,2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y con 0,8 mL de disolución TNBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 0,2% en agua (p/v) (TNBS 6,8 mM) durante 30 min, en oscuridad y temperatura ambiente. Para parar la reacción, a los 30 min se añadieron 0,8 mL de una mezcla de fosfato sódico monobásico 2 M y sulfito sódico 18 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y, seguidamente, se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 70 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton CA, USA). Finalmente, la absorbancia se transformó en  $\mu$ moles de grupos amino primarios de leucina por mL, empleando una curva de calibrado con un rango de concentración de 0,03-0,50  $\mu$ M.

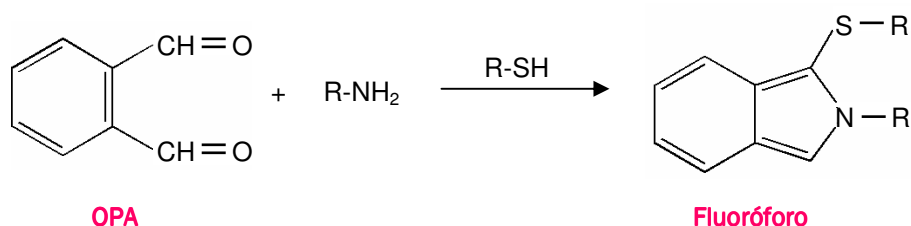


**Figura M1.** Reacción global del TNBS con los grupos amino primarios libres de las proteínas, dando lugar a derivados N-trinitrofenilo, los cuales absorben en el espectro de luz UV (340-365 nm) y visible (415-420 nm).

#### 3.3.1.4.2 Método del OPA

Para la preparación de los reactivos, 40 mg de OPA (Fluka, Buchs, Suiza) se disolvieron en 1 mL de metanol 95% (Panreac grado HPLC, Barcelona, España), 1,5 mL de dodecil sulfato sódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 20% (p/v), 50 mL de tetraborato sódico 0,1 M pH 9,5 (Acros Organics, Geel, Bélgica) y 200  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Alemania). A continuación, 1,8 mL de la disolución de OPA se añadieron a 0,6 mL de las muestras (1 mg·mL<sup>-1</sup>) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente.

Seguidamente, se midió la fluorescencia de la mezcla a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 460 nm empleando un espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 (Shimadzu Co., Kyoto, Japón). Para hacer la recta de calibrado se empleó *N*- $\alpha$ -acetil-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en un intervalo de concentraciones de 10 a 250  $\mu$ M.



**Figura M2.** Reacción global del OPA con los grupos amino primarios libres de las proteínas, en presencia de un agente reductor, dando lugar a compuestos altamente fluorescentes (isoindoles) que pueden ser cuantificados por espectrofluorimetría.

### **3.3.1.5 Cuantificación de la pérdida total de carbohidratos en presencia y ausencia de piridoxamina**

La cuantificación de carbohidratos se llevó a cabo de acuerdo al método colorimétrico de la antrona-ácido sulfúrico usando placas de 96 pocillos (Microtest Plate 96-Well. Sarstedt, Inc. Newton, NC), descrito por Laurentin (2003). Brevemente, 40  $\mu$ L/pocillo de agua (blanco), estándar (0,05, 0,1, 0,25, 0,5 y 1,0 g/L de galactosa) o muestra (Gal/Tag control calentado y conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag incubados con y sin PM durante 144 h a 40 y 50 °C) se alicuotaron por triplicado, manteniéndose la microplaca en un baño de hielo a 4 °C durante toda la reacción. A continuación, se añadieron 0,1 mL/pocillo de solución de antrona (2 g/L en ácido sulfúrico concentrado), preparada en el momento de su utilización. Luego, la placa se agitó con cuidado en el vórtex y se incubó a 92 °C en un baño de agua sin agitación. Tras 3 min, la placa se pasó a otro baño de agua sin agitación a temperatura ambiente, en el cual se mantuvo durante 5 min para parar la reacción. Una vez alcanzada la temperatura adecuada, la placa se llevó a una estufa a 45 ° durante 15 min para su total secado. Por último, se midió la absorbancia a 630 nm usando un espectrofotómetro de microplacas PowerWave XS (Bio-Teck, Winooski, VT). La concentración de azúcar presente en cada muestra se estimó usando la curva de calibrado obtenida dentro del rango de concentración de los estándares

(0,05-1 g/L), representada por la ecuación:  $y = 3,03x + 0,0825$ , con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,999.

### 3.3.2 Caracterización estructural de los glicoconjugados

#### 3.3.2.1 Cromatografía líquida en fase inversa con detección ultravioleta (RP-LC-UV)

Con el fin de confirmar la glicación de la proteína, las muestras se analizaron por RP-LC-UV, determinándose de forma cualitativa la formación de los glicoconjugados derivados. Para ello, las muestras (50  $\mu$ L) se inyectaron en una columna de fase inversa C<sub>4</sub> Ace® (300 Å de tamaño de poro, 250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula) (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, UK).

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: flujo 1 mL·min<sup>-1</sup>; fase móvil: eluyente A, 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA, Merck, Darmstadt, Alemania) en agua bidestilada (v/v), eluyente B, 0,1% TFA en agua bidestilada:acetonitrilo de grado HPLC (Scharlau Chemie, Barcelona, España) (1:9, v:v). La detección se realizó a 214 nm usando un detector ultravioleta Beckman 166UV (Beckman Instruments) y la elución se realizó a temperatura ambiente según el programa mostrado en la [Tabla M4](#).

**Tabla M4.** Gradiente lineal empleado en la separación de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag por RP-LC-UV.

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	60	40
25	35	65
26	0	100
36	60	40
50	60	40

Por otro lado, en el caso particular del análisis de los posibles productos de interacción entre la piridoxamina y la galactosa o la tagatosa, las muestras (75  $\mu$ L) [los permeados de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag incubados en presencia de PM, así como los carbohidratos Gal/Tag incubados con PM y en ausencia de  $\beta$ -Lg] se inyectaron en una columna Tracer Excel 120 ODSB (25 x 0,46 cm, 5  $\mu$ m) (Teknokroma, Barcelona) a temperatura ambiente. Como fase móvil se empleó tampón fosfato potásico 0,5 mM pH 6 (eluyente A) y acetonitrilo de grado

HPLC (Scharlau Chemie, Barcelona, España) (eluyente B). La detección se realizó a 321 nm usando un detector Beckman 166UV (Beckman Instruments) y la elución se realizó según el programa mostrado en la [Tabla M5](#).

**Tabla M5.** Gradiente lineal empleado en la separación de los compuestos de interacción PM-Gal/Tag por RP-LC-UV (Adrover y col., 2005).

Tiempo	Voltaje	Intensidad
1 h	100 V	18 mA/gel
1 h	200 V	18 mA/gel
30 min	500 V	18 mA/gel

### 3.3.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida por isoelectroenfoque (IEF)

Para comprobar si la glicación de las proteínas ocasionaba cambios en su punto isoelectrico (pI), se empleó el isoelectroenfoque. Los análisis se llevaron a cabo en un equipo automatizado NuPAGE Novex® Pre-Cast gel system PowerEase 500 Power supply (Invitrogen, CA, USA) y los geles empleados fueron geles homogenizados comerciales ya polimerizados Novex® IEF pH 3-7. 25 µL de cada muestra se mezclaron con 25 µL de tampón de carga (2X Novex® IEF pH 3-7, Invitrogen, CA, USA) y 20 µL se cargaron en el gel. Para la separación se empleó una mezcla de dos tampones comerciales, ánodo y cátodo 10X Novex® IEF pH 3-7 (Invitrogen, CA, USA). La migración electroforética se llevó a cabo siguiendo el programa descrito en la [Tabla M6](#). Finalmente, la tinción del gel se realizó empleando un kit de tinción “Colloidal Blue Staining Kit” (Invitrogen, CA, USA), siguiendo las condiciones del fabricante.

**Tabla M6.** Programa empleado para la migración electroforética en geles Novex® IEF.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% Acetonitrilo
0	0,5	0
15	0,5	0
19	0,5	2
19,9	0,5	2
20	1	2
30	1	2
35	1	5
40	1	10
60	1	11
70	1	40
80	1	40
90	1	0
100	1	0

El pI de las proteínas se estimó empleando una mezcla de proteínas estándar de pI entre 3 y 7 (Invitrogen, CA, USA) constituida por: mioglobina (pI = 6,9), anhidrasa carbónica (pI = 6,0),  $\beta$ -lactoglobulina bovina A (pI = 5,2) y B (pI = 5,3), inhibidor de tripsina (pI = 4,5), glucosa oxidasa (pI = 4,2) y amiloglucosidasa (pI = 3,5). Midiendo la distancia recorrida por cada marcador de pI, se construyó la siguiente recta de calibrado:  $y = -42,15x + 36,64$ , donde “y” es la distancia recorrida por la banda y “x” es el  $\text{Log}_{10}\text{pH}$ . A continuación, se midió la distancia recorrida por la proteína glicada (desde el punto medio de cada banda hasta los pocillos) e, interpolando ésta en la recta de calibrado, se obtuvo el pI de los glicoconjugados.

### **3.3.2.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)**

Para confirmar la glicación de las proteínas y la posible formación de agregados, las muestras se analizaron por SDS-PAGE. Los análisis se llevaron a cabo en un equipo automatizado NuPAGE Novex® Pre-Cast gel system PowerEase 500 Power supply (Invitrogen, CA, USA) y los geles empleados fueron geles comerciales de poliacrilamida al 12% ya polimerizados NuPAGE Novex® Bis-Tris (Invitrogen, CA, USA). 32,5  $\mu\text{L}$  de las muestras almacenadas se mezclaron con 12,5  $\mu\text{L}$  de tampón de carga 4X NuPAGE® LDS (Invitrogen, CA, USA) y 5  $\mu\text{L}$  de dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y, a continuación, se calentaron a 70°C durante 10 min y se cargaron 20  $\mu\text{L}$  en el gel. Para la separación se empleó un tampón comercial NuPAGE ácido 2-(N-morfolino)-etanolsulfónico (MES)-SDS (Invitrogen, CA, USA) y la migración electroforética se llevó a cabo a 120 mA/gel y 200V, durante 40 min. Por último, la tinción del gel se llevó a cabo empleando el kit de tinción “Colloidal Blue Staining Kit” (Invitrogen, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El peso molecular de las proteínas se estimó empleando una mezcla de proteínas estándar de masas moleculares relativas entre 200 y 2,5 kDa (Invitrogen, CA, USA), constituida por: miosina (200 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116,3 kDa), fosforilasa B (97,4 kDa), BSA (66 kDa), glutámico deshidrogenasa (55,4 kDa), lactato deshidrogenasa (36,5 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa), aprotinina (6 kDa), insulina cadena B (3,5 kDa) e insulina cadena A (2,5 kDa).

### **3.3.2.4 Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS)**

Los análisis de MALDI-TOF-MS se realizaron con un espectrómetro de masas Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado con un láser pulsado de nitrógeno ( $\lambda =$

337 nm, 3 ns de anchura de pulso y 3 Hz de frecuencia) y una fuente de iones de extracción retardada. Los iones generados por la desorción del láser se introdujeron en el tubo de vuelo (1,3 m de longitud) con un voltaje de aceleración de 25 kV, un voltaje de extracción del 93%, un voltaje de guía del 0,05% y un tiempo de retardo de 350 ns. Los espectros de masas fueron obtenidos en modo lineal positivo en el intervalo de  $m/z$  10000-35000. Se usó mioglobina (corazón de caballo) como calibrante de masas externo y ácido sinapínico [10 mg·mL<sup>-1</sup> en TFA 0,3%:acetonitrilo (70:30, v:v)] como matriz. Las muestras se mezclaron con la matriz en una proporción aproximada de 1:15 (v:v), y, finalmente, 1 µL de esta disolución se colocó en una placa de muestras de acero inoxidable y se secó con una corriente de aire.

### **3.3.2.5 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray (LC-ESI-MS)**

Antes de las separaciones por LC-ESI-MS, las muestras se disolvieron en 1 mL de tampón Tris/HCl pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), el cual contenía urea 8M (Riedel-de Haën, Seelze, Alemania) y dithiothreitol 20 mM (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), hasta una concentración final de proteína de 10 mg·mL<sup>-1</sup>. Tras incubar 1 h a 37 °C, las muestras se diluyeron 3 veces en la fase A y se filtraron con membranas de PVDF (0,45 µm, Synta, Madrid, España).

Los análisis de LC-ESI-MS se llevaron a cabo usando un cromatógrafo de líquidos Finnigan Surveyor con un sistema de bombas de tipo cuaternario, acoplado a un detector fotodiodo array (PDA) Finnigan Surveyor y a una trampa iónica Finnigan LCQ Deca usando electronebulización (ESI) como fuente de ionización. El volumen de inyección fue 7 µL y se empleó un inyector automático Finnigan Surveyor. Todos los equipos fueron Thermo Fisher Scientific (San José, CA, USA).

#### **➤ *Condiciones de la separación por RP-LC-UV***

Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna BioBasic-4 (100 mm x 2,1 mm, 5 µm) (Thermo Fisher Scientific) a 25 °C de acuerdo con el método previamente descrito por Neveu y col. (2002) con ligeras modificaciones.

Las condiciones de separación empleadas fueron las siguientes: flujo 200 µL/min; fase móvil: eluyente A, 0,25% de ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemania) en agua

bidestilada (v/v), eluyente B, 0,25% de ácido fórmico en acetonitrilo (v/v) (grado LC-MS Chromasolv®, Riedel-de Haën, Seelz, Alemania). El detector PDA operó en un rango de  $\lambda$  de 190 a 600 nm para registrar el espectro UV, mientras que la  $\lambda$  de detección se fijó en 280 nm. La elución se realizó según el programa mostrado en la **Tabla M7**.

**Tabla M7.** Gradiente lineal empleado en la separación de los conjugados SC:Gal/Lac por LC-ESI-MS.

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	80	20
2	80	20
5	60	40
12	50	50
15	20	80
20	20	80
21	80	20
36	80	20

➤ *Condiciones del espectrómetro de masas*

El voltaje del nebulizador de la fuente de ionización se ajustó a 4,5 kV y la temperatura del capilar a 200 °C, usando nitrógeno (99,5% de pureza) como gas de nebulización (0,6 L·min<sup>-1</sup>) y de secado (6 L·min<sup>-1</sup>) y helio (99,999% de pureza) como gas de colisión. Los espectros de masas se registraron en modo negativo.

➤ *Tratamiento de datos*

La adquisición y procesado de datos se realizó usando el programa informático Xcalibur (versión 1.2, Thermo Fisher Scientific). Los espectros de proteínas se deconvolucionaron usando la herramienta de deconvolución BIOMASS del programa informático BioWorks (versión 3.1, Thermo Fisher Scientific).

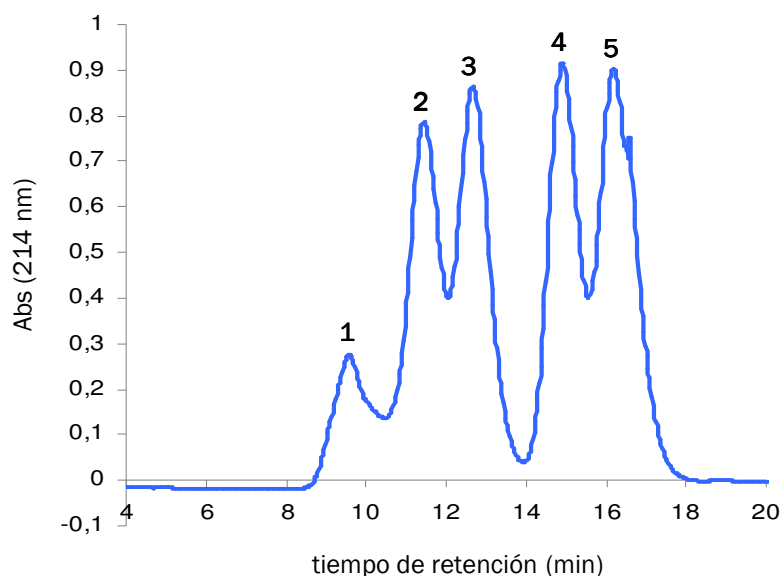
### **3.3.2.6 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)**

Los análisis se llevaron a cabo en condiciones no desnaturalizantes en un equipo de FPLC ÄKTA explorer 100 usando una columna Superdex 75 HR de 24 mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). 100  $\mu$ L de muestra se inyectaron en la columna a



temperatura ambiente. La fase móvil empleada fue tampón fosfato sódico 0,05 M y pH 7,3, conteniendo NaCl 0,15 M. La elución se llevó a cabo en modo isocrático a 0,8 mL·min<sup>-1</sup> durante 30 min y la detección de las proteínas eluidas se realizó a 214 nm.

Para la estimación del peso molecular ( $P_m$ ) de los conjugados obtenidos se hizo una curva de calibrado con proteínas estándar de distinto  $P_m$  a una concentración individual de 1 mg·mL<sup>-1</sup>. Las proteínas estándar empleadas fueron la seroalbúmina humana (67 kDa), la ovoalbúmina (43 kDa), el  $\alpha$ -quimotripsinógeno (25 kDa) y la ribonucleasa A (13,7 kDa) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). El volumen muerto de la columna fue determinado con dextrano azul 2000 (Figura M3).



**Figura M3.** Cromatograma obtenido por SEC de la mezcla de proteínas estándar. [1] Dextrano azul 2000; [2] albúmina sérica bovina; [3] ovoalbúmina; [4]  $\alpha$ -quimotripsinógeno; [5] ribonucleasa A.

Además, el SC nativo (10 mg) se sometió a condiciones desnaturalizantes con 1 mL de tampón Tris/HCl 0,1 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), el cual contenía urea 8 M (Riedel-de Haën, Seelze, Alemania) y DTT 20 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y calentado durante 1 hora a 37 °C antes de llevarse a cabo el análisis por SEC bajo las condiciones descritas arriba. Asimismo, considerando que todas las proteínas estándar empleadas para hacer el calibrado de la columna tenían una estructura globular, en el caso del SC usaremos el término de peso molecular relativo ( $P_r$ ).

### **3.3.2.7 Espectroscopía de correlación de fotones**

El perfil de distribución de tamaño de partícula de las muestras (3 mg·mL<sup>-1</sup> en agua bidestilada) se determinó por espectroscopía de correlación de fotones (PCS), técnica basada en la dispersión de la luz por las partículas de la muestra. Para ello se utilizó un analizador de partículas Delsa Nano C (Beckman-Coulter, Fullertone, CA), calculándose el diámetro medio de partícula como la media de 70 funciones de auto-correlación de la luz dispersada (ángulo 165°; “pin hole” 20 mμ; Kcps >10).

### **3.3.2.8 Determinación de la fluorescencia intrínseca**

Para llevar a cabo las medidas de fluorescencia intrínseca (debida al triptófano), las muestras se diluyeron en tampón fosfato sódico 0,1 M y pH 7,4 a una concentración de 1 mg·mL<sup>-1</sup>. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 (Shimadzu Co., Kyoto, Japón) y los espectros se registraron entre 300 nm y 400 nm, previa excitación de la muestra a 280 nm.

### **3.3.2.9 Determinación de la hidrofobicidad superficial**

La hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ) se determinó mediante la capacidad de unión de los ligandos fluorescentes ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico (ANS) o retinol (RET) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La intensidad de fluorescencia relativa (IF) de los conjugados ligando-proteína se midió en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 (Shimadzu Co., Kyoto, Japón) a temperatura ambiente. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron, respectivamente, 390 nm y 470 nm para el ANS y 330 nm y 470 nm para el RET.

#### ***3.3.2.9.1 Capacidad ligante de ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico***

En primer lugar, con el fin de determinar la concentración de las muestras idónea para llevar a cabo los análisis, se hizo una curva de calibrado empleando concentraciones conocidas de proteína ( $\beta$ -Lg/SC) nativa entre 0,01 y 0,2 mg·mL<sup>-1</sup>, las cuales dieron valores de IF entre 13,6 y 87,9 respectivamente. La disolución de  $\beta$ -Lg/SC a 0,1 mg·mL<sup>-1</sup> dio un valor de IF intermedio, por lo que ésta fue la concentración elegida. Así, las muestras de proteína control calentada y glicada se diluyeron con tampón fosfato sódico 0,1 M y pH 7,4 a una concentración final de 0,1 mg·mL<sup>-1</sup>. A continuación, 10  $\mu$ L de ANS (8 mM en tampón fosfato

sódico 0,1 M y pH 7,4) se añadieron a 1 mL de muestra y, tras dejar equilibrar las muestras durante 2 min, se midió la IF a temperatura ambiente.

### **3.3.2.9.2 Capacidad ligante de retinol**

La capacidad ligante de RET fue medida por fluorescencia de acuerdo con el método de Hattori y col. (1993). Para ello, las muestras se diluyeron en tampón fosfato salino (PBS; tampón fosfato sódico 0,11 M y pH 7,1, conteniendo NaCl 0,04 M) a una concentración final de 1 mg·mL<sup>-1</sup> y 2 mL de esta disolución se dispusieron en una cubeta. A continuación, cantidades crecientes (5 µL cada vez) de RET (2,26 mM en etanol absoluto) se fueron añadiendo a la cubeta y, tras agitar las muestras vigorosamente, se dejaron equilibrar 5 min antes de medir la IF.

Las disoluciones de ANS en tampón fosfato sódico y de RET en etanol absoluto se prepararon diariamente. En el caso de la actividad ligante de RET, tanto el etanol como el PBS empleado para diluir las muestras se desgasificaron burbujeando helio para inhibir la oxidación del RET.

## PARTE II: FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA DE LOS GLICOCONJUGADOS

Una vez conocidas las características estructurales de cada uno de los glicoconjugados obtenidos, se llevaron a cabo una serie de ensayos con el fin de conocer el efecto de las modificaciones producidas en la estructura de la  $\beta$ -Lg y del SC durante la glicosilación vía RM sobre su funcionalidad tecnológica.

En la [Tabla M8](#) se recoge un resumen de los glicoconjugados sometidos a cada uno de los estudios de funcionalidad tecnológica llevados a cabo en la presente memoria.

### 3.4 DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD

Para la evaluación de la solubilidad, el pH de la proteína ( $\beta$ -Lg y SC) nativa, control calentada y glicada, disuelta en agua bidestilada ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  proteína), se ajustó a 5 y 7 usando HCl y NaOH 1N. Tras 30 min de agitación a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron durante 15 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $15.000 \text{ g}$ . El contenido en proteína de los sobrenadantes se determinó midiendo la absorbancia a  $280 \text{ nm}$  ( $\text{Abs}_{280}$ ) usando un espectrofotómetro Beckman DU 70 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). La solubilidad se expresó como el porcentaje del contenido total de proteína, considerando la  $\text{Abs}_{280}$  de la  $\beta$ -Lg y SC nativos como el 100%.

### 3.5 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS

Con el fin de estudiar el efecto de la glicación sobre las propiedades de flujo y viscoelásticas de la  $\beta$ -Lg y del SC, se prepararon dispersiones en agua destilada de proteína glicada y control calentada, a una concentración final de proteína de  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $150 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente. Para ello, las muestras ([Tabla M8](#)) se mantuvieron a temperatura ambiente ( $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\sim 16 \text{ h}$ ) con agitación intermitente hasta su completa hidratación. Asimismo, para poder determinar el efecto del carbohidrato libre sobre las propiedades reológicas de la proteína, también se analizaron controles formados por  $\beta$ -Lg/SC y carbohidrato, calentados por separado y mezclados en la misma relación p/p que los glicoconjugados y en el momento del análisis (control calentado de  $\beta$ -Lg/SC + carbohidrato). Las medidas reológicas se llevaron a cabo usando un reómetro de estrés controlado (modelo AR2000, TA Instruments, New Castle, DE), equipado con una placa Peltier.

**Tabla M8.** Resumen de los estudios de funcionalidad tecnológica llevados a cabo con los glicoconjugados correspondientes.

<b>GLICOCONJUGADOS</b>							
<b>FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA *</b>	<b>SC:Gal</b>	<b>SC:Lac</b>	<b>SC:DX<sub>10</sub></b>	<b>β-Lg:Gal</b>	<b>β-Lg:Lac</b>	<b>β-Lg:DX<sub>10</sub></b>	<b>β-Lg:DX<sub>20</sub></b>
<b>Solubilidad</b>	4 h, 60 °C <sup>a</sup> 72 h, 50 °C <sup>b</sup>			24 h, 40 °C <sup>a</sup> 48 h, 50 °C <sup>b</sup>			
<b>Propiedades reológicas</b>		96 h, 50 °C <sup>a</sup> 24 h, 60 °C <sup>b</sup>		48 h, 50 °C <sup>b</sup>	48 h, 60 °C <sup>b</sup>	96 h, 55 °C <sup>a</sup> 168 h, 55 °C <sup>a</sup>	96 h, 55 °C <sup>a</sup>
<b>Propiedades emulsionantes</b>	4 h, 60 °C <sup>a</sup> 72 h, 50 °C <sup>b</sup>	8 h, 60 °C <sup>a</sup> 24 h, 50 °C <sup>b</sup>	8 h, 60 °C <sup>a</sup> 96 h, 50 °C <sup>a</sup>	24 h, 40 °C <sup>a</sup> 48 h, 50 °C <sup>b</sup>	8 h, 60 °C <sup>a</sup> 48 h, 60 °C <sup>b</sup>	36 h, 60 °C <sup>a</sup>	60 h, 60 °C <sup>a</sup>
<b>Propiedades interfaciales y espumantes</b>	4 h, 60 °C <sup>a</sup> 72 h, 50 °C <sup>b</sup>			24 h, 40 °C <sup>a</sup> 48 h, 50 °C <sup>b</sup>			

\* Todas las determinaciones se llevaron a cabo, al menos, por duplicado.

<sup>a</sup> Glicoconjugados en estados iniciales de la RM, con la máxima formación del compuesto de Amadori; <sup>b</sup> Glicoconjugados en estados avanzados de la RM, con un elevado grado de agregación.

### 3.5.1 Curvas de fluidez y viscosidad

Las propiedades de flujo de un fluido se definen a partir de la relación existente entre una fuerza o sistema de fuerzas externas y su respuesta, ya sea como deformación o flujo. Dicho sistema de fuerzas se representa matemáticamente mediante el esfuerzo cortante ( $\tau$ , mPa), mientras que la respuesta dinámica del fluido se cuantifica mediante la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ , s<sup>-1</sup>). En función del comportamiento reológico, se distinguen 3 tipos de fluidos; Newtonianos y no Newtonianos, los cuales se dividen a su vez en dependientes e independientes del tiempo y viscoelásticos.

En el presente trabajo, las curvas de fluidez se obtuvieron monitorizando el esfuerzo cortante ( $\tau$ , mPa) frente a un gradiente de velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ , s<sup>-1</sup>) de 0 a 120 s<sup>-1</sup>, registrando datos cada 0,3 s durante 1 min. Todas las medidas se hicieron a 25 °C usando una geometría plato-plato (diámetro de plato = 40 mm; gap = 0,3 mm) y un volumen de muestra constante de 200  $\mu$ L. Las curvas de fluidez obtenidas se evaluaron usando los siguientes modelos reológicos:

**a. Modelo Newtoniano:** los fluidos newtonianos se caracterizan por cumplir la Ley de Newton, es decir, por presentar una relación lineal entre el esfuerzo cortante ( $\tau$ ) y la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) (Figura M4), donde la viscosidad (viscosidad dinámica o absoluta,  $\mu$ , Pa-s) es la constante de proporcionalidad (Ecuación M1).

Ley de Newton: 
$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad [M1]$$

En este tipo de fluidos la viscosidad no depende del esfuerzo cortante aplicado, manteniéndose constante a lo largo del tiempo de aplicación del esfuerzo.

**b. Ley potencial o de Ostwald:** formulación matemática (Ecuación M2) apropiada para describir a los fluidos no newtonianos independientes del tiempo que presentan un comportamiento pseudoplástico (shear-thinning) o dilatante (shear-thickening). Estos se caracterizan, respectivamente, por una disminución o un aumento de su esfuerzo cortante ( $\tau$ ) con la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) (Figura M4).

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad [M2]$$

donde  $K$  y  $n$  son constantes para un fluido particular. La constante  $K$  ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ), denominada coeficiente de consistencia, es una medida de la consistencia del fluido y sus dimensiones dependen del valor de  $n$ ; y el exponente  $n$ , denominado índice de comportamiento de flujo, es indicativo de la desviación respecto al fluido con comportamiento newtoniano.

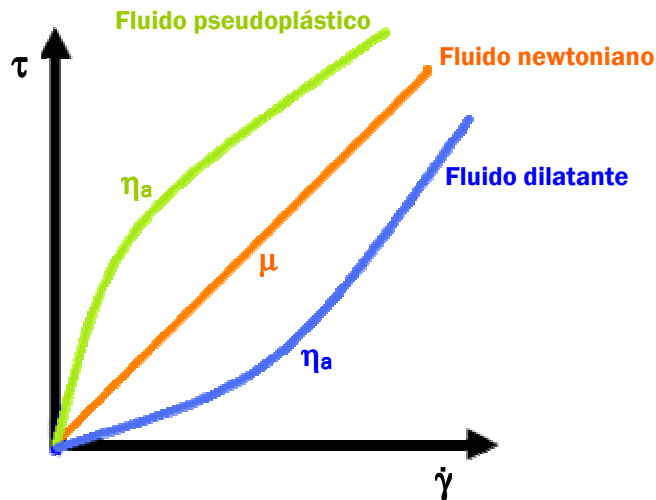


Figura M4. Curvas de fluidez características de los fluidos newtonianos, pseudoplásticos y dilatantes.

Para el caso especial de los **fluidos Newtonianos** ( $n = 1$ ), el coeficiente de consistencia  $K$  es la viscosidad del fluido ( $\mu$ ). Sin embargo, para el caso de los **fluidos pseudoplásticos** ( $0 < n < 1$ ) y **dilatantes** ( $n > 1$ ), se define un coeficiente de viscosidad aparente ( $\eta_a$ , Pa·s), como:

$$\eta_a = \tau / \dot{\gamma} \quad [M3]$$

reemplazando la [M2] en la [M3] resulta:

$$\eta_a = K \cdot \dot{\gamma}^n / \dot{\gamma} = K \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)} \quad [M4]$$

El valor de la viscosidad aparente ( $\eta_a$ ) cambia con el incremento de la velocidad de deformación, por lo que para calcularla se suele tomar un valor de  $\dot{\gamma}$  arbitrario. En nuestro

caso, con el objetivo de comparar la viscosidad de las diferentes muestras estudiadas, ésta se calculó a una velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) de  $60 \text{ s}^{-1}$ .

### 3.5.2 Determinación de la viscoelasticidad

Los fluidos viscoelásticos se caracterizan por presentar a la vez tanto propiedades viscosas (de fluido) como elásticas (de sólido). Esta mezcla de propiedades puede ser debida a la existencia en el líquido de moléculas muy largas y flexibles o también a la presencia de partículas líquidas o sólidos dispersos.

Con el fin de determinar el posible comportamiento viscoelástico de los glicoconjugados estudiados, se llevó a cabo un ensayo dinámico oscilatorio. Para ello, un volumen constante de  $350 \mu\text{L}$  de muestra se transfirió al reómetro equipado con una geometría de cono y plato (diámetro de plato =  $40 \text{ mm}$ ; gap =  $0,03 \text{ mm}$ ) y una placa Peltier a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tras  $3 \text{ min}$  de estabilización de la temperatura, se aplicó a la muestra una deformación sinusoidal del  $1\%$  (dentro del rango lineal, intervalo en el cual el esfuerzo es proporcional linealmente a la deformación aplicada) en un rango de frecuencia de la oscilación de  $0,1$  a  $100 \text{ Hz}$ . Las propiedades viscoelásticas se determinaron monitorizando el esfuerzo generado frente a la deformación dinámica aplicada, el cual se puede representar por la ecuación:

$$\tau(t) = \gamma_0 \cdot G'(\omega) \text{sen}(\omega t) + \gamma_0 \cdot G''(\omega) \text{cos}(\omega t) \quad \text{[M5]}$$

donde  $\gamma_0$  es la amplitud de deformación,  $\omega$  es la frecuencia angular dinámica ( $\text{rads}^{-1}$ ) y  $G'$  y  $G''$  son los dos componentes del esfuerzo generado;  $G'$  es el módulo de corte elástico o de almacenamiento (Pa) (medida de la energía almacenada por cada ciclo e indicador de la firmeza del fluido) y  $G''$  es el módulo de corte viscoso o de pérdida (Pa) (medida de la energía disipada como calor por ciclo e indicador de la fluidez del material).

Otra propiedad viscoelástica comúnmente usada es la tangente del ángulo de fase,  $\tan \delta$  (Ecuación M6), la cual describe los efectos de los componentes viscoso y elástico en el comportamiento viscoelástico e indica la transición de solución ( $\tan \delta > 1$ ) a gel ( $\tan \delta < 1$ ).

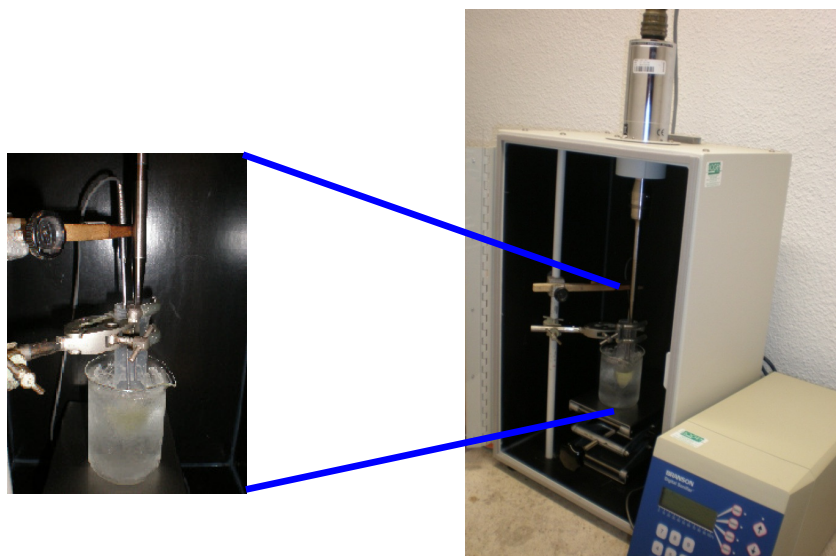
$$\tan \delta = G'' / G' \quad \text{[M6]}$$



## 3.6 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIONANTES

### 3.6.1 Preparación de las emulsiones de aceite en agua por ultrasonidos

Disoluciones proteicas (4 mL) de SC nativo, control calentado y glicado (ver [Tabla M8](#)) en tampón fosfato sódico 0,1 M y pH 7,0 se mezclaron y emulsionaron con 1 mL de aceite de girasol usando un sonicador 450 Digital (Branson Ultrasonics Corporation), el cual disponía de un vástago, terminado en una micropunta cónica (diámetro de 3,2 mm, máxima amplitud de onda de 120  $\mu\text{m}$ ), directamente unido a un horno disruptor (20 kHz, 400 W). Todo el proceso de emulsificación se llevó a cabo a temperatura controlada (< 40 °C), sumergiendo las muestras en un baño de agua/hielo, y a presión atmosférica ([Figura M5](#)).



**Figura M5.** Sonicator empleado para formar las emulsiones. La figura ampliada muestra la sonda empleada para el control de la temperatura de la muestra.

### 3.6.2 Optimización del proceso de emulsificación por ultrasonidos

Con el fin de optimizar el proceso de emulsificación por ultrasonidos (US), se evaluó el efecto de tres variables experimentales (concentración de proteína nativa (C,  $\text{mg mL}^{-1}$ ),

amplitud de onda ultrasónica (A, %) y tiempo de sonicación (t, s)) sobre los índices de actividad (EAI) y estabilidad ( $\Delta$ EAI, %) emulsionante del SC nativo. Para ello, se desarrolló un diseño experimental de tres niveles (-1, 0, +1) del tipo Box-Behnken para 3 factores, consistente en 12 ensayos. A este diseño se le agregaron 3 tratamientos centrales (0,0,0) extra, para estimar el error experimental, que hicieron un total de 15 ensayos (Tabla M9).

**Tabla M9.** Variables y niveles empleados en el diseño Box-Behnken.

Ensayo	Concentración de proteína (mgmL <sup>-1</sup> )	Amplitud (%)	Tiempo de sonicación (s)
1	0,5 (-1)	40 (0)	20 (-1)
2	4,5 (+1)	40 (0)	20 (-1)
3	2,5 (0)	20 (-1)	20 (-1)
4	4,5 (+1)	60 (+1)	40 (0)
5	4,5 (+1)	40 (0)	60 (+1)
6	0,5 (-1)	40 (0)	60 (+1)
7	0,5 (-1)	20 (-1)	40 (0)
8	2,5 (0)	60 (+1)	60 (+1)
9	2,5 (0)	20 (-1)	60 (+1)
10	2,5 (0)	60 (+1)	20 (-1)
11	4,5 (+1)	20 (-1)	40 (0)
12	0,5 (-1)	60 (+1)	40 (0)
13	2,5 (0)	40 (0)	40 (0)
14	2,5 (0)	40 (0)	40 (0)
15	2,5 (0)	40 (0)	40 (0)

Los niveles indicados están codificados, ya que cada valor representa un nivel particular de la variable; el más bajo (-1), medio o central (0) y el más alto (+1). Estos se describen en la Tabla M9. El rango de concentraciones se eligió en base a los resultados existentes en la bibliografía (Moreno y col., 2002; Oliver y col., 2006b; O´Regan y Mulvihill, 2009), mientras que los rangos de amplitud y tiempo de sonicación se establecieron en base a las limitaciones del equipo (amplitud de onda máxima = 70%) y en ensayos preeliminares desarrollados con el fin de determinar el tiempo máximo de sonicación que permitía mantener la temperatura de la muestra por debajo de 40 °C.

La relación entre las variables estudiadas se ajustó a la siguiente ecuación polinómica de segundo grado:

$$R = \beta_0 + \beta_1 C + \beta_2 A + \beta_3 t + \beta_{1,1} C^2 + \beta_{2,2} A^2 + \beta_{3,3} t^2 + \beta_{1,2} CA + \beta_{1,3} Ct + \beta_{2,3} At + \varepsilon \quad [M7]$$

donde  $R$  es la variable respuesta (EAI o  $\Delta EAI\%$ ),  $\beta_0$  es una constante,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  son coeficientes lineales,  $\beta_{1,1}$ ,  $\beta_{2,2}$  y  $\beta_{3,3}$  son coeficientes polinómicos,  $\beta_{1,2}$ ,  $\beta_{1,3}$  y  $\beta_{2,3}$  son coeficientes vectoriales y  $\varepsilon$  es la variable error. Los parámetros del modelo se estimaron por regresión lineal múltiple usando el programa StatGraphics Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA), que permite tanto la creación como el análisis de diseños experimentales.

Bajo las condiciones óptimas de concentración, amplitud y tiempo de sonicación, se llevaron a cabo también experimentos en modo pulsado mediante la aplicación de dos pulsos de 20 s con un intervalo de 10 s entre ellos.

Por último, con el fin de comparar la técnica de US con la homogenización convencional, se prepararon emulsiones mezclando 1 mL de aceite de girasol y 4 mL de una disolución de SC nativo ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) usando un Ultra-turrax TP 18/10 (Janke and Kunkel of IKA Labortechnik).

### **3.6.3 Determinación de la actividad y estabilidad emulsionante de los glicoconjugados de caseinato sódico**

Para evaluar el efecto de la glicación sobre las propiedades emulsionantes del SC se prepararon emulsiones de aceite en agua con los glicoconjugados indicados en la [Tabla M8](#), bajo las condiciones óptimas de US previamente determinadas con el SC nativo. Todas las emulsiones se hicieron por triplicado.

La actividad y estabilidad emulsionante de las muestras se midieron por espectroturbidez, de acuerdo con el método de Pearce y Kinsella (1978), ligeramente modificado por Chobert y col. (1988b).

Para la determinación de la **actividad emulsionante**, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la emulsión inmediatamente después de su formación y se diluyeron 1000 veces en NaCl 0,1 M y pH 7, conteniendo SDS al 0,1% (w/v). Tras la agitación de los tubos para homogeneizar la mezcla, se midió la absorbancia a 500 nm usando un espectrofotómetro Beckman DU 70 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). La actividad emulsionante se expresó como el índice de actividad emulsionante (EAI,  $\text{m}^2\text{-g}^{-1}$ ), siendo

$$\text{EAI} = 2Td/\phi c \quad \text{[M8]}$$

donde  $T$  es la turbidez =  $2.303 A/l$  ( $A$  = absorbancia a 500 nm y  $l = 1$  cm),  $\phi$  es la relación en v:v de la fase oleosa:proteica = 0,2,  $c$  es la concentración de proteínas en  $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ , y  $d$  es el factor de dilución = 1000.

Para evaluar la **estabilidad de las emulsiones**, éstas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 h. Pasado ese tiempo, se agitaron durante 15 min y se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$ . Éstas se diluyeron 1000 veces y la turbidez ( $\text{EAI}_{24\text{h}}$ ) se midió como se ha explicado anteriormente. A continuación, las emulsiones mantenidas 24 h a temperatura ambiente, se calentaron a 80 °C durante 30 min, se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agitaron 15 min. Tras la agitación, de nuevo se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$ , que se diluyeron antes de medir su turbidez ( $\text{EAI}_{80^\circ\text{C}}$ ) a 500 nm. El índice de estabilidad emulsionante se calculó de la siguiente forma:

$$\Delta\text{EAI}\% = [(\text{EAI}_{\text{max}} - \text{EAI}_{80^\circ\text{C}}) / (\text{EAI}_{\text{max}})] \cdot 100 \quad \text{[M9]}$$

donde  $\text{EAI}_{\text{max}}$  es el valor más alto entre EAI y  $\text{EAI}_{24\text{h}}$ . Cuanto menor sea el valor de  $\Delta\text{EAI}\%$ , mejor será la estabilidad de la emulsión.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en dos ensayos independientes. El **análisis estadístico** para determinar las diferencias significativas entre la capacidad para formar y estabilizar emulsiones de las distintas muestras estudiadas se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y el test DMS empleando el programa SPSS para Windows versión 12.7 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P < 0,05$ .

## 3.7 PROPIEDADES INTERFACIALES Y ESPUMANTES

### 3.7.1 Determinación de las propiedades interfaciales

Las propiedades interfaciales de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC, obtenidos bajo las condiciones indicadas en la [Tabla M8](#), se determinaron a pH 7 y 5. Para ello, las muestras se disolvieron en tampón Trizma-HCl (0,05 M, pH 7,0) o tampón acético-acetato (0,05 M, pH 5,0) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), siendo 5 mg·mL<sup>-1</sup> la concentración final de proteína.

#### 3.7.1.1 Determinación de la cinética de adsorción

La cinética de adsorción de la proteína a la interfase aire/agua se evaluó partir del incremento de la presión superficial ( $\pi$ , mN·m<sup>-1</sup>) con el tiempo, siendo:

$$\pi = \sigma_0 - \sigma \quad \text{[M10]}$$

donde  $\sigma_0$  es la tensión superficial de la disolución acuosa ( $\sigma_0 = 72,5$  mN·m<sup>-1</sup>) y  $\sigma$  (mN·m<sup>-1</sup>) es el valor de la tensión superficial en presencia de la proteína.

Dado que la velocidad de incremento de la  $\pi$  está inicialmente controlada por la difusión de la proteína desde el seno de la fase acuosa hacia la interfase, en el presente estudio, la cinética de adsorción de la proteína se evaluó considerando la primera etapa de difusión, mediante la determinación de la constante aparente de difusión ( $K_{Dif}$ ) ([Figura M6](#)).

Para registrar la variación de la presión superficial ( $\pi$ ) con el tiempo se empleó el método de la gota pendiente, usando un tensiómetro de gota (Tracker, IT Concept, Longessaigne, France) ([Figura M7](#)).

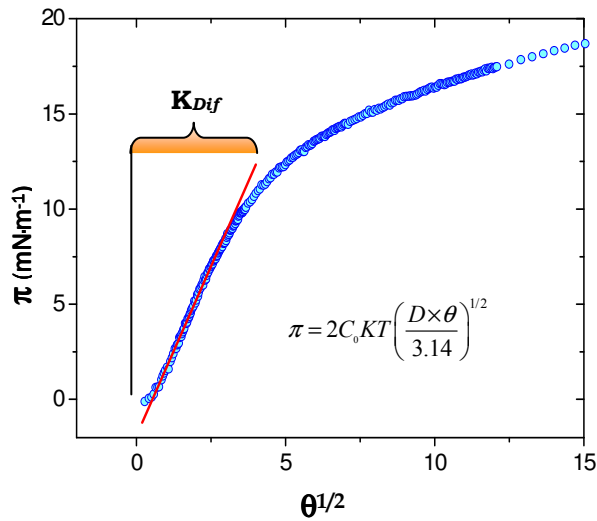


Figura M6. Cálculo de la constante de difusión ( $K_{Dif}$ ) de la proteína

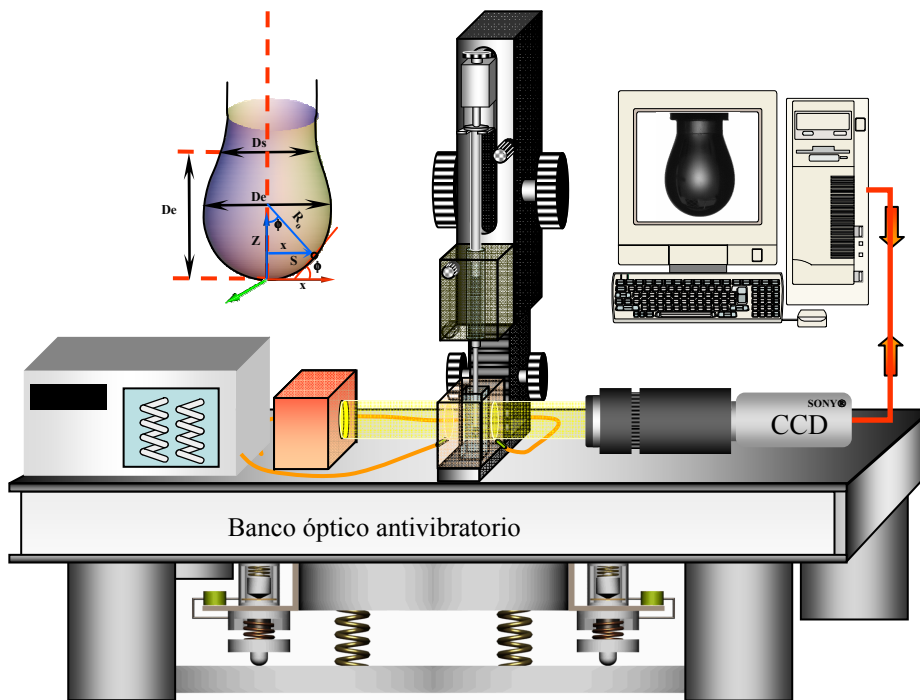


Figura M7. Tensiómetro de gota (Tracker)

Este método consiste en la formación de una gota en el extremo de una jeringa micrométrica, la cual termina en un capilar (aguja), que se introduce en el interior de una cubeta de vidrio (10 mm x 20 mm x 40 mm), termostalizada a 20 °C (temperatura controlada con un baño de circulación de agua). La gota, suspendida del extremo de la



dilatacional superficial,  $E_d = |E| \cdot \cos\phi$  ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ); y la parte imaginaria del módulo, o componente de pérdida, es la viscosidad dilatacional superficial,  $E_v = |E| \cdot \sin\phi$  ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ).

$$E = E_d + iE_v \quad \text{[M12]}$$

Mediante la relación entre la componente de pérdida y la de almacenamiento puede determinarse la tangente del ángulo de pérdida ( $\tan \phi$ ) (**Ecuación M13**), que es el desfase de la respuesta de la tensión (o presión) superficial respecto a la deformación sinusoidal aplicada. Esta magnitud proporciona una idea de cuán elástico es el comportamiento de la película interfacial, de forma que cuanto menor sea su valor, más elástica será la interfase.

$$\tan \phi = \frac{E_v}{E_d} \quad \text{[M13]}$$

El tensiómetro de gota permite crear deformaciones periódicas del área interfacial de la gota. De forma que, durante los ciclos de oscilación, el procesador de imágenes calcula de forma automática la evolución de las propiedades reológicas dilatacionales de la interfase con respecto al tiempo y, durante los ciclos sin oscilación, registra la variación de la tensión superficial con el tiempo, permitiendo estudiar, así, en un mismo experimento, tanto la cinética de adsorción de la proteína a la interfase como el comportamiento reológico de la película de proteína adsorbida. En el presente estudio, la gota se sometió a medidas repetidas con 5 ciclos de oscilación seguidos por otros 50 ciclos sin oscilación, hasta el tiempo requerido para la adsorción de la proteína (3 horas aproximadamente).

### 3.7.2 Determinación de las propiedades espumantes

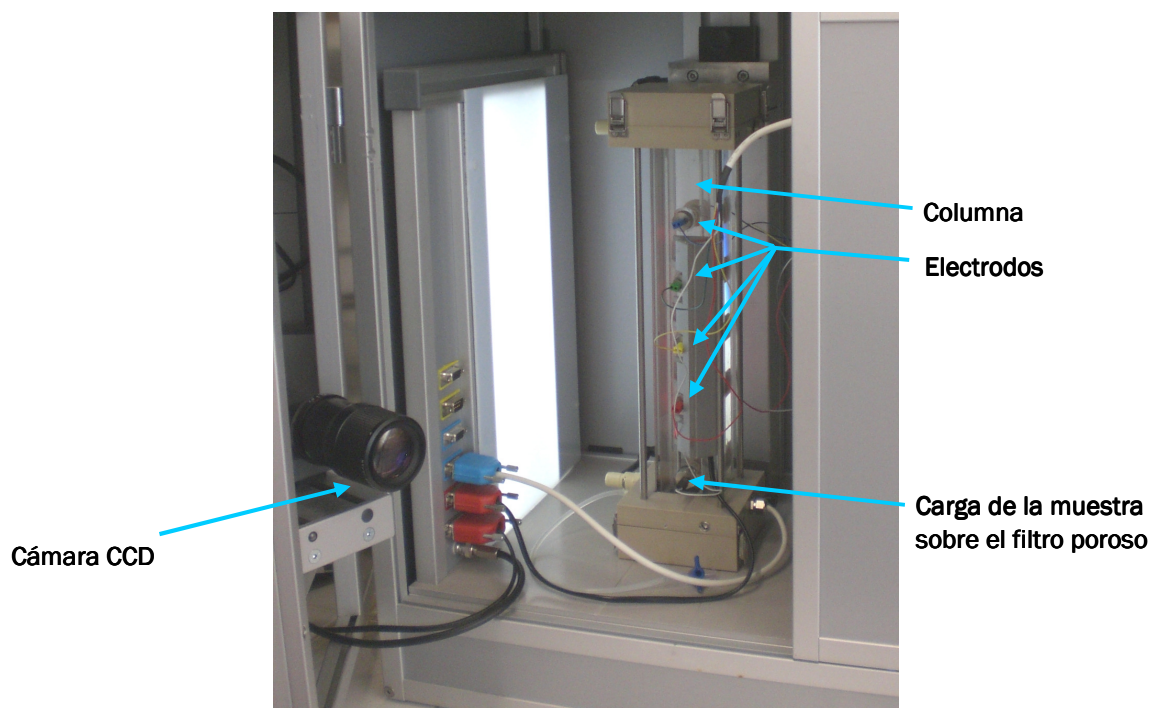
Las propiedades espumantes de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC (**Tabla M8**) se determinaron a pH 7 y 5, para lo cual, las muestras se disolvieron en tampón Trizma-HCl (0,05 M, pH 7,0) o tampón acético-acetato (0,05 M, pH 5,0) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), siendo  $5 \text{ mgmL}^{-1}$  la concentración final de proteína.

Tales propiedades se determinaron a través de mediciones conductimétricas y ópticas de la formación, estabilidad y ruptura de la espuma, usando un instrumento comercial (Foamsan IT Concept, Longessaigne, France) (**Figura M8**), basado en el trabajo de Popineau, Y. (Guillerme y col., 1993).



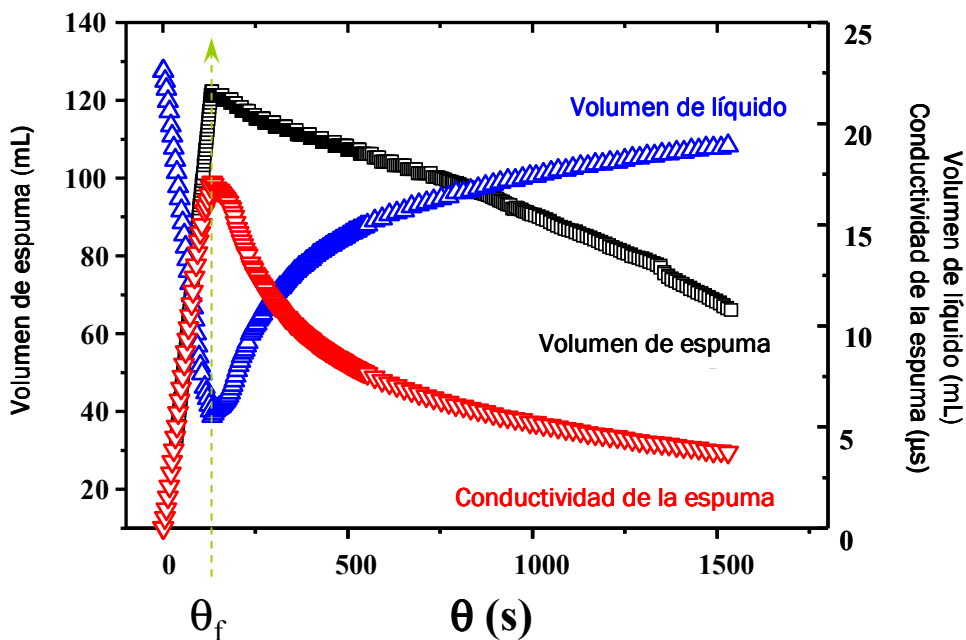
El método empleado para la generación de la espuma fue el de burbujeo de gas, el cual precisa de una baja concentración de proteína en comparación con otros métodos, tales como la agitación o el batido. Así, tras cargar 20 mL de la muestra a estudiar (5% proteína) en el fondo de la cubeta, la espuma se generó a 20 °C por burbujeo de nitrógeno, inyectado a un flujo de 45 mL·min<sup>-1</sup> a través de un filtro de vidrio poroso (diámetro de poro 0,2 μm) situado en el fondo de la cubeta.

Para todos los experimentos, el volumen de espuma, registrado por una cámara CCD, se prefijó en 120 mL, de modo que el burbujeo se detuviera una vez alcanzado este volumen y se comenzara a analizar la evolución de la espuma. El drenaje del líquido contenido en la espuma se monitorizó mediante las medidas de conductividad de cuatro pares de electrodos localizados a diferentes alturas de la columna de vidrio; la cantidad de líquido en la cubeta por el par de electrodos situados en la parte inferior de la columna y el volumen de líquido contenido en la espuma por los otros tres pares de electrodos localizados a lo largo de la columna.



**Figura M8.** Columna de espumas (Foamscan).

En la **Figura M9** se pueden observar los datos de volumen de líquido, volumen de espuma y conductividad durante la formación y ruptura de la espuma.



**Figura M9.** Evolución del volumen de líquido, volumen de espuma y conductividad de la espuma.  $\theta_f$  es el tiempo final de burbujeo.

### 3.7.2.1 Capacidad espumante

La capacidad espumante de las muestras se evaluó a través de 4 parámetros:

a. La *capacidad total espumante* (OFC,  $\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$ ), que resulta de la pendiente de la curva del volumen de espuma hasta el cese del burbujeo.

b. La *capacidad espumante* (FC), que es una medida del gas retenido en la espuma, determinado por la **Ecuación M14**.

$$FC = \frac{V_{\text{espuma}}(f)}{V_{\text{gas}}(f)} \quad \text{[M14]}$$

c. La *densidad máxima de la espuma* (MD), que es una medida del líquido retenido en la espuma, obtenida por la **Ecuación M15**.

$$MD = \frac{[V_{\text{liq}}(i) - V_{\text{liq}}(f)]}{V_{\text{espuma}}(f)} \quad \text{[M15]}$$

d. La *conductividad relativa de la espuma* ( $C_f$  %), que es una medida de la densidad de la espuma, calculada por la **Ecuación M16**.

$$C_f = \left[ \frac{C_{\text{espuma}}(f)}{C_{\text{liq}}(f)} \right] \times 100 \quad \text{[M16]}$$

### **3.7.2.2 Estabilidad de la espuma**

La estabilidad de la espuma se determinó a partir del volumen de líquido drenado a partir de la espuma durante el tiempo (Rodríguez-Patino y col. 1995 y 2008). Para ello, se calculó el tiempo de vida medio de la espuma ( $\theta_{1/2}$ ), es decir, el tiempo que tarda la espuma en drenar la mitad del líquido contenido en ella.

## **PARTE III: DIGESTIBILIDAD, INMUNORREACTIVIDAD Y FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DE LOS GLICOCONJUGADOS**

Tras el estudio de la funcionalidad tecnológica, los glicoconjugados obtenidos bajo las condiciones indicadas en la [Tabla M10](#) se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro* con el fin de determinar el efecto de la glicosilación sobre la digestibilidad de la  $\beta$ -Lg y del SC. Asimismo, los digeridos resultantes se emplearon para llevar a cabo una serie de ensayos ([Tabla M10](#)) con el fin de evaluar el efecto de las modificaciones producidas en la estructura de la  $\beta$ -Lg y del SC durante la glicosilación vía RM sobre su funcionalidad biológica. En este caso, los experimentos se realizaron con las muestras de proteína ( $\beta$ -Lg/SC) nativa, control calentada y glicada previamente sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro*, con el objetivo de simular lo más posible las condiciones fisiológicas.

### **3.8 DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO***

Con el objetivo de estudiar el efecto de las modificaciones estructurales inducidas por la glicosilación no enzimática sobre la digestibilidad de la  $\beta$ -Lg y del SC, se llevó a cabo una digestión gastrointestinal simulada *in vitro* de las muestras indicadas en la [Tabla M10](#), de acuerdo con el método descrito por Moreno y col. (2005b).

El modelo de digestión empleado se basó en los resultados *in vivo* a partir de los efluentes gástricos y duodenales obtenidos y analizados por la unidad de Nutrición Humana del *Institute of Food Research - BBSRC* (Norwich, UK) procedentes de voluntarios a los que se les había practicado una ileostomía. Es necesario indicar que la selección de las relaciones enzima:sustrato óptimas es muy complicada, ya que los humanos muestran una amplia variación en sus secreciones gástricas y pancreáticas, las cuales también pueden variar con el tipo de alimento consumido o con determinados desórdenes gastrointestinales (Moreno, 2007). Por tanto, aunque el modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* aquí empleado intenta acercarse lo más posible a las condiciones fisiológicas encontradas en humanos adultos, se trata de un modelo simplificado y estático y, por tanto, no puede imitar completamente lo que sucede en el intestino humano.

**Tabla M10.** Resumen de los estudios de funcionalidad biológica llevados a cabo con los glicoconjugados correspondientes.

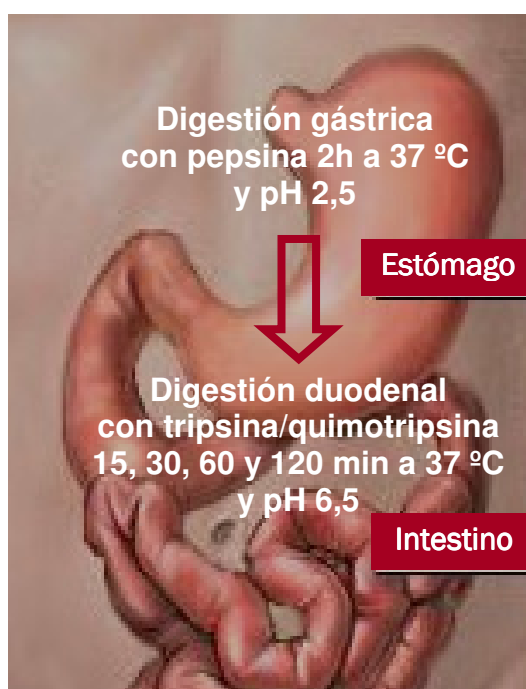
<b>GLICOCONJUGADOS **</b>								
<b>FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA *</b>	<b>SC:Gal</b>	<b>SC:Lac</b>	<b>β-Lg:Gal</b>	<b>β-Lg:Tag</b>	<b>β-Lg:Gal/Tag + PM</b>	<b>β-Lg:Lac</b>	<b>β-Lg:DX<sub>10</sub></b>	<b>β-Lg:DX<sub>20</sub></b>
<b>Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i></b>	4 h, 60 °C <sup>a</sup> 72 h, 50 °C <sup>b</sup>		24 h, 40 °C <sup>a</sup> 48 h, 50 °C <sup>b</sup>	24 h, 40 °C <sup>a</sup> 48 h, 50 °C <sup>b</sup>	48 h, 50 °C <sup>b</sup>		36 h, 60 °C <sup>a</sup>	60 h, 60 °C <sup>a</sup>
<b>Inmunoreactividad:</b>								
<b>Reactividad IgG</b>			24 h, 40 °C <sup>a</sup> 48 h, 50 °C <sup>b</sup>					
<b>Reactividad IgE</b>	4 h, 60 °C <sup>a</sup> 72 h, 50 °C <sup>b</sup>		24 h, 40 °C <sup>a</sup> 48 h, 50 °C <sup>b</sup>				36 h, 60 °C <sup>a</sup>	60 h, 60 °C <sup>a</sup>
<b>Ensayos de fermentación <i>in vitro</i>:</b>								
<b>Con cultivos puros</b>	4 h, 60 °C <sup>a</sup> 72 h, 50 °C <sup>b</sup>	8 h, 60 °C <sup>a</sup> 24 h, 60 °C <sup>b</sup>	24 h, 40 °C <sup>a</sup> 48 h, 50 °C <sup>b</sup>			8 h, 60 °C <sup>a</sup> 48 h, 60 °C <sup>b</sup>		
<b>Con cultivos mixtos</b>	4 h, 60 °C <sup>a</sup>		24 h, 40 °C <sup>a</sup>					
<b>Propiedades antiadherentes</b>	4 h, 60 °C <sup>a</sup> 72 h, 50 °C <sup>b</sup>	8 h, 60 °C <sup>a</sup> 24 h, 60 °C <sup>b</sup>	24 h, 40 °C <sup>a</sup> 48 h, 50 °C <sup>b</sup>			8 h, 60 °C <sup>a</sup> 48 h, 60 °C <sup>b</sup>		

\* Todas las determinaciones se llevaron a cabo, al menos, por duplicado; \*\* Glicoconjugados sometidos previamente a digestión gastrointestinal *in vitro*, excepto en el caso de los ensayos de reactividad IgG, que también se realizaron con los conjugados β-Lg:Gal/Tag con y sin PM sin digerir.

<sup>a</sup> Glicoconjugados en estados iniciales de la RM, con la máxima formación del compuesto de Amadori; <sup>b</sup> Glicoconjugados en estados avanzados de la RM, con un elevado grado de agregación.

En el **Esquema M1** se muestra un esquema general del modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* al que sometieron las muestras estudiadas. Como se puede observar, éste consistió en dos fases consecutivas, una gástrica y otra duodenal.

Para la **digestión gástrica**, las muestras (4 mg) se disolvieron en 1,33 mL de una disolución de simulación gástrica (NaCl 0,15 M a pH 2,5, SGF). El pH se ajustó a 2,5 con HCl 1 M. A continuación, se añadió una solución de pepsina de origen porcino (EC 3.4.23.1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 3,2% (p/v) en SGF (pH 2,5) (actividad 3.300 U/mg de proteína) a cada muestra en una proporción de enzima:sustrato 1:20 (p:p) y se incubó a 37°C durante 2 horas. En el caso de las muestras de SC, se tomaron también alícuotas a los 5, 15 min y 30 min de digestión, debido a la esperada baja resistencia del SC a la acción de la pepsina.

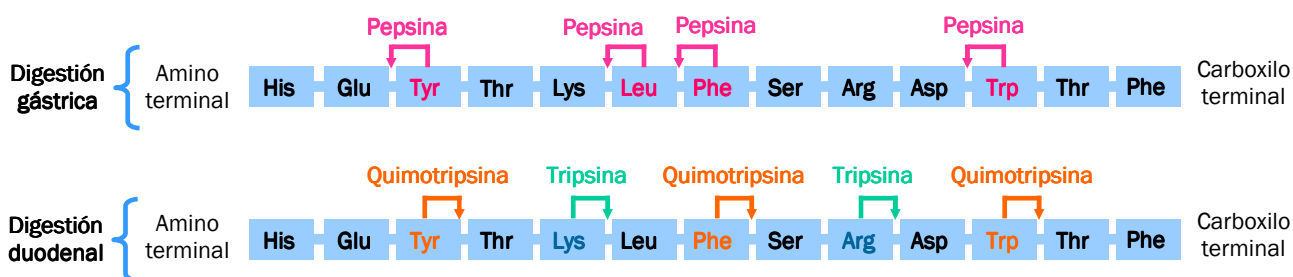


**Esquema M1.** Modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* empleado, consistente de dos fases consecutivas, una gástrica y otra duodenal.

Al cabo de las 2 horas se aumentó el pH a 7,5 con  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  40 mM (Panreac) para inactivar la pepsina y comenzar con la **digestión duodenal**. Para ello, el pH se ajustó a 6,5 con HCl 1 M y se simuló el ambiente duodenal mediante la adición de: (i) una mezcla de sales biliares constituida por taurocolato sódico y ácido glicodesoxicólico en cantidades

equimolares (0,125 M), (ii) CaCl<sub>2</sub> 1M (Panreac), y (iii) tampón Bis-Tris 0,25 M pH 6,5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Posteriormente, se prepararon disoluciones de tripsina porcina (0,05%, p/v) (EC 3.4.21.4, tipo IX-S, actividad 14.300 U·mg<sup>-1</sup> proteína; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y α-quimotripsina bovina (0,1%, p/v) (EC 3.4.21.1, tipo I-S, actividad 62 U·mg<sup>-1</sup> proteína; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en agua y se adicionaron en proporciones de proteína:tripsina:quimotripsina de 1:(1/400):(1/100) (p:p:p). Finalmente, las muestras se incubaron a 37°C, recogándose alícuotas a los 15, 30, 60 y 120 min para su posterior análisis por RP-LC-UV y SDS-PAGE. La tripsina y α-quimotripsina se inactivaron tras la incubación de las muestras en un baño de agua a 80°C durante 5 min.

En la [Figura M10](#) se indica la especificidad de corte de las enzimas que participan en la digestión gastrointestinal simulada llevada a cabo en este estudio.



**Figura M10.** Especificidad de corte de las enzimas que participan durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

## 3.8.2 Análisis de los digeridos derivados de la digestión gastrointestinal *in vitro*

### 3.8.2.1 Cromatografía líquida en fase inversa con detección ultravioleta (RP-LC-UV)

Para los análisis por RP-LC-UV, las muestras digeridas se diluyeron en el eluyente A, a una concentración final de 0,85 mg/mL, y 50 µL se inyectaron en una columna Phenomenex Jupiter Proteo (90 Å de tamaño de poro, diámetro interno 250 mm x 4,6 mm y 4 µm de tamaño de partícula).

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: flujo 1 mL/min; fase móvil: eluyente A, 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA, Merck, Darmstadt, Alemania) en agua

bidestilada (v/v), eluyente B, 0,1% TFA en agua bidestilada : acetonitrilo de grado HPLC (Scharlau Chemie, Barcelona, España) (1:9, v:v). La detección se realizó a 214 nm en un detector Beckman 166UV (Beckman Instruments) y la elución se realizó según el programa mostrado en la **Tabla M11**.

**Tabla M11.** Gradiente lineal empleado en la separación de los glicoconjugados digeridos *in vitro* por RP-LC-UV (Moreno y col., 2004).

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	99	1
5	50	50
60	0	100
61	0	100
71	99	1
85	99	1

### **3.8.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)**

Las muestras tomadas en diferentes estados de la digestión fueron analizadas por SDS-PAGE por el mismo procedimiento que las muestras sin digerir, explicado previamente en el apartado 3.4.3.

### **3.8.2.3 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)**

Con el fin de conocer el peso molecular ( $P_m$ ) aproximado de los péptidos derivados de la digestión de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC, los hidrolizados se analizaron por SEC, bajo condiciones no desnaturizantes, en un equipo de FPLC ÄKTA explorer 100 y usando una columna Superdex Peptide HR 10/30 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). 500  $\mu$ L de muestra (1 mg·mL<sup>-1</sup>) se inyectaron en la columna a temperatura ambiente. La fase móvil empleada fue tampón fosfato sódico 0,05 M y pH 7, conteniendo NaCl 0,15 M. La elución se llevó a cabo en modo isocrático a 0,5 mL·min<sup>-1</sup> durante 50 min y la detección de las proteínas eluidas se realizó a 280, 214 y 254 nm.

Para la estimación del  $P_m$  de los péptidos obtenidos se hizo una curva de calibrado con una serie de proteínas estándar de distinto  $P_m$ . Éstas fueron las siguientes: la lisozima (14,4



kDa), la aprotinina (6,5 kDa), la insulina cadena B (3,5 kDa), la insulina cadena A (2,5 kDa) y el triptófano (204 Da).

### **3.8.2.4 Caracterización del perfil peptídico por LC-ESI-MS<sup>n</sup>**

#### ***3.8.2.4.1 Glicación del tetrapéptido sintético acetil-SDKP con galactosa y tagatosa***

Alícuotas de una disolución de acetil-SDKP (0,5 mg·mL<sup>-1</sup>) y Gal o Tag (0,5 mg·mL<sup>-1</sup>) en acetato amónico 10 mM (Panreac, Barcelona, España), pH 6,8, se congelaron a -20 °C y, posteriormente, se liofilizaron. A continuación, los productos en polvo péptido-carbohidrato resultantes se incubaron a 40 °C durante 24 horas en un desecador a vacío con una  $a_w$  de 0,44, obtenida mediante el equilibrado del desecador durante una semana con una disolución saturada de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania).

#### ***3.8.2.4.2 Análisis por LC-ESI-MS<sup>n</sup>***

Los análisis de LC-ESI-MS se llevaron a cabo usando un cromatógrafo de líquidos Finnigan Surveyor con un sistema de bombas de tipo cuaternario, acoplado a una trampa iónica Finnigan LCQ Deca usando electronebulización (ESI) como fuente de ionización. El volumen de inyección fue 10 µL y se empleó un inyector automático Finnigan Surveyor. Todos los equipos fueron Thermo Fisher Scientific (San José, CA, USA) y la adquisición de datos se realizó usando el paquete informático Xcalibur (versión 1.2, Thermo Fisher Scientific).

##### *➤ Condiciones de la separación por RP-LC-UV*

Las mezclas de digestión tanto de la β-Lg glicada como sin glicar (1,7 mg·mL<sup>-1</sup>) se diluyeron a la mitad en agua bidestilada (Milli-Q water, Millipore, Bedford, USA) y se analizaron a 25 °C en una columna Hypersil Hypurity C<sub>18</sub> (100 mm x 2,1 mm, 3 µm tamaño de partícula, 180 Å tamaño de poro, Thermo Fisher Scientific) a un flujo de 100 µL·min<sup>-1</sup>.

El método de elución empleado se adaptó de Moreno y col. (2001), cambiando el ácido trifluoroacético (TFA), usado como modificador, por ácido fórmico con el fin de evitar la supresión iónica causada por el TFA, cuando se trabaja con un espectrómetro de masas.

Así, la separación cromatográfica se llevó a cabo mediante un gradiente binario constituido por 0,1% (v/v) de ácido fórmico (de grado analítico, Merck) en agua desionizada (solvente A) y 0,1% de ácido fórmico (v/v) en acetonitrilo (de grado LC-MS Chromasolv®, Riedel-de Haën, Seelz, Alemania) (solvente B). En la **Tabla M12** se muestra el programa de elución empleado.

**Tabla M12.** Gradiente lineal empleado en la separación de las mezclas de digestión tanto de la  $\beta$ -Lg glicada como sin glicar por LC-ESI-MS<sup>n</sup>.

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	60	40
25	35	65
26	0	100
36	60	40
50	60	40

➤ *Condiciones del espectrómetro de masas*

El voltaje del nebulizador de la fuente de ionización se ajustó a 4,5 kV y la temperatura del capilar a 200 °C, usando nitrógeno (99,5% de pureza) como gas de nebulización (0,6 Lmin<sup>-1</sup>) y de secado (6 Lmin<sup>-1</sup>) y helio (99,999% de pureza) como gas de colisión.

Los espectros de masas se registraron en modo positivo entre 450 y 2000  $m/z$ . Los datos de MS<sup>2</sup> se obtuvieron en modo automático con una energía normalizada de colisión del 35%, usando un tiempo total de ciclo de aproximadamente 5 s y un umbral de selección iónica de  $5 \times 10^5$  cuentas. Por otro lado, los espectros de MS<sup>3</sup> y MS<sup>4</sup> se obtuvieron con la energía de colisión antes mencionada, pero seleccionando los iones de transición apropiados.

El control automático de ganancias se utilizó para mantener la población de iones dentro del analizador de trampa iónica a  $5 \times 10^7$  y  $2 \times 10^7$  para registro total de iones en los espectros de MS y MS<sup>n</sup>, respectivamente.

➤ *Tratamiento de datos*

El procesamiento de datos se llevó a cabo usando el programa informático Xcalibur (versión 2.0, Thermo Fisher Scientific).

La asignación inicial de los iones correspondientes a la secuencia peptídica de la  $\beta$ -Lg se llevó a cabo empleando la base de datos Swiss - Prot y TrEMBL, además de las herramientas Peptide Mass y FindPept disponibles en [www.expasy.org](http://www.expasy.org). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: i) la masa monoisotópica del péptido fue indicada como  $[M+H]^+$  con cisteínas no tratadas con ningún agente reductor; ii) se usó tripsina/quimotripsina como sistema enzimático usado para la hidrólisis; iii) se permitió hasta la pérdida de cuatro rupturas; iv) se buscaron los péptidos con masas mayores de 350 u; v) la tolerancia de masas fue de 0,5 u.

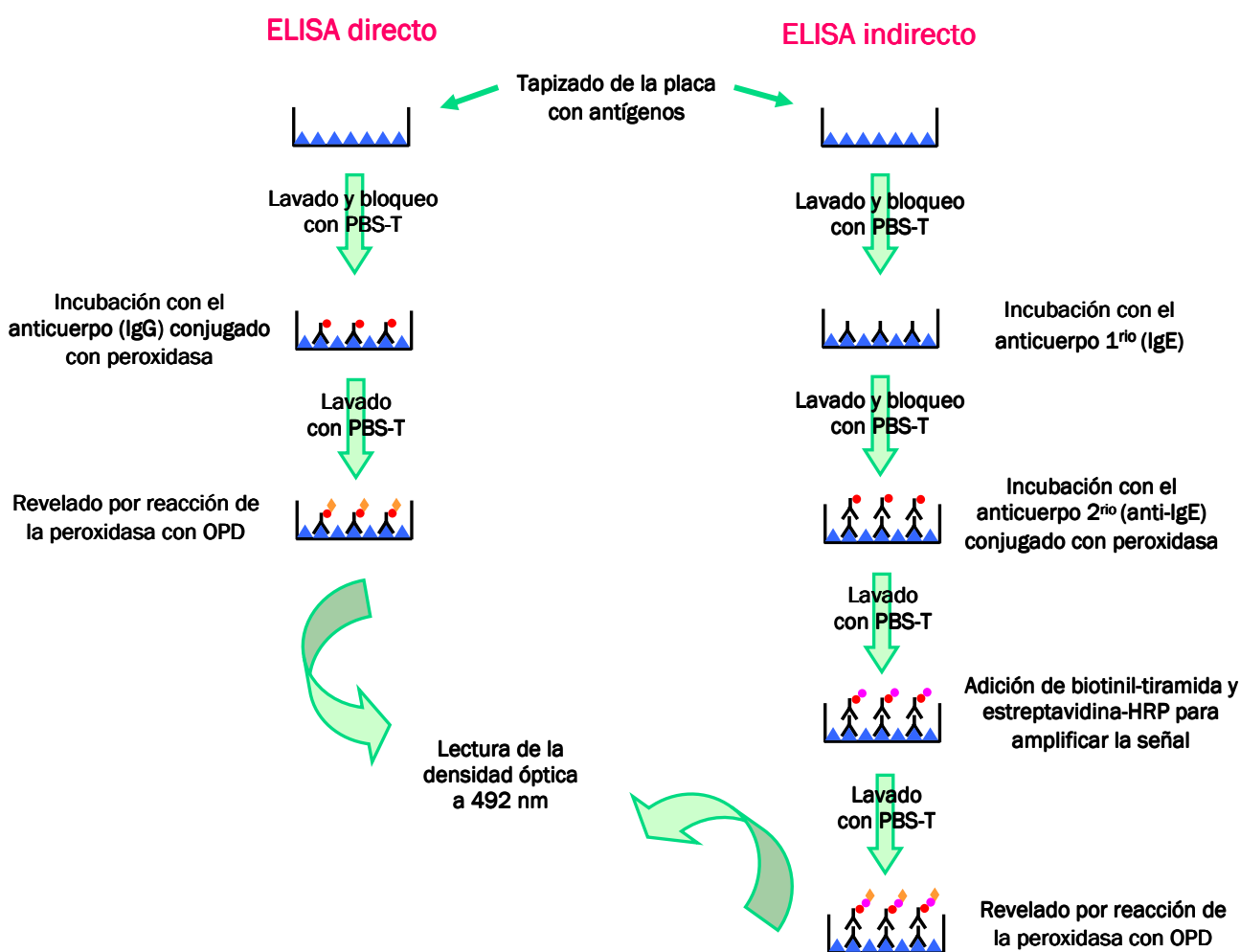
Para confirmar la secuencia de los glicopéptidos, los espectros  $MS^3$  y  $MS^4$  se compararon, manualmente, con la fragmentación teórica del péptido putativo, obtenida a partir del programa informático MS - Product (Protein Prospector, <http://prospector.ucsf.edu/>).

### **3.9 ENSAYOS DE INMUNORREACTIVIDAD: ELISA DIRECTO E INDIRECTO**

Las propiedades alergénicas de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC, obtenidos bajo las condiciones indicadas en la [Tabla M10](#), se evaluaron tanto en los glicoconjugados intactos como en los sometidos a una digestión gastrointestinal *in vitro*. Para ello, se realizaron análisis por ELISA directo e indirecto ([Esquema M2](#)), empleando anticuerpos IgG de conejo e IgE humanos (sueros de niños alérgicos a las proteínas de leche bovina), respectivamente.

La **reactividad IgG** se evaluó de acuerdo al método de ELISA directo optimizado por Chicón y col. (2008) ([Esquema M2](#)), usando anticuerpos comerciales como se describe a continuación. Como soporte se emplearon placas de 96 pocillos de poliestireno de alta capacidad de unión (Corning, Cambridge, MA, USA). Para la fijación de las muestras en la placa se adicionaron 50  $\mu$ L por pocillo de las muestras proteolizadas y sin proteolizar a una concentración de 2,5  $\mu$ g/mL preparadas en PBS (Merck, Darmstadt, Alemania) 10 mM, pH 7,4. La placa se incubó durante toda la noche a una temperatura de 6 °C y, posteriormente, se procedió a su lavado (3 veces) con una disolución de PBS (pH 7,2) con Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 0,05% (PBS-T) empleando un lavador automático de placas (Nunc-Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA). Para evitar uniones inespecíficas los pocillos se bloquearon con una disolución de PBS con Tween al 2,5% durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, la placa se lavó 3 veces y se adicionaron 50  $\mu$ L por pocillo del anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa (Rabbit anti-bovine  $\beta$ -Lg- HRP; Bethyl

Laboratories, Montgomery, TX, USA) en una dilución 1:20000 en PBS. El anticuerpo se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la placa se lavó 3 veces y se reveló añadiendo 50  $\mu$ L por pocillo de una disolución de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD; Dako, Glostrup, Dinamarca) con  $H_2O_2$ , siguiendo las instrucciones del fabricante. La placa se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y la reacción se detuvo tras adicionar 50  $\mu$ L por pocillo de una disolución de  $H_2SO_4$  0,5 M. La densidad óptica se leyó a 492 nm ( $D.O_{492}$ ) usando un lector de placas automatizado Multiskan Ascent (LabSystems, Helsinki, Finlandia).



**Esquema M2.** Esquema de los métodos de ELISA directo e indirecto.

La **reactividad IgE** se evaluó por ELISA indirecto usando tres sueros humanos diferentes, de acuerdo al método optimizado por Chicón y col. (2008) (**Esquema M2**). Las

muestras individuales de suero, procedentes de niños alérgicos, fueron proporcionadas por el Hospital Gregorio Marañón (Madrid, España). Todos los pacientes mostraron anticuerpos IgE específicos hacia proteínas lácteas, particularmente  $\beta$ -Lg, determinados por el sistema FEIA-CAP (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suecia). Los ensayos se llevaron a cabo de forma muy similar a los de inmunorreactividad frente a anticuerpos IgG con ligeras modificaciones. La fijación de las muestras a la placa se llevó a cabo como se ha descrito con anterioridad. Tras el paso de bloqueo, la placa se incubó durante toda la noche a 6 °C con 50  $\mu$ L/pocillo de suero humano diluido en PBS-T como sigue: el suero 1 a una dilución 1:1000; y los sueros 2 y 3 a una dilución 1:100. Tras el lavado de la placa 3 veces con PBS-T y el bloqueo de los sitios de unión libres como se ha explicado arriba, se añadieron 50  $\mu$ L por pocillo del anticuerpo secundario policlonal anti-IgE humano conjugado con peroxidasa (HRP-conjugated rabbit anti-human IgE; DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:1000 en PBS-T y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Antes de la adición del enzima sustrato, se empleó un sistema de amplificación de la señal, basado en la adición de biotinil-tiramida y estreptavidina-HRP, (ELAST ELISA amplification system, PerkinElmer Life Sciences, Walham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el revelado y la medida de densidad óptica a 492 nm ( $D_{0492}$ ) se llevó a cabo como se ha indicado anteriormente.

El blanco consistió en una disolución de PBS sin proteína y, en el caso de las muestras digeridas, también se hizo un blanco con el medio de reacción de la digestión (SGF, pepsina, mezcla de sales biliares,  $\text{CaCl}_2$  1 M, tampón Bis-Tris 0,25 M pH 6,5, tripsina y quimotripsina) diluido igual que las muestras en PBS.

Cada muestra se analizó por duplicado en la misma placa y cada placa se realizó por duplicado. El **análisis estadístico** para determinar las diferencias significativas entre la inmunorreactividad de las diferentes muestras estudiadas se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y el test DMS empleando el programa SPSS para Windows versión 12.7 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P < 0,05$ .

### **3.10 ESTUDIOS DE FERMENTACIÓN *IN VITRO***

Con el objetivo de evaluar el potencial prebiótico de los glicoconjugados, se realizaron una serie de ensayos *in vitro*, los cuales consistieron en hacer crecer bacterias de la

microbiota intestinal, tanto en forma de cultivo de cultivos puros como mixtos procedentes de heces humanas, con los glicoconjugados digeridos en condiciones fisiológicas.

### **3.10.1 Crecimiento de microorganismos en forma de cultivos puros**

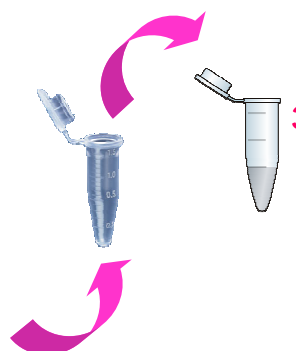
Para estudiar el potencial efecto beneficioso de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC (ver [Tabla M10](#)) sobre la microbiota intestinal se comenzó con un estudio acerca del efecto de dichos glicoconjugados, sometidos a digestión gastrointestinal simulada, sobre el crecimiento de 9 cepas de bacterias lácticas y 2 cepas de bifidobacterias en forma de cultivos puros, tal y como se detalla en el [Esquema M3](#).

#### **3.10.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo empleados**

Las cepas *Streptococcus salivarius* ZL50-7, *Lactobacillus reuteri* R13, *Lactobacillus plantarum* CIC17, *Lactobacillus delbrueckii* ZL96-27, *Lactobacillus brevis* CLC23, *Lactobacillus gasseri* Lc9 y *Bifidobacterium breve* 26M2 pertenecían a la colección de cultivos bacterianos del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Complutense de Madrid. Las cepas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium lactis* BB12 y *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* LC-01 se purificaron previamente a partir de un producto simbiótico comercial (bebida simbiótica; Priégola, Madrid, España) en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos del Instituto del Frío (CSIC, Madrid, España). Por último, *Lactobacillus plantarum* IFPL722, aislado a partir de queso, procedía de la colección de cultivos bacterianos del Instituto del Frío (CSIC). Todos los cultivos se mantuvieron a -80 °C en medio MRS (Pronadisa, Madrid, España) o en medio M17 (Pronadisa), en el caso de *S. salivarius* ZL50 y *S. thermophilus*, ambos suplementados con glicerol (40% v/v) y se subcultivaron en medios MRS o M17 antes de su utilización en los ensayos de fermentación.

**1. Crecimiento de los cultivos toda la noche a 37 °C**

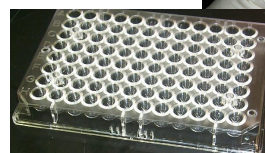
Cepas	Caldo de cultivo	Condiciones aeróbicas
<i>S. salivarius</i> ZL50-7	E.S.T.Y	Aeróbico
<i>S. thermophilus</i>	E.S.T.Y	Aeróbico
<i>L. reuteri</i> R13	MRS	Aeróbico
<i>L. plantarum</i> CIC17	MRS	Aeróbico
<i>L. plantarum</i> IFPL722	MRS	Aeróbico
<i>L. delbrueckii</i> ZL95-27	MRS	Aeróbico
<i>L. brevis</i> CLC23	MRS	Aeróbico
<i>L. casei</i> LC-01	MRS	Aeróbico
<i>L. gasseri</i> Lc9	MRS	Anaeróbico
<i>L. acidophilus</i> LA-5	MRS	Anaeróbico
<i>B. breve</i> 26M2	MRS	Anaeróbico
<i>B. lactis</i> BB12	MRS	Anaeróbico



**2. Dilución 1:10 de los cultivos crecidos** en caldo MRS o E.S.T.Y sin fuente de carbono

**3. Inoculación** de las muestras (al 0,3% carbohidrato) **con un 1% del inóculo diluido**

300  $\mu$ L/pocillo



**4. Incubación a 37 °C durante 24 h**, por triplicado, en aerobiosis o anaerobiosis

Cepas aeróbicas: DO<sub>600</sub> registrada a intervalos de 20-60 min

Cepas anaeróbicas: DO<sub>600</sub> registrada a t=0 y 24 h

**5. Medida de la D.O a 600 nm**



**6. Determinación de la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) y tiempo de fase de latencia (lag)**

**Esquema M3.** Esquema del método empleado para la determinación del crecimiento microbiano con los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC digeridos como fuente de carbono.

Los medios básicos empleados para los estudios de fermentabilidad de los glicoconjugados digeridos fueron caldo MRS de fermentación, sin glucosa ni extracto de carne (de Man y col., 1960), enriquecido con Tween 80 (0,2%), 0,8% de hidrolizado de caseína ácida y 0,05% de cisteína, o en medio E.S.T.Y (Pronadisa), sin fuente de carbono. Estos medios se suplementaron con los conjugados  $\beta$ -lg/SC:Gal/Lac (Tabla M10) digeridos, a una concentración final correspondiente al 0,3% (w/v) de carbohidrato. Como controles de crecimiento se utilizaron glucosa, tagatosa, lactulosa, galactosa y lactosa, al 0,3%, así como los hidrolizados derivados la proteína ( $\beta$ -lg/SC) nativa y control calentada, a la misma concentración final que los glicoconjugados correspondientes. Cada sustrato se pesó en un tubo estéril al que se le añadió el medio de cultivo básico correspondiente, previamente esterilizado en autoclave. Posteriormente, las mezclas se esterilizaron por filtración a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m.

### **3.10.1.2 Ensayos de fermentación *in vitro***

Las cepas bacterianas se cultivaron durante toda la noche al 1% en medio MRS o M17 y los cultivos crecidos se diluyeron 10 veces en caldo MRS de fermentación o en medio E.S.T.Y, ambos sin fuente de carbono. Tales diluciones se emplearon como inóculo para evaluar el crecimiento de las cepas bacterianas sobre los digeridos galactosilados y lactosilados y sobre los controles, como única fuente de carbono. Para ello, las distintas soluciones de medio básico más digerido glicado o control se inocularon con un 1% del inóculo diluido de cada cepa. A continuación, 300 µl/pocillo se alicuotaron por triplicado en placas de 96 pocillos estériles con tapa (Sarstedt Inc., Newton, USA). Todas las cepas se incubaron durante 24 h a 37 °C en condiciones aeróbicas, excepto las cepas *L. acidophilus* LA-5, *L. gasseri* Lc9, *B. breve* 26M2 y *B. lactis* BB12, las cuales se incubaron en condiciones anaeróbicas (Gas-Pack, Anaerogen; Oxoid Ltd., Hampshire, England). Las densidades ópticas (O.D) de las cepas aeróbicas se midieron en intervalos de tiempo comprendidos entre 20 y 60 min usando un lector automático de microplacas (Varioskan Flash, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) a 600 nm. Las velocidades máximas de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y el tiempo de latencia (lag) se calcularon ajustando las curvas de crecimiento a un modelo sigmoidal usando el Microsoft Excel add-in DMfit v. 2.1 (Baranyi y Roberts, 1994) (disponible en <http://www.ifr.ac.uk/safety/DMfit/default.html>). En el caso de las cepas anaeróbicas, las OD<sub>600</sub> se midieron a las 0 y 24 horas.

## **3.10.2 Crecimiento en forma de cultivos mixtos procedentes de muestras fecales**

### **3.10.2.1 Ensayos de fermentación *in vitro* a pequeña escala**

Los ensayos de fermentación se llevaron a cabo utilizando muestras fecales de 3 voluntarios adultos sanos, sin ningún desorden de tipo gastrointestinal y que no habían tomado prebióticos, probióticos ni antibióticos durante al menos los 3 meses anteriores al estudio.

Los digeridos derivados de la digestión gastrointestinal *in vitro* de los conjugados  $\beta$ -lg/SC:Gal (indicados en la [Tabla M10](#)) se disolvieron en un medio de cultivo basal, previamente esterilizado en autoclave, hasta una concentración final correspondiente al 1% (p/v) de carbohidrato. El medio de cultivo basal empleado contenía, por litro, 2 g de agua de



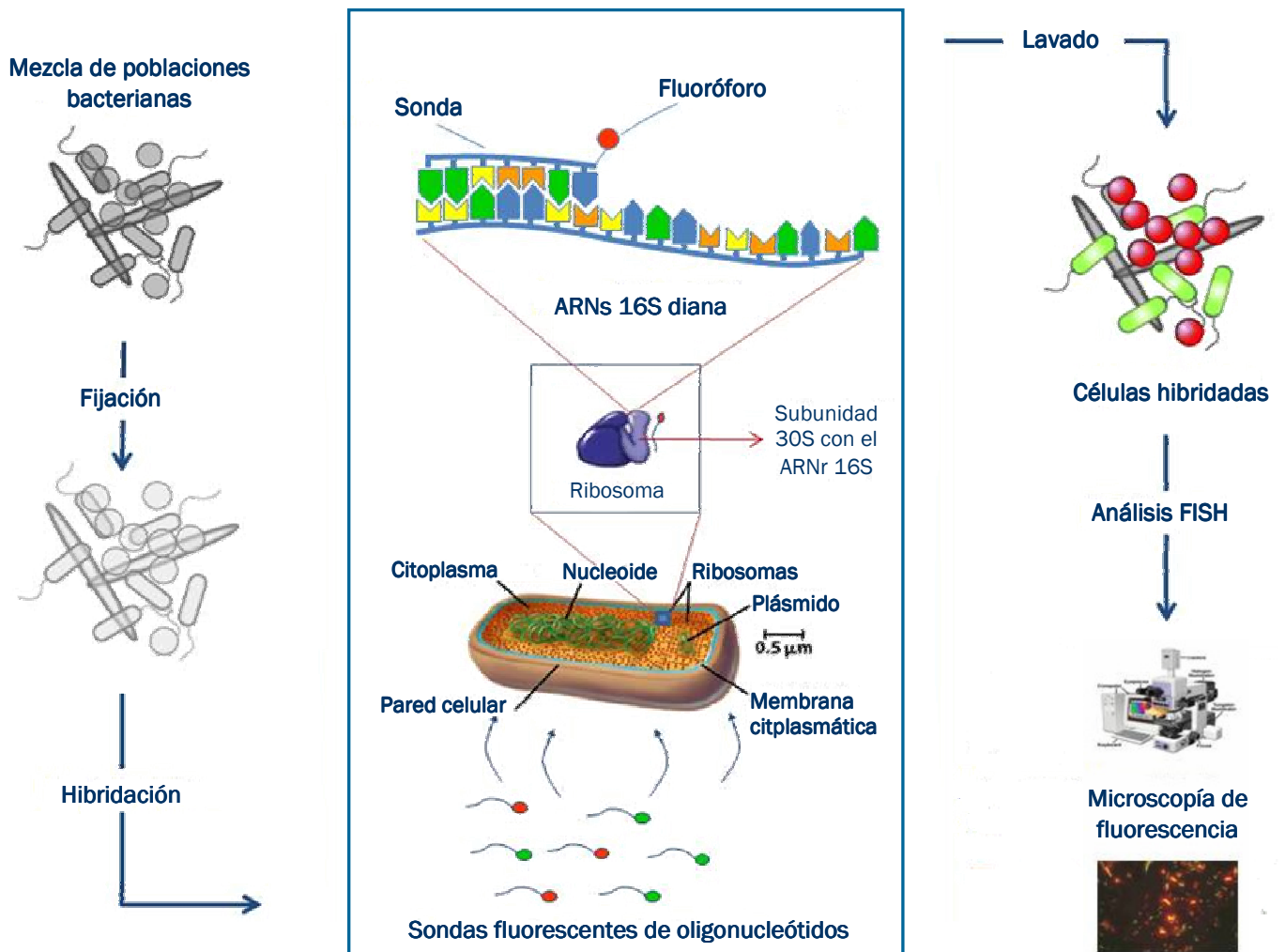
peptona (Oxoid), 2 g de extracto de levadura (Oxoid), 0,01 g de NaCl (BDH), 0,04 g de  $K_2HPO_4$  (BDH), 0,01 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (BDH), 0,01 g de  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  (BDH), 2 g de  $NaHCO_3$  (BDH), 0,005 g de hemina (Sigma, Dorset, UK), 0,5 g de L-cisteína-HCl, 0,5 g de sales biliares (Oxoid), 2 mL de Tween 80 (BDH), 10  $\mu$ L de vitamina K (Sigma, Dorset, UK) y 4 mL de disolución de resazurina al 0,025% (p/v) (Sigma, Dorset, UK). Posteriormente, las muestras, ya disueltas en este medio, se inocularon con 100  $\mu$ L de un homogeneizado de heces, preparado por homogeneización de las heces humanas frescas (10% p/v) en PBS ( $NaCl$  8  $g \cdot L^{-1}$ ,  $KCl$  0,2  $g \cdot L^{-1}$ ,  $Na_2HPO_4$  1,15  $g \cdot L^{-1}$  y  $KH_2HPO_4$  0,2  $g \cdot L^{-1}$ ), pH 7,3 (Oxoid), con un homogeneizador manual (Fisher, Loughborough, U.K.) en una cabina anaeróbica (conteniendo 10%  $H_2$ , 10%  $CO_2$  y 80%  $N_2$ ). Cada experimento de fermentación se realizó por triplicado. Además, una muestra se preparó sin adición de carbohidrato y actuó como control. Todas las adiciones, inoculaciones e incubaciones se hicieron bajo condiciones anaeróbicas gracias a un suministro continuo de nitrógeno libre de oxígeno. La temperatura se mantuvo a un valor constante de 37 °C. Se hicieron diferentes tomas de muestra (100  $\mu$ L) a las 0 y 10 horas de fermentación, realizándose la cuantificación bacteriana por fluorescencia con hibridación *in situ* (FISH) y la determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) al tiempo óptimo de incubación.

### **3.10.2.2 Cuantificación de las poblaciones bacterianas mediante hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH)**

El fundamento de la técnica de hibridación con fluorescencia *in situ*, empleada para cuantificar las poblaciones bacterianas, se muestra en el [Esquema M4](#).

La hibridación de las muestras se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Rycroft y col. (2001), usando sondas de oligonucleótidos (dirigidas al ARNr 16S específico de género) apropiadas para cada género de bacterias. Dichas sondas comerciales se marcaron con el colorante fluorescente cianina 3 (Cy3;  $\lambda$  excitación 514 nm;  $\lambda$  emisión 566 nm; color fluorescente, rojo-anaranjado. (Sigma Genosys, UK). Los grupos bacterianos estudiados fueron seleccionados por representar las poblaciones que predominan en el colon humano. Por tanto, las sondas utilizadas, previamente validadas por otros autores fueron Lab158 (Harmsen y col., 1999) específico para *Lactobacillus/Enterococcus*; Bif164 (Langendijk y col., 1995) específico para *Bifidobacterium spp.*; Bac303 (Manz y col., 1996) específico para *Bacteroides/Prevotella* group; His150 (Franks y col., 1998) específico para *Clostridium* clusters I and II (incluyendo *Clostridium perfringens* / *Clostridium histolyticum*); Ato291 específico para *Atopobium (Coriobacterium* group) (Harmsen y col., 2000) y Erec482

específico para *Eubacterium* (*Clostridium coccooides*/*Eubacterium rectale*) (Franks y col., 1998). Para el recuento de las bacterias totales se utilizó el ácido nucleico teñido 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma).



**Esquema M4.** Esquema del principio de la hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH).

Para llevar a cabo el recuento de las distintas poblaciones bacterianas por FISH, en primer lugar, hay que fijar las células, para ello, 100 µL de muestra se incubaron durante toda la noche a 4°C con paraformaldehído filtrado al 4% (p/v), pH 7,2, en una relación 1:3 (v/v). Tras la fijación, las células se centrifugaron a 8973 g durante 5 min, se lavaron dos veces con PBS (0,1 M, pH 7,0), se resuspendieron en 200 µL de una mezcla de PBS / 99% etanol (1:1, v/v) y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Las suspensiones de células se

diluyeron en PBS/SDS y 20  $\mu$ L de las diluciones se añadieron a un portaobjetos de Teflón/ poli-L-lisina con una capacidad para 6 muestras (Tekdon Inc. USA). Las muestras se fijaron en dicho porta por medio de calor (46-50°C) durante 15 min y, posteriormente, se deshidrataron en alcohol (50, 80, 96% etanol; 3 min cada uno). Este proceso permite la rotura de la membrana celular para que la sonda fluorescente penetre en la célula y marque de manera específica las bacterias. Una vez rota la membrana celular, se añadieron 50  $\mu$ L de la mezcla de hibridación (45  $\mu$ L de tampón de hibridación y 5  $\mu$ L de sonda por cada muestra) a cada una de las muestras en el porta. El tampón de hibridación, en todos los casos, estaba constituido por, 180  $\mu$ L de NaCl 5 M, 20  $\mu$ L de tampón Tris/HCl (pH 8) 1 M, 779  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 1  $\mu$ L de SDS al 10% para 1 mL de solución final.

La hibridación se llevó a cabo durante 4 h en un incubador de microarrays (Grant-Boeckel, Cambridge, UK) a la temperatura adecuada en función de la sonda empleada. Para el recuento de bacterias totales con DAPI, las muestras se dejaron hibridar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la hibridación, cada uno de los portamuestras se lavó sumergiéndolo en 50 mL de un tampón de lavado constituido por 9 mL de NaCl 5 M, 1 mL de tampón Tris/ HCl (pH 8) 1M y 40 mL de H<sub>2</sub>O durante 15 min a la misma temperatura que la usada en la hibridación. Transcurrido este tiempo, se sumergieron durante 3 min en agua fría para evitar cristalización, secándose finalmente con aire comprimido. Después, 5  $\mu$ L de ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen Ltd., Paisley, UK) se añadieron a cada muestra y se cubrieron con un cubreobjetos (20 mm) (VWR, Lutterworth, UK). El porta se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h y se examinó en un microscopio equipado con una lámpara fluorescente (Nikon Eclipse, E400). Las células teñidas con DAPI se examinaron bajo luz ultravioleta y las células hibridadas se visualizaron utilizando un filtro DM<sub>510</sub>. Para la enumeración de las bacterias se eligieron aleatoriamente al menos un mínimo de 15 zonas para cada filtro.

### **3.10.2.3 Determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) y ácido láctico**

Dado que durante el proceso fermentativo se originan diversos ácidos orgánicos procedentes del metabolismo bacteriano, en los ensayos de fermentación *in vitro* realizados con muestras fecales humanas fue preciso también determinar dichos ácidos como medida de la actividad metabólica de las bacterias, tras su incubación con los glicoconjugados digeridos. Para ello, las muestras se centrifugaron a 13000 g durante 5 min para eliminar las bacterias y la materia particulada. El sobrenadante (20  $\mu$ L) se inyectó en un sistema de LC (Hewlett-Packard HP1050 series) equipado con un detector UV y un inyector automático.

Para el análisis se empleó una columna de exclusión iónica Aminex HPX - 87H (7,8 x 300 mm, Bio-Rad) y ácido sulfúrico (0,005 M) en agua de grado HPLC, previamente desgasificado con helio, como eluyente a un flujo de 0,6 mL·min<sup>-1</sup>. La columna se termostató a 50 °C. La detección se llevó a cabo a 210 nm y los datos se adquirieron usando el programa LC3D ChemStation (Agilent Technologies). La calibración se realizó por el método del patrón externo utilizándose como patrones los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico en concentraciones entre 0,5 y 100 mM.

El **análisis estadístico** para determinar las diferencias significativas entre los resultados obtenidos para el crecimiento de poblaciones bacterianas y el contenido en SCFAs con cada una de las muestras estudiadas se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y el test DMS usando el programa SPSS para Windows versión 12.7 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P < 0,05$ .

### **3.11 DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIADHERENTE**

Otra de las actividades biológicas investigadas en los glicoconjugados digeridos fue la capacidad antiadherente, con el fin de estudiar el posible papel de dichos glicoconjugados como agentes inhibidores de la adhesión intestinal de bacterias potencialmente patógenas implicadas en la colonización de la mucosa intestinal y en el desarrollo de posibles infecciones gastrointestinales.

#### **3.11.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo empleados**

En este estudio se han utilizado distintas cepas de *Escherichia coli* (IATA-CBL2, -CBL8 and CBM1), previamente aisladas en el Departamento de Ciencia de los Alimentos (Laboratorio de Ecofisiología Microbiana y Nutrición) del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) a partir de las heces de pacientes sanos, siguiendo el protocolo descrito por Sánchez y col. (2008). Las distintas cepas bacterianas se incubaron en caldo y agar Cerebro-Corazón (Scharlau Chemie, S, Barcelona, España) a 37 °C, bajo condiciones aeróbicas.

### 3.11.2 Ensayos de adhesión a mucina

La mucina cruda (Tipo II, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se diluyó en PBS (Merck, Darmstadt, Alemania), pH 7,2, hasta una concentración de 0,5 mg·mL<sup>-1</sup>. A continuación, 0,1 mL/pocillo de esta disolución se alicuotaron en placas de policarbonato de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA) y la placa se incubó a 4 °C durante 24 horas. Tras la incubación, los pocillos se lavaron 2 veces con 0,1 mL de PBS para eliminar los restos de mucina no unida.

La evaluación de las propiedades de adhesión de las cepas de *E. coli* estudiadas se llevó a cabo mediante el método fluorimétrico descrito por Izquierdo y col. (2008). Las bacterias, obtenidas a partir de los cultivos incubados durante 20 horas, se separaron por centrifugación (4.000 g, 5 min a 4 °C). El precipitado se lavó dos veces y se resuspendió en PBS hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 ( $A_{\lambda 600}$ ). Las suspensiones de las diferentes cepas bacterianas ( $6,0 \times 10^7$  -  $8,2 \times 10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup>) se incubaron con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (C4916, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 75 μM, a 37 °C durante 30 min. A continuación, se lavaron dos veces, se resuspendieron en PBS y se dividieron en cuatro grupos: i) un control sin muestra; y tres mezclados con i) los digeridos de β-Lg y SC nativos; ii) los digeridos de β-Lg y SC calentados en ausencia de carbohidrato; y iii) los digeridos de β-Lg y SC glicosados con Gal/Lac (indicados en la [Tabla M10](#)), hasta una concentración final de 300 μg·mL<sup>-1</sup>. 0,1 mL/pocillo de estas suspensiones celulares se alicuotaron en las placas de 96 pocillos cubiertas con mucina y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Tras la incubación, se eliminó el medio y los pocillos se lavaron 2 veces con PBS. Luego, se añadieron 0,2 mL/pocillo de NaOH 0,1 M, conteniendo SDS al 1% (p/v), y la placa se incubó a 37 °C durante 30 min. Las mezclas se homogeneizaron y los sobrenadantes se transfirieron a placas negras de 96 pocillos. Por último, se midió la fluorescencia a una  $\lambda_{ex}$  de 485 nm y una  $\lambda_{em}$  de 538 nm usando un fluorímetro multiscan (Fluoroskan Ascent, Labsystem, Oy, Finlandia). También se emplearon controles negativos sin bacterias a lo largo de todo el experimento.

La adhesión se expresó como el porcentaje de fluorescencia medida tras la unión a mucina en relación a la fluorescencia inicial de la suspensión bacteriana añadida a los pocillos.

### 3.11.3 Ensayos competitivos de adhesión en presencia de lectinas

En primer lugar se evaluó la afinidad o interacción entre las suspensiones bacterianas y las lectinas empleadas en el presente estudio (*aglutinina de soja* (*Glycine max*, SBA) (L11272), *aglutinina del cacahuete* (*Arachis Hypogaea*, PNA) (L7381) y *aglutinina de Helix pomatia* (HPA) (L11271)) marcadas con el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Invitrogen, Paisley, UK). Para ello, las células bacterianas, obtenidas a partir de los cultivos incubados durante 20 horas, se separaron por centrifugación (4.000 g, 5 min a 4 °C). El precipitado se lavó 3 veces con PBS (pH 7,2) y se resuspendió en PBS fresco. A continuación, la suspensión bacteriana se dividió en tres grupos celulares diferentes: a) células bacterianas no tratadas (control); b) células bacterianas mezcladas con una aglutinina específica (concentración final de 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); y c) células bacterianas mezcladas con los digeridos de  $\beta$ -Lg y SC nativos, controles calentados y glicosados (concentración final de 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante 15 min, lavadas 2 veces con PBS e incubadas con PBS, conteniendo la aglutinina específica (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), durante otros 15 min. Tras el periodo de incubación, las bacterias se separaron por centrifugación (10.000 g, 5 min a 4 °C) y el precipitado se resuspendió en 0,5 mL de solución de lisis (NaOH 0,1 M + SDS al 1% (p/v)). Finalmente, la fluorescencia se midió a una  $\lambda_{\text{ex}}$  de 485nm y una  $\lambda_{\text{em}}$  de 510 nm. Durante todo el experimento se emplearon controles negativos sin bacterias.

### 3.11.4 Amplificación de genes de factores de virulencia

La detección de los genes de factores de virulencia se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) utilizando cebadores específicos, seleccionados en un estudio previo de validación (West y col., 2007) ([Tabla M13](#)). El aislamiento del ADN se llevó por calentamiento a 100 °C durante 6 min de las suspensiones bacterianas.

Todas las reacciones se realizaron en cápsulas MicroAmp selladas con sus correspondientes tapones (Roche Applied Biosystems, Mannheim, Alemania) en un volumen total de reacción de 15  $\mu\text{L}$ , constituido por: 2,5  $\mu\text{L}$  (60 ng) de ADN purificado (utilizado como plantilla), 7,5  $\mu\text{L}$  del SYBR Green Master I mix (Roche Applied Biosystems, Mannheim, Alemania), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada cebador a la concentración adecuada y 4,5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasa (Roche Applied Biosystems, Mannheim, Alemania). El ciclado térmico consistió en un ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación

de 20 s a 94 °C, 20 s a 55 °C y 30 s a 72 °C, usando un sistema LyghtCycler 480® (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

**Tabla M13.** Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de factores de virulencia.

Factores de virulencia	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Concentración de trabajo (µM)	Número de acceso	Tamaño del producto (pb <sup>c</sup> )
K88 <sup>a</sup>	ggttcagtgaaagtcaatgcatct	20	AJ616236	70
	ccccgtccgcagaagtaac	20		
K99 <sup>a</sup>	gctattagtggtcatggcactgtag	35	M35282	80
	ttgttttcgctaggcagtcatta	35		
F41 <sup>a</sup>	ctgctgattggacggaaggt	30	X14354	88
	ccagtcttccatagccatttaacag	30		
Hlt <sup>b</sup>	ccggcagaggatggttacag	20	K01995	73
	gaatccagggttctctctcaa	20		

<sup>a</sup> Antígenos fimbriales; <sup>b</sup> toxina termolábil (Hlt); <sup>c</sup> pares de bases.

Los resultados de amplificación se expresaron como valores de ciclo umbral (Ct), calculados a partir de las curvas de amplificación. Además, los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (4,5%) de alta resolución.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en dos ensayos independientes. El **análisis estadístico** para determinar las diferencias significativas entre los resultados derivados de los estudios de adhesión a mucina y competitivos de adhesión en presencia de lectinas, se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y el test Tukey *post hoc* empleando el programa SPSS para Windows versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





## **PARTE I: CARACTERIZACIÓN DE LOS GLICOCONJUGADOS**

Bajo las distintas condiciones ensayadas (naturaleza del azúcar reductor,  $a_w$ , temperatura y tiempo de incubación), la estructura de la proteína nativa puede experimentar distintas modificaciones en función del avance de la reacción de Maillard (RM), que determinarán, en gran medida, la funcionalidad de los glicoconjugados obtenidos. Por ello, tras la obtención de los glicoconjugados de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) y caseinato sódico (SC), se llevó a cabo la evaluación de su grado de glicación, mediante la determinación de distintos indicadores de la evolución de la RM, así como el estudio de sus propiedades estructurales, mediante distintas técnicas cromatográficas, electroforéticas y espectrométricas (espectrofotométricas, espectrofluorimétricas y espectrometría de masas), con el fin de profundizar en el efecto de la glicosilación vía RM sobre la funcionalidad, tanto tecnológica como biológica, de las proteínas estudiadas.

### **4.1 GLICOCONJUGADOS DE $\beta$ -LACTOGLOBULINA**

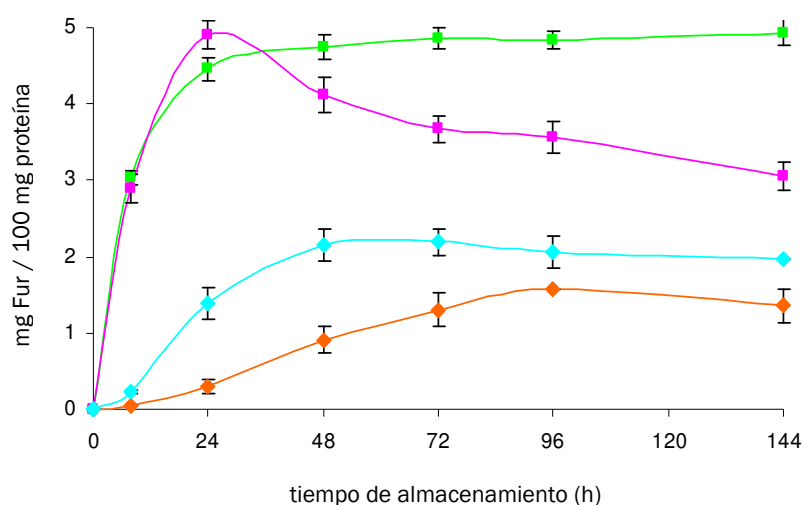
#### **4.1.1 Determinación del avance de la reacción de Maillard**

##### **4.1.1.1 Etapas iniciales**

Los compuestos de Amadori y de Heyns, indicadores de las etapas iniciales de la RM, se cuantificaron indirectamente por RP-LC-UV, a partir de los derivados furoilo y furilo formados tras hidrólisis ácida de los glicoconjugados de Gal y Tag, respectivamente. Como es sabido, la furosina (2-furoilmetil-lisina), derivado furoilo formado a partir de la hidrólisis ácida del compuesto de Amadori de la lisina, puede ser un indicador útil para medir el avance de la glicosilación no-enzimática de proteínas (Moreno y col., 2002; Fenaille y col., 2003; Krause y col., 2003; Jiménez-Castaño y col., 2005a; Jimenez-Castaño y col., 2005b), ya que la cantidad formada de furosina depende de la intensidad del tratamiento térmico. Ésta se incrementa linealmente durante la fase inicial de la RM, mientras que disminuye en las etapas avanzadas, debido a una mayor degradación del compuesto de Amadori frente a su formación (Finot y col., 1981). Sin embargo, la información acerca de los compuestos obtenidos a partir de la hidrólisis ácida del compuesto de Heyns es muy escasa. Además, la formación de éste en los alimentos ha sido cuestionada hasta hace muy poco, habiéndose demostrado recientemente la formación de dos compuestos de Heyns epímeros en

productos de panadería con fructosa (Krause y col., 2008). En nuestro caso, tras la hidrólisis ácida de las muestras de  $\beta$ -Lg glicada con Tag, se observó por RP-LC-UV un pico cromatográfico con el mismo tiempo de retención que la furosina (cromatograma no mostrado). La absorbancia a 280 nm exhibida por este compuesto es probablemente debida a la presencia de un anillo furilo formado por la ciclación de los carbonos C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub> del compuesto de Heyns. Además, es probable que una pequeña cantidad de furosina coeluya también con este compuesto, ya que McPherson y col. (1988) encontraron que a partir de la incubación de la fructosa con la seroalbúmina humana no sólo se formaban dos 2-amino-2-desoxiglucosos vía reordenamiento de Heyns, sino también alrededor de un 15% del correspondiente compuesto de Amadori (1-amino-1-desoxifruktosa) (Mossine y col., 1996).

La **Figura R1** muestra la evolución del contenido en furoil- y furil-derivados de los compuestos de Amadori y de Heyns, respectivamente, durante la incubación de la  $\beta$ -Lg con Gal y Tag a 40 y 50°C.

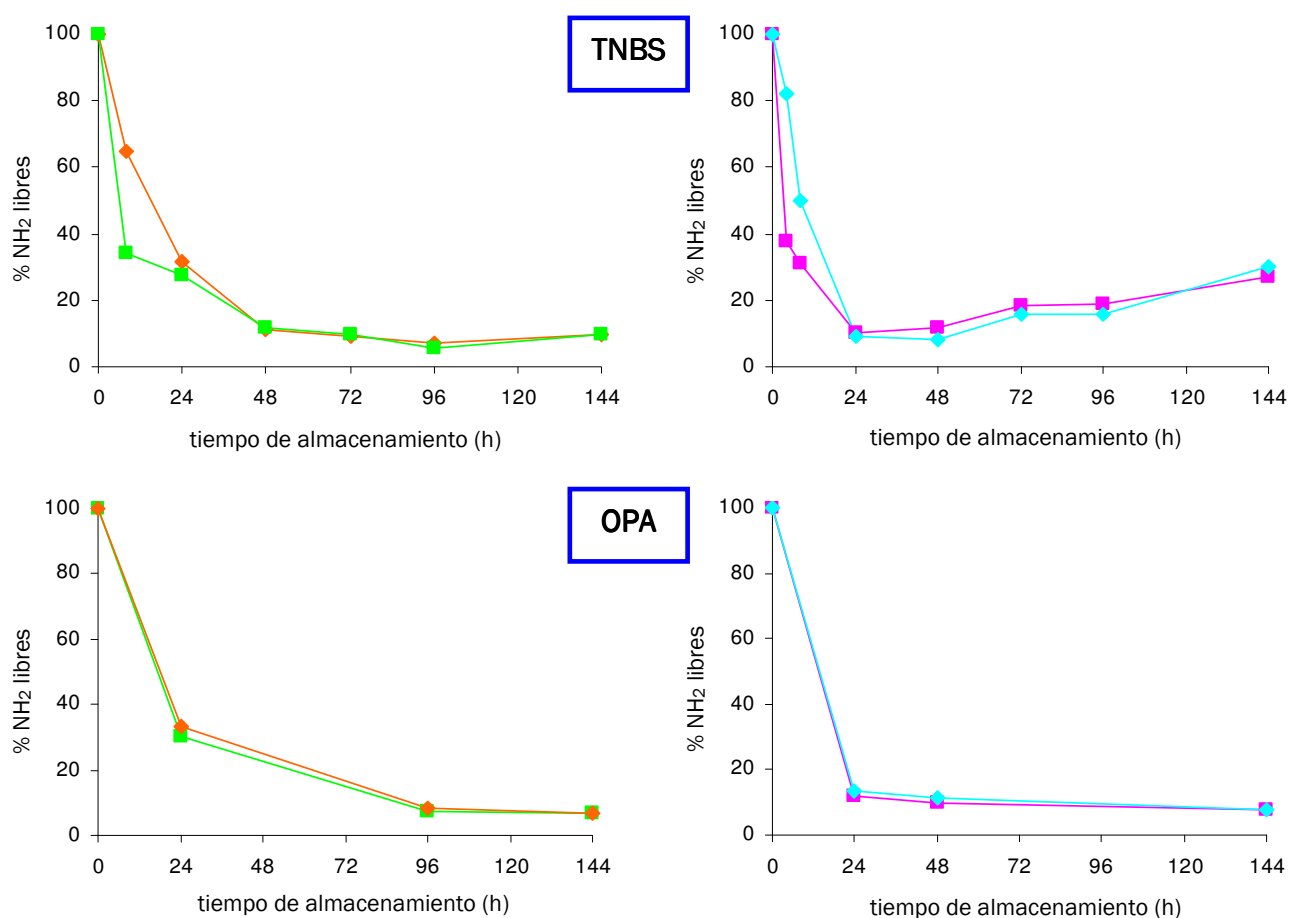


**Figura R1.** Evolución del contenido de 2-furoil/furil-metil-aminoácidos derivados de los compuestos de Amadori y de Heyns durante la formación de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag: ■  $\beta$ -Lg:Gal 40°C; ■  $\beta$ -Lg:Gal 50°C; ◆  $\beta$ -Lg:Tag 40°C; ◆  $\beta$ -Lg:Tag 50°C. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

Los resultados mostraron que, durante las etapas iniciales de la RM, la galactosa reaccionaba en mayor medida y más rápidamente con los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina que la Tag, a ambas temperaturas, probablemente debido a que el grupo aldehído de la forma acíclica de la Gal es más electrofílico que el grupo ceto de la forma acíclica de la

Tag. En el caso del conjugado  $\beta$ -Lg:Gal, los niveles máximos de furosina se alcanzaron tras 24 h de almacenamiento, tanto a 40°C como a 50°C, mientras que las cantidades más elevadas de furil-derivado se observaron tras el almacenamiento de la  $\beta$ -Lg con Tag durante 96 h a 40°C y 48 h a 50°C. Además, a partir de las 24 h de almacenamiento de la  $\beta$ -Lg con Gal a 50°C se observó un descenso brusco de la cantidad de furosina, indicando que la degradación del compuesto de Amadori prevalecía sobre su formación dando paso a etapas más avanzadas de la RM.

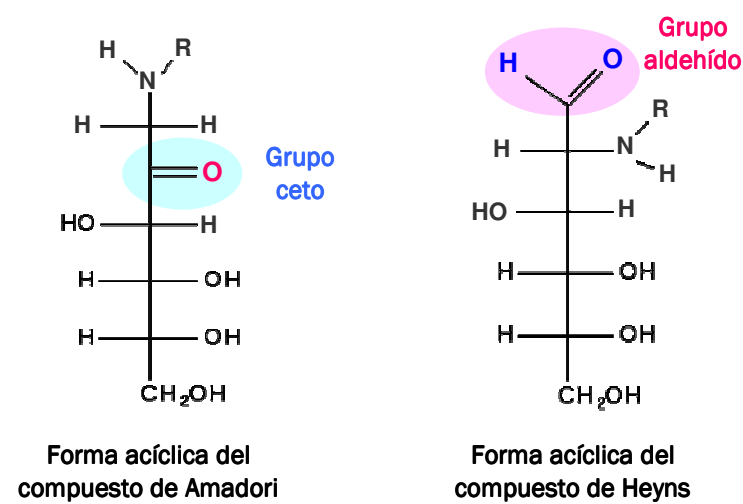
La **Figura R2** muestra la pérdida de grupos amino libres de la  $\beta$ -Lg como consecuencia de su conjugación con Gal y Tag a 40 y 50°C, determinada por el método del TNBS y del OPA. Los valores porcentuales se calcularon considerando como 100% de disponibilidad de grupos amino libres los valores de absorbancia correspondientes a la  $\beta$ -Lg nativa.



**Figura R2.** Determinación de la pérdida de grupos amino primarios libres de la  $\beta$ -Lg durante la incubación con Gal o Tag a 40°C y 50°C por el método del TNBS y del OPA. —  $\beta$ -Lg:Gal 40°C; —  $\beta$ -Lg:Gal 50°C; —  $\beta$ -Lg:Tag 40°C; —  $\beta$ -Lg:Tag 50°C.

Durante las primeras 8 h de reacción a 40 y 50 °C, la reducción de grupos amino libres, determinada por el método del TNBS, resultó ser más rápida en la incubación con Gal, de acuerdo con la mayor velocidad de formación de 2-furoilmetil-derivados observada para este carbohidrato. Para periodos de reacción más prolongados, cuando el contenido en grupos amino libres disminuyó de forma significativa (~90%), se detectó un incremento de la absorbancia, atribuible posiblemente al desarrollo de color en las muestras, que interfiere con la determinación de grupos amino libres mediante el método del TNBS, ya que la medida se realizó dentro del rango visible (420 nm). Para confirmar esta hipótesis se analizaron las muestras por el método OPA, mediante el que se observó una disminución progresiva de los grupos amino libres durante todo el periodo de reacción estudiado (Figura R2).

Por otro lado, al comparar las Figuras R1 y R2 se puede observar cómo, a pesar de estar más glicosilada la  $\beta$ -Lg incubada con Gal, el porcentaje de grupos amino libres de la  $\beta$ -Lg incubada con ambos carbohidratos se iguala a partir de las 24 h a ambas temperaturas, lo que podría sugerir un mayor grado de entrecruzamiento de la  $\beta$ -Lg incubada con Tag que con Gal. Este resultado es probablemente debido al hecho de que el compuesto de Heyns (galactosil-lisina), el cual posee un grupo aldehído altamente reactivo, es degradado más rápidamente a compuestos dicarbonilos que el compuesto de Amadori (tagatosil-lisina), con un grupo ceto, menos reactivo (Heyns y col., 1967; Hinton y Ames, 2006) (Figura R3).

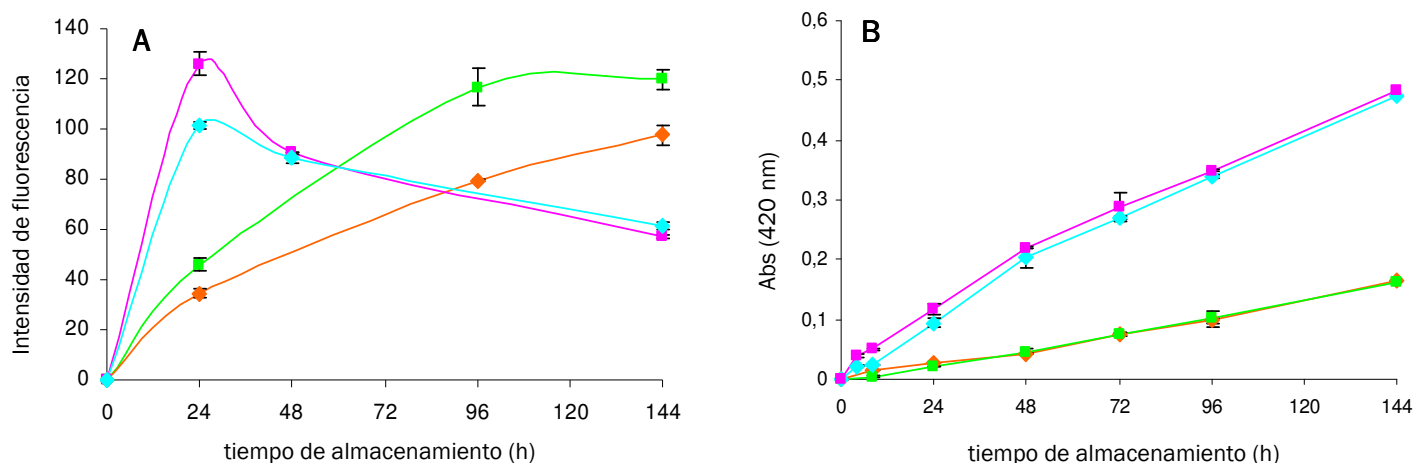


**Figura R3.** Representación de las formas acíclicas de los compuestos de Amadori y de Heyns, resaltándose el grupo ceto y el grupo aldehído, respectivamente, de los mismos.

#### 4.1.1.2 Etapas avanzadas y finales

Dependiendo de las condiciones de reacción, la formación de compuestos fluorescentes (AGEs), indicadores de las etapas avanzadas de la RM, puede mostrar un máximo con el tiempo de incubación (Pearce, 1950; Baisier y Labuza, 1992), aumentar continuamente (Cerutti y col., 1985; Huyghues-Despointes y Yaylayan, 1996), o bien, alcanzar un valor a partir del cual se mantiene constante (Kato y col., 1989).

En el caso de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag, como se observa en la **Figura R4 (A)**, a 40 °C, la fluorescencia extrínseca aumentó progresivamente durante todo el almacenamiento, siendo este aumento menor cuando la  $\beta$ -Lg fue glicada con Tag. A 50 °C, sin embargo, se alcanzó un máximo de fluorescencia tras las 24 h de almacenamiento con ambos carbohidratos, siendo éste también mayor para los derivados galactosilo. A partir de las 24 h de incubación a 50°C, la presencia de compuestos fluorescentes disminuyó de forma brusca, probablemente debido al progreso de la reacción hacia la formación de agregados no fluorescentes. Después de las 48 h de almacenamiento a 50°C, no se observaron diferencias entre los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal y  $\beta$ -Lg:Tag.



**Figura R4.** Evolución de la fluorescencia extrínseca (A) y de la absorbancia a 420 nm (B) durante la formación de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag:  $\blacksquare$   $\beta$ -Lg:Gal 40°C;  $\blacksquare$   $\beta$ -Lg:Gal 50°C;  $\blacklozenge$   $\beta$ -Lg:Tag 40°C;  $\blacklozenge$   $\beta$ -Lg:Tag 50°C.

El desarrollo de color (absorbancia a 420 nm,  $A_{420}$ ) (**Figura R4 (B)**), característico de las etapas finales de la RM, fue también, como era de esperar, mayor a 50°C que a 40°C. A ambas temperaturas, el color experimentó un incremento constante desde el inicio del

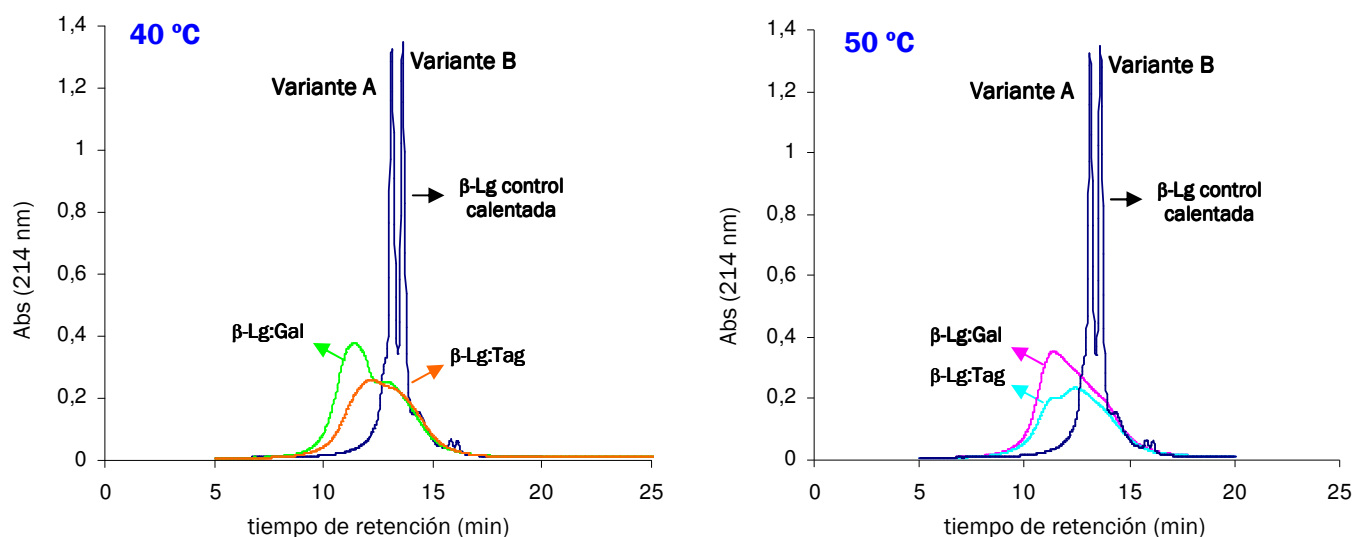
almacenamiento y, apenas, se observaron diferencias cuando se compararon ambos glicoconjugados.

Si comparamos las **figuras R4 (A) y R4 (B)**, podemos observar un aumento progresivo tanto de la fluorescencia como del color durante todo el almacenamiento a 40°C, sugiriendo que parte de la formación de compuestos fluorescentes y pigmentos pardos se podría dar por vías independientes (Matiacevich, 2006). Esto podría explicar el pardeamiento ( $A_{420}$ ) similar producido con ambos carbohidratos, a pesar de ser menor la fluorescencia en el caso de la  $\beta$ -Lg glicada con Tag.

## 4.1.2 Caracterización estructural de los glicoconjugados

### 4.1.2.1 Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa con detección ultravioleta (RP-LC-UV)

Los cromatogramas de la  $\beta$ -Lg control calentada y glicada con Gal y Tag obtenidos por RP-LC-UV se muestran en la **Figura R5**.



**Figura R5.** Perfiles cromatográficos obtenidos mediante RP-LC-UV de la  $\beta$ -Lg control calentada y glicada a 40°C durante 96 h con ambos carbohidratos y a 50°C durante 24 h con Gal y 48 h con Tag.

La proteína control calentada a 40 y 50°C presentó el mismo perfil cromatográfico que la  $\beta$ -Lg nativa, el cual mostraba dos picos bien definidos correspondientes a las variantes genéticas A y B. Sin embargo, los perfiles correspondientes a la  $\beta$ -Lg glicada mostraron un pico ancho, debido a la gran heterogeneidad de los derivados de  $\beta$ -Lg formados durante el proceso de glicosilación no-enzimática, y menos retenido, cuya área se incrementaba con el tiempo de incubación. Esto indica que los cambios en el perfil cromatográfico de las mezclas  $\beta$ -Lg:Gal/Tag incubadas se deben exclusivamente a la glicación de la proteína. Un comportamiento similar fue previamente descrito con la lactosilación del caseinmacropéptido (Moreno y col., 2002), de la  $\beta$ -Lg y de la  $\alpha$ -La (Czerwenka y col., 2006). El menor tiempo de retención del pico correspondiente a la proteína glicada puede ser atribuido a la incorporación de residuos de Gal o Tag a la cadena peptídica, lo cual conduce a un incremento de la hidrofiliidad de la  $\beta$ -Lg y, por tanto, a una menor retención en una columna de fase inversa. El tiempo de retención del pico correspondiente al complejo  $\beta$ -Lg:Gal fue menor que el de la  $\beta$ -Lg incubada con Tag. Esto podría sugerir un mayor número de moléculas de Gal que de Tag unidas a la  $\beta$ -Lg tras la glicación, lo que está de acuerdo con el análisis por RP-LC-UV de los derivados furoilo y furilo (Figura R1).

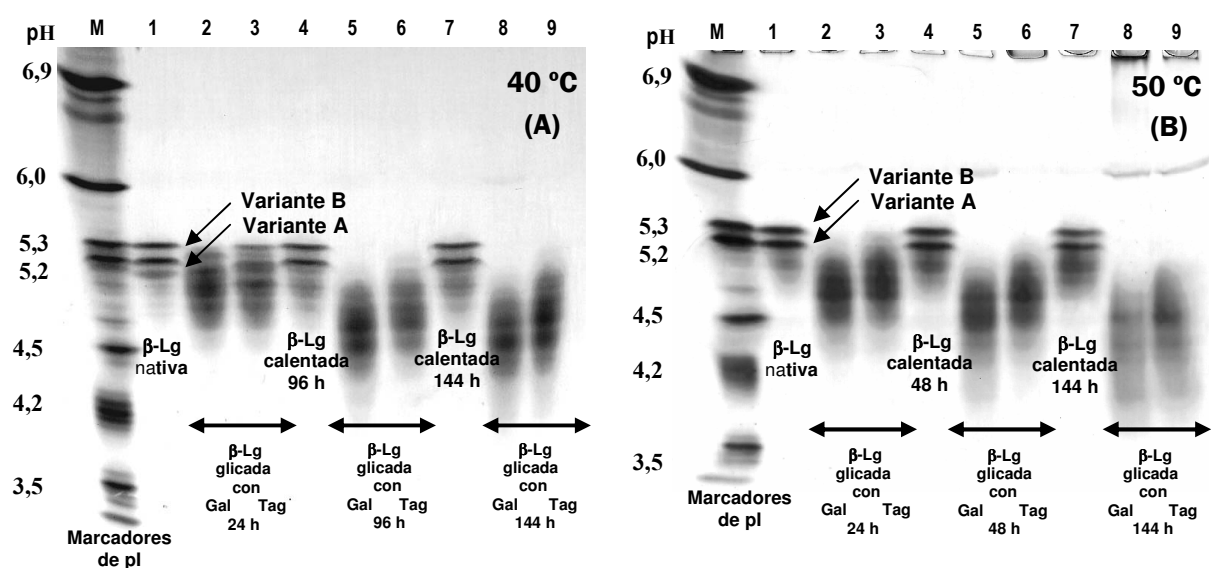
#### **4.1.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida por isoelectroenfoco (IEF)**

Otro de los métodos adecuados para evaluar la glicación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida por IEF, debido a los cambios que pueden producirse en el pI de la proteína como resultado de su interacción de los carbohidratos. Así, el bloqueo de los residuos básicos de lisina (Lys) y arginina (Arg) con carbohidratos induce una pérdida de basicidad y, consecuentemente, un moderado incremento en la carga neta negativa de la molécula de  $\beta$ -Lg, lo que conduce a un notable desplazamiento del pI de la proteína glicada hacia un pH más ácido (Fenaille y col., 2003; Bunn y col., 1979; Nacka y col., 1998).

La  $\beta$ -Lg nativa (Figura R6, calle 1) mostró principalmente 2 bandas con un pI de 5,2 y 5,3 correspondientes a las variantes genéticas A y B, respectivamente. Un perfil similar se observó después del calentamiento de la  $\beta$ -Lg a 40°C durante 96 y 144 h (Figura R6 (A), calles 4 y 7) y a 50°C durante 48 y 144 h (Figura R6 (B), calles 4 y 7) en ausencia de carbohidratos. En el caso de la  $\beta$ -Lg glicada, la reducción del pI fue más acusado a 50°C que a 40°C, confirmándose, así, el mayor grado de glicosilación no-enzimática de la  $\beta$ -Lg alcanzado a 50°C, previamente indicado en el apartado 4.1.1.1 Asimismo, se detectaron



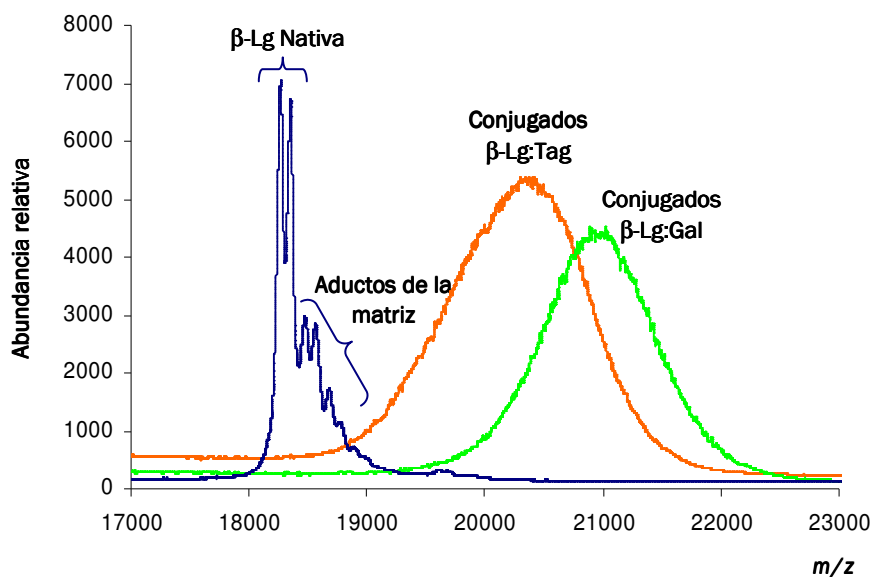
varias isoformas con pI entre 5,2 y 4,0 (Figuras R6 (A) y (B), calles 2, 3, 5, 6, 8 y 9). Tal diversidad de bandas con diferente carga es indicativa de la formación de un amplio rango de especies glicadas de  $\beta$ -Lg. El desplazamiento del pI fue mayor tras la incubación de la  $\beta$ -Lg con Gal que con Tag a ambas temperaturas, confirmando que la  $\beta$ -Lg está más extensamente glicada con la aldosa que con la cetosa, de acuerdo con los resultados derivados del análisis de los hidrolizados ácidos de los compuestos de Amadori y de Heyns (Figura R1).



**Figura R6.** Perfil electroforético de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40°C (A) y 50°C (B), obtenido tras el análisis de las muestras por IEF en un rango de pH 3-7.

#### **4.1.2.3 Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS)**

Con el objetivo de conocer exactamente el número de moléculas de carbohidrato unidas covalentemente a la  $\beta$ -Lg, se llevó a cabo el análisis de las muestras por MALDI-TOF-MS (Figura R7). Las masas moleculares de la  $\beta$ -Lg nativa fueron las esperadas para las variantes A y B, 18,363 y 18,278 Da, respectivamente (Léonil y col., 1997). Los espectros de masas de la  $\beta$ -Lg incubada con ambos azúcares se caracterizaron por un pico ancho con forma de campana de Gauss sin una buena resolución debido a la existencia de una gran heterogeneidad de glicoformas de  $\beta$ -Lg (Broersen y col., 2004; Van Teeffelen y col., 2005; Sanz y col., 2007), en concordancia con los resultados encontrados por IEF (Figura R6).



**Figura R7.** Espectros superpuestos de MALDI-TOF-MS de la  $\beta$ -Lg nativa e incubada con Gal o Tag a 40°C durante 144 h.

El promedio de moléculas de Gal o Tag unidas a la  $\beta$ -Lg después de la glicosilación no-enzimática se estimó considerando el máximo de intensidad de los picos gaussianos. Los resultados se muestran en la [Tabla R1](#). En general, un número mayor de moléculas de Gal que de Tag se unieron a la  $\beta$ -Lg, independientemente del tiempo de calentamiento. Debido a su mayor grado de glicación, la eficiencia de ionización de conjugados  $\beta$ -Lg:Gal en MALDI fue menor que la de los conjugados  $\beta$ -Lg:Tag, lo cual explica la mayor intensidad relativa observada para estos últimos.

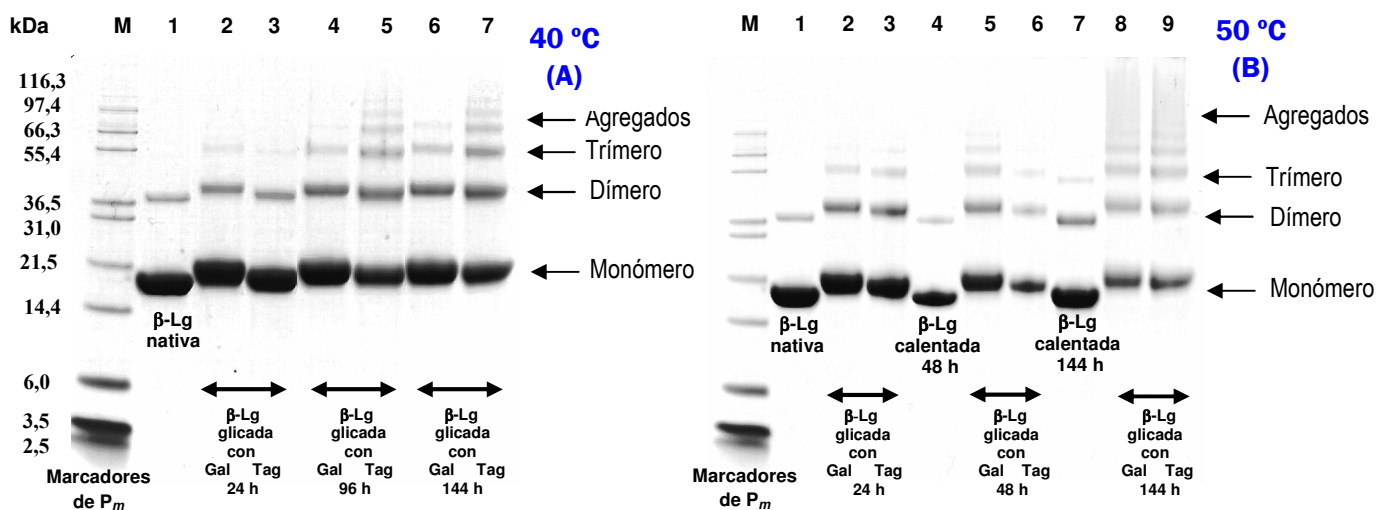
La mayor diferencia entre la glicación con ambos azúcares se observó después de las 24 h de incubación a 40°C, ya que tras este periodo de tiempo, se unieron a la  $\beta$ -Lg un promedio de 14 moléculas de Gal y 3 de Tag. Igualmente, se estimó que 21 moléculas de Gal se unieron a la proteína después de 144 h de almacenamiento a 50°C, a pesar de que la  $\beta$ -Lg tiene únicamente 19 sitios potenciales de glicación (15 residuos de Lys, 3 residuos de Arg y el grupo  $\text{NH}_2$  de la Leu situado en el extremo amino terminal de la proteína). Fenaille y col. (2004), quienes también observaron 22 aductos de Gal unidos covalentemente a la  $\beta$ -Lg después de su glicación en estado sólido a 60°C, identificaron dos residuos de Lys diglicados (Lys<sub>47</sub> y Lys<sub>75</sub>), lo que podría explicar el mayor número de moléculas de Gal unidas a la  $\beta$ -Lg.

**Tabla R1.** Número medio de moléculas de Gal o Tag unidas a la  $\beta$ -Lg glicada estimado por MALDI-TOF- MS.

Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (h)	Conjugados $\beta$ -Lg:Gal		Conjugados $\beta$ -Lg:Tag	
		m/z	No. medio de aductos de Gal	m/z	No. medio de aductos de Tag
40	24	20619,4	14	18845,3	3
	96	20971,5	16	20176,7	11
	144	21017,2	17	20368,3	13
50	24	21026,6	17	20448,2	13
	48	21350,7	19	20812,5	15
	144	21715,3	21	21534,3	20

#### 4.1.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

La menor movilidad electroforética de la  $\beta$ -Lg glicada comparada con la de las muestras control calentadas observada por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, confirmó la glicación de la  $\beta$ -Lg a 40°C (Figura R8 (A)) y a 50°C (Figura R8 (B)).



**Figura R8.** Perfiles electroforéticos de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40°C (A) y 50°C (B) obtenidos por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras.

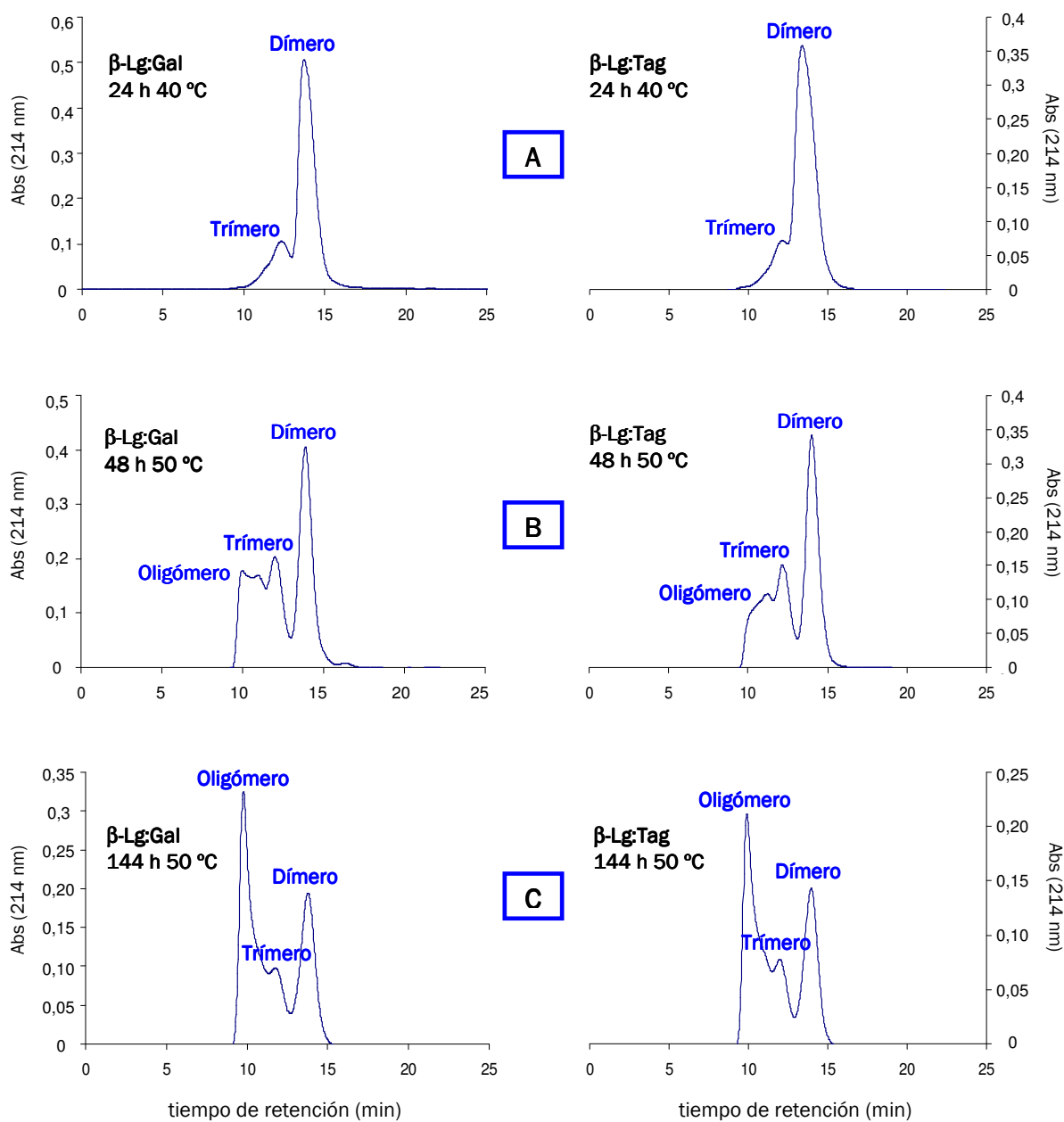
La  $\beta$ -Lg nativa se mostró principalmente en forma monomérica ( $P_m \sim 18.000$ ), detectándose también la banda correspondiente a la forma dimérica ( $P_m \sim 36.000$ ), aunque en una proporción mucho más baja (**Figura R8**, calle 1). En el caso de la  $\beta$ -Lg glicada con ambos carbohidratos, se detectaron nuevas bandas de mayor peso molecular (**Figura R8 (A)**, calles 6-7, y **Figura R8 (B)**, calles 8-9), posiblemente debido al entrecruzamiento de las proteínas inducido por el avance de la RM. Además, en el caso de la  $\beta$ -Lg tagatosilada tras la incubación a 40°C durante 96 y 144 h, se observó un mayor número de bandas de agregación, correspondientes a formas oligoméricas, comparado con el de la  $\beta$ -Lg galactosilada (**Figura R8 (A)**, calles 4-7). Estos resultados sugieren una mayor tendencia de la  $\beta$ -Lg a agregarse cuando es incubada con la cetosa (Tag) que con la aldosa (Gal), de acuerdo con los resultados derivados de la medida de la pérdida de grupos amino libres (Figura R2, apartado 4.1.1.1). De acuerdo con estos resultados, Matsuda y col. (1991) observaron una mayor agregación de la  $\beta$ -Lg glicada a 50 °C con lactulosa (cetosa) que con su correspondiente aldosa (lactosa).

A 50 °C, sin embargo, se observó un número similar de bandas de agregación con ambos carbohidratos (**Figura R8 (B)**), del mismo modo que tampoco se observaron diferencias importantes en la fluorescencia extrínseca y desarrollo de color de ambos glicoconjugados a 50 °C (Figura R4), indicando que, bajo estas condiciones de incubación, la cinética de la reacción con ambos carbohidratos es muy similar. Esto podría explicarse suponiendo que el compuesto de Amadori es más susceptible a la temperatura que el compuesto de Heyns. Así, el incremento de la temperatura de 40 a 50°C podría producir la aceleración de las reacciones de degradación del compuesto de Amadori, entre ellas la enolización, a través de la cual el grupo ceto del compuesto de Amadori podría migrar a los carbonos C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> del azúcar y promoviéndose la condensación adicional del grupo carbonilo con otros grupos amino primarios libres. De acuerdo con esto, Yeboah y col. (1999) demostraron, en un estudio con seroalbúmina bovina glicada con glucosa y fructosa en estado sólido, que el grupo  $\alpha$ -hidroxi-carbonilo del compuesto de Amadori era más reactivo que el grupo aldehído del compuesto de Heyns a 50 °C.

#### **4.1.2.5 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)**

En un intento por obtener más información acerca de los cambios estructurales promovidos por la interacción entre la Gal/Tag y la  $\beta$ -Lg, se estudió el grado de polimerización de la  $\beta$ -Lg por SEC bajo condiciones no desnaturalizantes.

Como se observa en la **Figura R9 (A)**, los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag obtenidos tras el almacenamiento a 40°C durante 24 h eluyeron predominantemente en forma de dímero. Sin embargo, con el incremento del tiempo de incubación, especialmente a 50 °C, varios picos correspondientes a formas triméricas y oligoméricas fueron apareciendo (**Figura R9 (B) y (C)**), confirmando que la glicación de la  $\beta$ -Lg promueve su polimerización, de acuerdo con los resultados obtenidos previamente por SDS-PAGE.



**Figura R9.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por SEC bajo condiciones no desnaturizantes, de la  $\beta$ -Lg incubada con Gal y Tag a 40°C durante 24 h (A) y a 50 °C durante 48 (B) y 144 h (C).

Como indicadores del grado de polimerización, en la **Tabla R2** se muestran el porcentaje de las formas monomérica, dimérica y polimérica, así como una relación entre las formas poliméricas (trímero + oligómeros) y la forma dimérica de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y controles estudiados a 40 y 50°C. Como era de esperar, la  $\beta$ -Lg nativa eluyó principalmente como dímero a pH neutro. La proteína control calentada en ausencia de azúcares también contenía algunas formas agregadas minoritarias, cuya formación puede ser atribuida a la desnaturalización por calor y posterior agregación de la proteína (McKenzie y col., 1967; Cairoli y col., 1994; Hoffmann y col., 1997).

**Tabla R2.** Porcentaje de las formas dimérica, trimérica y oligomérica de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 144 h, estimado tras su análisis por SEC bajo condiciones no desnaturalizantes.

Temperatura	Muestra	Tiempo de almacenamiento (h)	Dímero (%)	Trímero (%)	Oligómeros (%)	Relación polímero/dímero	
	$\beta$ -Lg nativa	0	96,0 $\pm$ 0,28*	4,0 $\pm$ 0,28			
40°C	$\beta$ -Lg control	96		17,1 $\pm$ 0,33			
		144	82,9 $\pm$ 0,33 81,2 $\pm$ 1,66	18,8 $\pm$ 1,66			
	$\beta$ -Lg:Gal	24		16,0 $\pm$ 0,52		0,19	
		96	84,0 $\pm$ 0,52	26,3 $\pm$ 0,33	14,6 $\pm$ 0,57	0,69	
		144	59,1 $\pm$ 0,90 57,8 $\pm$ 2,84	24,3 $\pm$ 1,13	17,9 $\pm$ 1,70	0,73	
	$\beta$ -Lg:Tag	24		16,1 $\pm$ 0,28		0,19	
		96	83,9 $\pm$ 0,28	23,9 $\pm$ 0,71	25,6 $\pm$ 1,56	0,98	
		144	50,5 $\pm$ 0,85 50,2 $\pm$ 0,64	23,7 $\pm$ 0,07	26,1 $\pm$ 0,71	0,99	
	50°C	$\beta$ -Lg control	48	87,7 $\pm$ 0,78	12,3 $\pm$ 0,78		
			144	76,9 $\pm$ 0,49	23,1 $\pm$ 0,49		
$\beta$ -Lg:Gal		24	58,1 $\pm$ 3,04	24,6 $\pm$ 1,48	17,3 $\pm$ 1,56	0,72	
		48	45,9 $\pm$ 1,56	23,0 $\pm$ 0,35	31,1 $\pm$ 1,20	1,18	
		144	28,9 $\pm$ 2,40	14,7 $\pm$ 1,20	56,4 $\pm$ 3,61	2,46	
$\beta$ -Lg:Tag		24	60,3 $\pm$ 0,21	23,9 $\pm$ 0,35	15,8 $\pm$ 0,57	0,66	
		48	49,0 $\pm$ 2,26	23,3 $\pm$ 0,85	27,7 $\pm$ 1,41	1,04	
		144	31,4 $\pm$ 1,13	16,2 $\pm$ 1,48	52,4 $\pm$ 2,62	2,18	

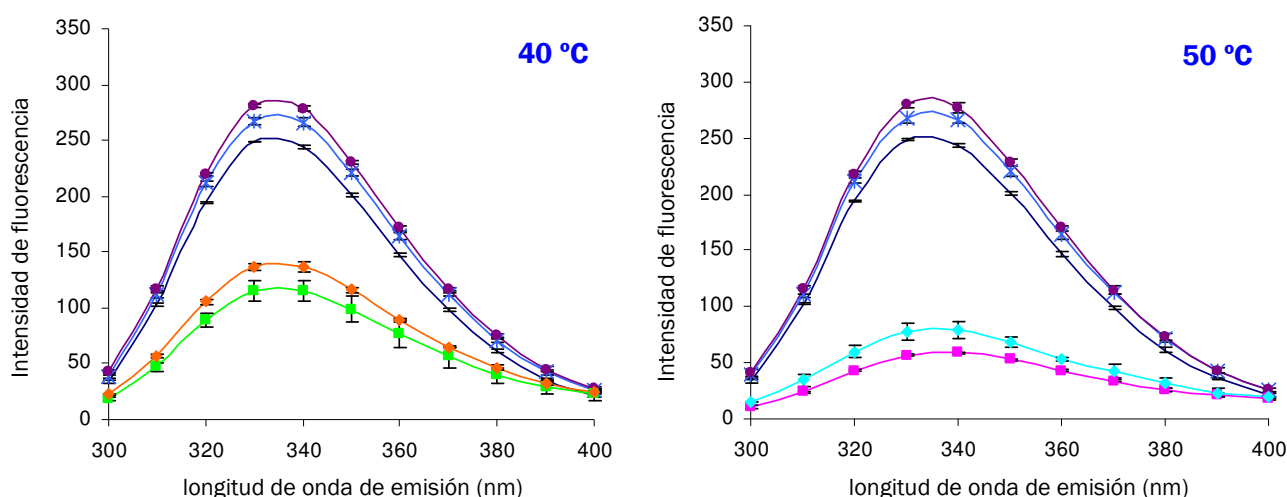
\* Los datos son la media de dos experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar de la media.

Además, a partir de las 96 h de incubación a 40°C, la relación polímero (especies triméricas + oligoméricas)/dímero fue mayor en los conjugados  $\beta$ -Lg:Tag que en los complejos  $\beta$ -Lg:Gal, indicando un mayor entrecruzamiento de la  $\beta$ -Lg tagatosilada, mientras

que a 50°C se observó un comportamiento muy similar con ambos monosacáridos (Tabla R2), confirmando los resultados obtenidos en apartados anteriores mediante otras técnicas de caracterización.

#### 4.1.2.6 Determinación de la fluorescencia intrínseca

La fluorescencia intrínseca de las proteínas lácteas se debe a tres aminoácidos aromáticos: el triptófano (Trp), la tirosina (Tyr) y la fenilalanina (Phe). De estos tres aminoácidos, el triptófano domina la emisión de fluorescencia de las proteínas debido a su elevado coeficiente de extinción. La fluorescencia del Trp puede proporcionar información acerca de la estructura proteica, debido a que sus propiedades de emisión son sensibles al entorno aminoacídico, de modo que los cambios estructurales que afecten al entorno del Trp van a poder ser detectados por una variación en su espectro de emisión (Andersen y Mortensen, 2008). La Figura R10 muestra los espectros de emisión de fluorescencia del Trp de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal y Tag a 40 y 50°C.



**Figura R10.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal o Tag durante 96 h a 40 °C y durante 48 h a 50 °C. —  $\beta$ -Lg nativa; \*  $\beta$ -Lg control calentada 96 h a 40 °C y 48 h a 50 °C; —  $\beta$ -Lg control calentada 144 h a 40 y 50 °C;  $\beta$ -Lg:Gal incubada — 96 h a 40 °C y — 48 h a 50 °C;  $\beta$ -Lg:Tag incubada — 96 h a 40 °C y — 48 h a 50 °C.

Tras la excitación a 280 nm, la  $\beta$ -Lg nativa exhibió una emisión de fluorescencia máxima ( $\lambda_{max}$ ) a 335 nm. A ambas temperaturas, la intensidad de fluorescencia relativa al

Trp (IF-Trp) se incrementó en la  $\beta$ -Lg control calentada. Este incremento fue acompañado por un desplazamiento del máximo de emisión del Trp a 337 nm, lo que sugiere una mayor exposición del Trp hacia zonas más hidrofílicas. Esto significa que la  $\beta$ -Lg experimenta cambios conformacionales alrededor de los residuos del Trp ( $^{19}\text{Trp}$  y  $^{64}\text{Trp}$ ) debido a la desnaturalización inducida por calor (Renard y col., 1998; Jimenez-Castaño y col., 2005a, 2005b y 2007). En el caso de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag, la IF-Trp fue menor que la de la proteína nativa a ambas temperaturas, particularmente a 50°C, lo cual puede ser atribuido al efecto de apantallamiento del carbohidrato unido a la  $\beta$ -Lg (Hattori y col., 2000a; Jimenez-Castaño y col., 2005a, 2005b y 2007). Además, a 50°C se observó un ligero desplazamiento del máximo de emisión del Trp a 338 nm (con la Tag) y a 340 nm (con la Gal), mientras que a 40°C no se detectó ningún desplazamiento de la  $\lambda_{\text{max}}$ . Estos resultados sugieren que la glicosilación a 40°C con ambos azúcares reductores afectó parcialmente a las cadenas laterales de la estructura terciaria de la proteína, sin una gran alteración de la estructura nativa, mientras que a 50°C el estado conformacional de la  $\beta$ -Lg resultó más afectado.

#### **4.1.2.7 Determinación de la hidrofobicidad superficial**

La estructura tridimensional de la  $\beta$ -Lg se caracteriza, como se explicó en la introducción, por poseer una región hidrofóbica denominada barril  $\beta$  que confiere a la proteína la capacidad de unir *in vitro* pequeños ligandos hidrofóbicos, como el 8-anilino-1-naftalen-sulfónico (ANS) (Haque y Kinsella, 1987) y el retinol (RET) (Pérez y Calvo, 1995), entre otros. Por tanto, el estudio de la capacidad para unir ligandos hidrofóbicos (hidrofobicidad superficial,  $S_o$ ) de la  $\beta$ -Lg podría ser útil para determinar los cambios estructurales producidos tras la glicosilación vía RM en dicha región hidrofóbica.

Por lo que se refiere a la capacidad de unión al ANS ([Tabla R3](#)), en las muestras de  $\beta$ -Lg control calentada se observó un aumento de la  $S_o$ , con respecto a la  $\beta$ -Lg nativa, especialmente a 50 °C. Esto podría ser atribuido a la exposición de residuos hidrofóbicos, inicialmente ocultos, en la superficie de la proteína, como consecuencia de su desnaturalización parcial por calor (Kaminogawa y col., 1989).



**Tabla R3.** Hidrofobicidad superficial ( $S_o$ ), medida como fluorescencia del ANS, de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal o Tag incubada durante 144 h a 40 y 50 °C.

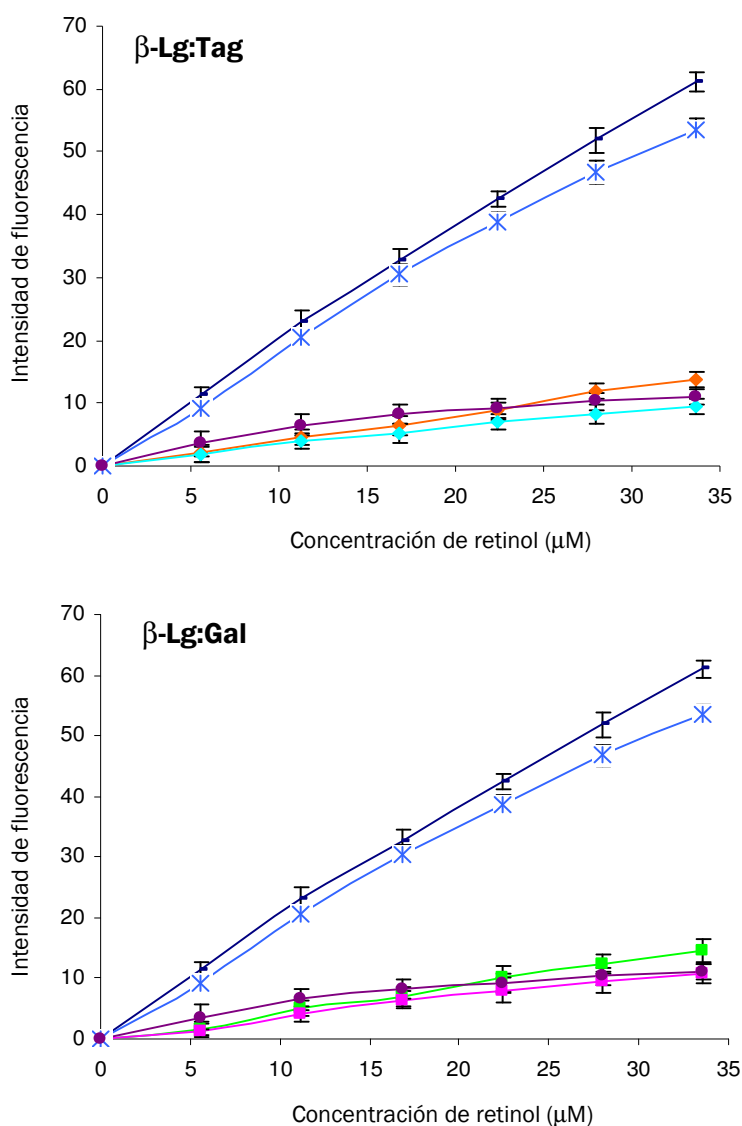
Temperatura (°C)	Muestra	Tiempo de almacenamiento (h)	Fluorescencia del ANS
40	$\beta$ -Lg nativa	0	40,8 $\pm$ 1,15*
	$\beta$ -Lg control calentada	96	46,7 $\pm$ 0,21
		144	52,6 $\pm$ 3,93
	$\beta$ -Lg:Gal	24	42,9 $\pm$ 0,16
		96	40,0 $\pm$ 0,22
		144	39,5 $\pm$ 0,13
	$\beta$ -Lg:Tag	24	42,7 $\pm$ 1,81
		96	33,7 $\pm$ 3,64
		144	35,8 $\pm$ 3,20
	50	$\beta$ -Lg control calentada	48
144			60,5 $\pm$ 1,14
$\beta$ -Lg:Gal		24	38,8 $\pm$ 3,17
		48	26,0 $\pm$ 0,99
		144	10,8 $\pm$ 1,42
$\beta$ -Lg:Tag		24	43,0 $\pm$ 0,37
		48	33,1 $\pm$ 0,16
	144	17,1 $\pm$ 1,31	

\* Los datos son la media de dos experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar de la media.

Sin embargo, la glicosilación no-enzimática, tanto con Gal como con Tag, indujo una disminución de la  $S_o$ . El efecto de la glicación de la proteína fue principalmente notable a 50°C a partir de las 48 h de incubación, particularmente en los conjugados galactosilo, en los que el descenso significativo de la  $S_o$  indicaba importantes cambios estructurales en la configuración tridimensional de la proteína, de acuerdo con los resultados de fluorescencia intrínseca. Esta reducción en la  $S_o$  de los conjugados podría ser atribuida tanto a la formación de agregados durante las etapas avanzadas de la RM, quedando los residuos hidrofóbicos más ocultos en la estructura de la proteína, como al bloqueo de los residuos de Lys y/o Arg por Gal o Tag, ya que el ANS puede también unirse fuertemente a los grupos catiónicos de las proteínas (Gasymov y Glasgow, 2007).

En el caso de la capacidad ligante RET, a 40°C no se encontraron diferencias importantes entre la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada (datos no mostrados), indicando

que a esta temperatura la proteína no sufrió importantes cambios conformacionales, de acuerdo con los resultados anteriores. A 50 °C (Figura R11), en cambio, el aumento del tiempo de incubación resultó en una reducción en la capacidad ligante de RET de la  $\beta$ -Lg control calentada y glicada con ambos carbohidratos, con respecto a la de la  $\beta$ -Lg nativa. Tales resultados podrían ser atribuidos a cambios conformacionales en el barril  $\beta$  de la  $\beta$ -Lg como resultado de la desnaturalización térmica y agregación proteica inducida por la glicosilación vía RM, impidiendo el reconocimiento proteína-ligando.



**Figura R11.** Capacidad ligante de retinol de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag a 50°C. —  $\beta$ -Lg nativa; \*  $\beta$ -Lg control calentada 48 h; \*  $\beta$ -Lg control calentada 144 h; —  $\beta$ -Lg:Gal o —  $\beta$ -Lg:Tag 48 h; —  $\beta$ -Lg:Gal o —  $\beta$ -Lg:Tag 144 h.

### **Conclusiones parciales**

El análisis del contenido en furosina por RP-LC-UV de par iónico, así como la medida de la formación de AGEs, del desarrollo de color y de los grupos amino primarios libres nos permitieron evaluar la influencia del grupo carbonilo del azúcar reductor (aldehído o cetona) sobre el avance de la RM durante la formación de los glicoconjugados  $\beta$ -Lg:Gal y  $\beta$ -Lg:Tag. Asimismo, las técnicas analíticas empleadas, concretamente RP-LC-UV y IEF, MALDI-TOF-MS, nos permitieron llevar a cabo una caracterización estructural exhaustiva de los glicoconjugados  $\beta$ -Lg:Gal y  $\beta$ -Lg:Tag, aportándonos, cada una de ellas, datos complementarios acerca de las modificaciones producidas en la estructura primaria y secundaria de la proteína nativa durante su glicosilación con Gal (aldosa) o Tag (cetosa) vía RM. Asimismo, las técnicas de SDS-PAGE y SEC, así como las determinaciones de la fluorescencia intrínseca e hidrofobicidad superficial nos aportaron información sobre la alteración del estado conformacional (estructura terciaria y cuaternaria) de la  $\beta$ -Lg tras su glicación con Gal o Tag.

Así, de acuerdo con los resultados obtenidos, la Gal fue más reactiva que la Tag durante las etapas iniciales de la RM, uniéndose a la  $\beta$ -Lg un número substancialmente mayor de moléculas de Gal que de Tag tras 24 h de incubación a 40 °C (14 de Gal por 3 de Tag). Asimismo, a 40 °C, la Tag dio lugar a un mayor grado de agregación proteica durante las etapas avanzadas de la reacción, debido, probablemente, a la mayor reactividad del compuesto de Heyns. Sin embargo, a 50 °C no se observaron diferencias en este respecto.

#### **4.1.3 Efecto de la piridoxamina sobre la glicosilación de la $\beta$ -lactoglobulina con galactosa y tagatosa vía reacción de Maillard**

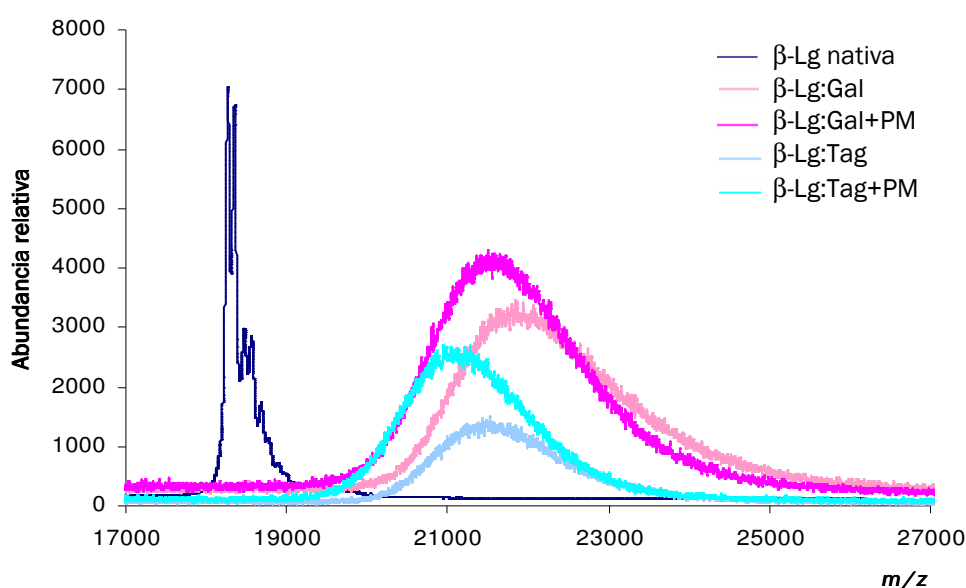
Los resultados mostrados hasta ahora en la presente memoria se han referido a glicoconjugados de  $\beta$ -Lg obtenidos por glicosilación deliberada de la proteína vía RM, controlando la temperatura, el tiempo y la naturaleza del azúcar reductor. Sin embargo, debido a la complejidad de la RM y, dado que las etapas más avanzadas de la misma pueden conducir a alteraciones importantes en la estructura y funcionalidad de las proteínas, así como a posibles efectos indeseables, tales como el deterioro de las características organolépticas y del valor nutritivo de los alimentos y la formación de compuestos mutagénicos y prooxidantes, asociados a enfermedades degenerativas, la utilización de inhibidores eficaces de dichas etapas, junto con la optimización de unas

condiciones suaves de reacción, podría ser de gran interés. Sin embargo, hasta la fecha, los aditivos alimentarios considerados como seguros para el consumo humano y que puedan prevenir las reacciones carbonilo en los alimentos son muy escasos (Pischetsrieder, 2009).

Diversos autores han descrito a la piridoxamina (PM), un vitámero de la vitamina B<sub>6</sub>, como un potente inhibidor *in vivo* e *in vitro* del avance de la RM en sistemas líquidos (Voziyan y col., 2002; Nagaraj y col., 2002; Chetyrkin y col., 2008; Amarnath y col., 2004; Adrover y col., 2005, 2007). Sin embargo, estos trabajos no se llevaron a cabo con proteínas de grado alimentario ni se emplearon cetosas como azúcar reductor. En el presente trabajo, hemos evaluado el impacto de la PM sobre el avance de la RM durante la glicosilación no-enzimática de la  $\beta$ -Lg con Gal (aldosa) y Tag (cetosa).

#### 4.1.3.1 Etapas iniciales

Con el fin de conocer el número exacto de moléculas de Gal o Tag unidas a la  $\beta$ -Lg en presencia y ausencia de PM, los glicoconjugados, obtenidos tras el almacenamiento en paralelo con y sin PM, se analizaron por MALDI-TOF-MS. La **Figura R12** muestra los espectros de masas de los conjugados incubados con y sin PM, caracterizados por un pico ancho en forma de campana de Gauss, al igual que los espectros mostrados anteriormente (Figura R7).



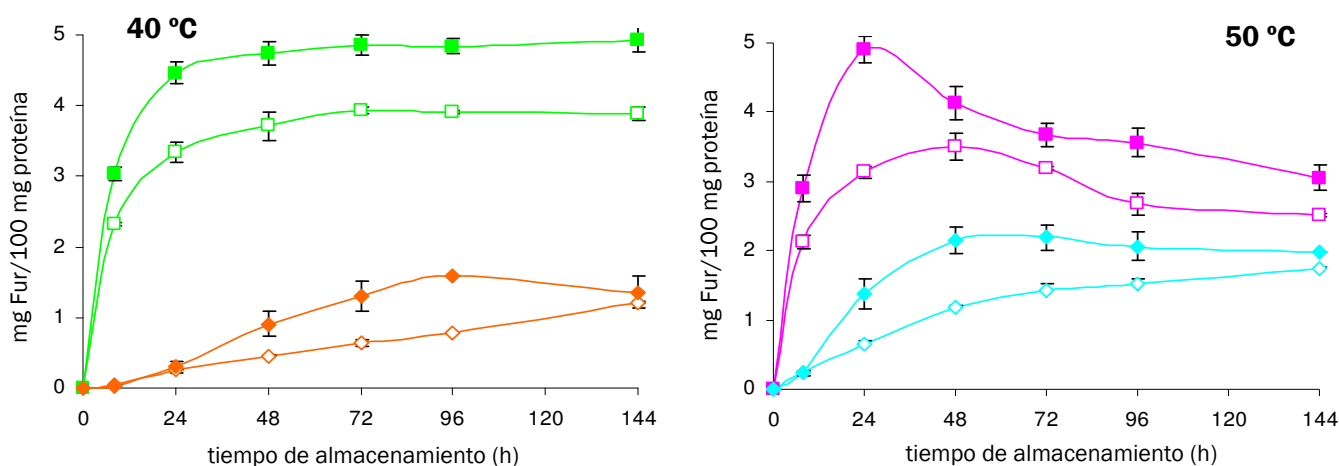
**Figura R12.** Espectros de MALDI-TOF-MS de la  $\beta$ -Lg nativa e incubada con Gal y Tag a 50 °C durante 144 h en presencia y en ausencia de PM.

Asimismo, el promedio de moléculas de Gal o Tag unidas a la  $\beta$ -Lg tras la glicación con o sin PM se estimó considerando el máximo de intensidad de los picos Gaussianos (Tabla R4). Como se observa en la tabla, la estimación media de aductos de Gal o Tag unidos a la  $\beta$ -Lg fue ligeramente menor en presencia que en ausencia de PM, tanto a 40°C como a 50°C, observándose una diferencia algo más acusada a 50°C.

**Tabla R4.** Promedio de moléculas, estimado por MALDI-TOF-MS, de Gal o Tag unidas a la  $\beta$ -Lg tras la glicosilación no-enzimática en presencia y ausencia de PM.

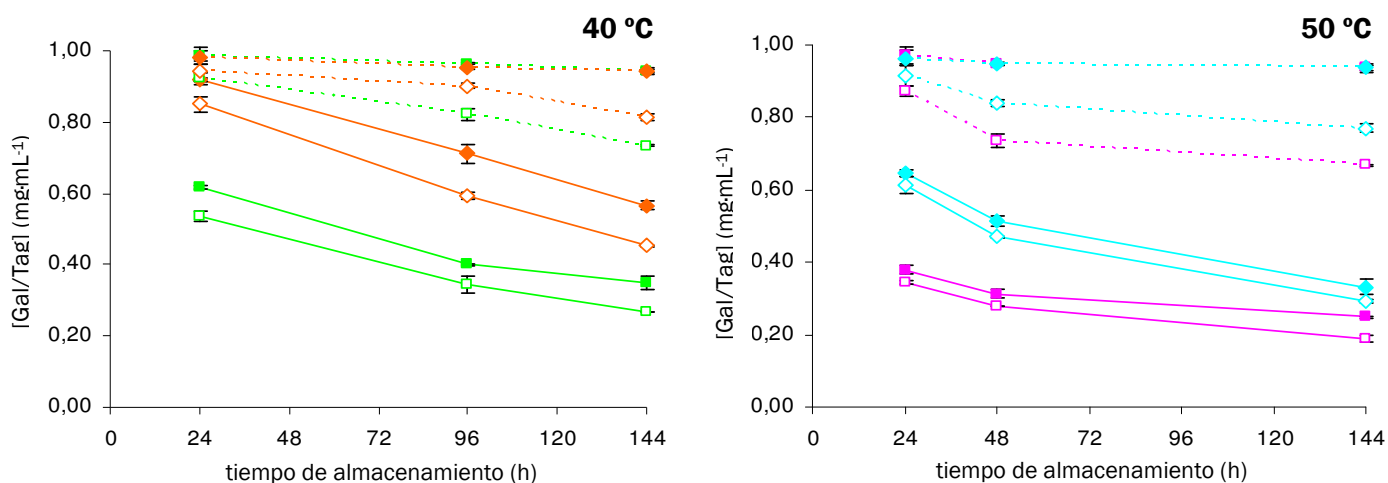
Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (h)	Conjugados $\beta$ -Lg:Gal		Conjugados $\beta$ -Lg:Tag	
		Promedio de aductos de Gal en presencia de PM	Promedio de aductos de Gal en ausencia de PM	Promedio de aductos de Tag en presencia de PM	Promedio de aductos de Tag en ausencia de PM
40	24	10	11	3	5
	96	15	16	11	13
	144	16	17	13	14
50	24	14	16	7	10
	48	16	17	12	14
	144	18	20	16	20

A continuación, para corroborar estos resultados, se evaluó la formación de los compuestos de Amadori y de Heyns de forma indirecta mediante *RP-LC-UV, previa hidrólisis ácida*. La Figura R13 muestra la evolución del contenido en los derivados furoilo y furilo de los correspondientes productos de Amadori (tagatosil-lisina) y de Heyns (galactosil-lisina), respectivamente, durante el almacenamiento de la  $\beta$ -Lg con Gal y Tag con o sin PM a 40 y 50 °C. Como se puede observar, la velocidad de formación de los compuestos de Amadori y Heyns fue menor en presencia que en ausencia de PM a ambas temperaturas, confirmando los datos de MALDI-TOF-MS. Este comportamiento podría ser debido a un efecto competitivo entre el grupo amino primario de la PM (Figura I15, apartado 1.2.4) y los grupos amino libres de la  $\beta$ -Lg por el grupo carbonilo de la Gal o la Tag durante las etapas iniciales de la RM, retrasando ligeramente la formación de la base de Schiff y, por tanto, de los correspondientes compuestos de Amadori y de Heyns.



**Figura R13.** Evolución del contenido de 2-furoil/furilmetil-aminoácidos derivados de los compuestos de Amadori y de Heyns durante la incubación de la  $\beta$ -Lg con Gal/Tag en presencia y ausencia de PM, 6 días a 40 °C [ $\blacksquare$   $\beta$ -Lg:Gal;  $\square$   $\beta$ -Lg:Gal+PM;  $\blacklozenge$   $\beta$ -Lg:Tag;  $\lozenge$   $\beta$ -Lg:Tag+PM] y a 50 °C [ $\blacksquare$   $\beta$ -Lg:Gal;  $\square$   $\beta$ -Lg:Gal+PM;  $\blacklozenge$   $\beta$ -Lg:Tag;  $\lozenge$   $\beta$ -Lg:Tag+PM].

Con el fin de demostrar dicho efecto competitivo, se determinó la pérdida total de carbohidratos presentes en el medio de reacción durante la incubación tanto de los controles de Gal/Tag como de la  $\beta$ -Lg glicada con ambos carbohidratos en ausencia y en presencia de PM a 40 y 50 °C (Figura R14). Como se esperaba, la reducción en la cantidad de carbohidratos fue mayor a 50 que a 40 °C, debido a la aceleración de la reacción con la temperatura. Asimismo, la pérdida total de Gal y Tag incubados tanto solos (controles de Gal/Tag) como con la  $\beta$ -Lg, bajo las mismas condiciones de reacción, fue mayor en presencia que en ausencia de PM, lo que indica que el grupo amino primario de la PM es, también, capaz de interactuar con el grupo carbonilo de la Gal o de la Tag, quedando menos carbohidrato libre disponible para la formación de las correspondientes bases de Schiff. Esto explicaría el menor grado de formación del compuesto de Amadori y de Heyns en presencia de PM descrito en los párrafos anteriores (Tabla R4 y Figura R12). Asimismo, estos datos concuerdan con los publicados por Adrover y col. (2005), quienes en un estudio cinético llevado a cabo con PM y glucosa bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura, encontraron que la constante de velocidad de la reacción entre la PM y la glucosa es similar a los valores previamente descritos para las reacciones en sistemas modelo entre la glucosa y varios aminoácidos, siendo, por tanto, posible la interacción entre la PM y los azúcares reductores.

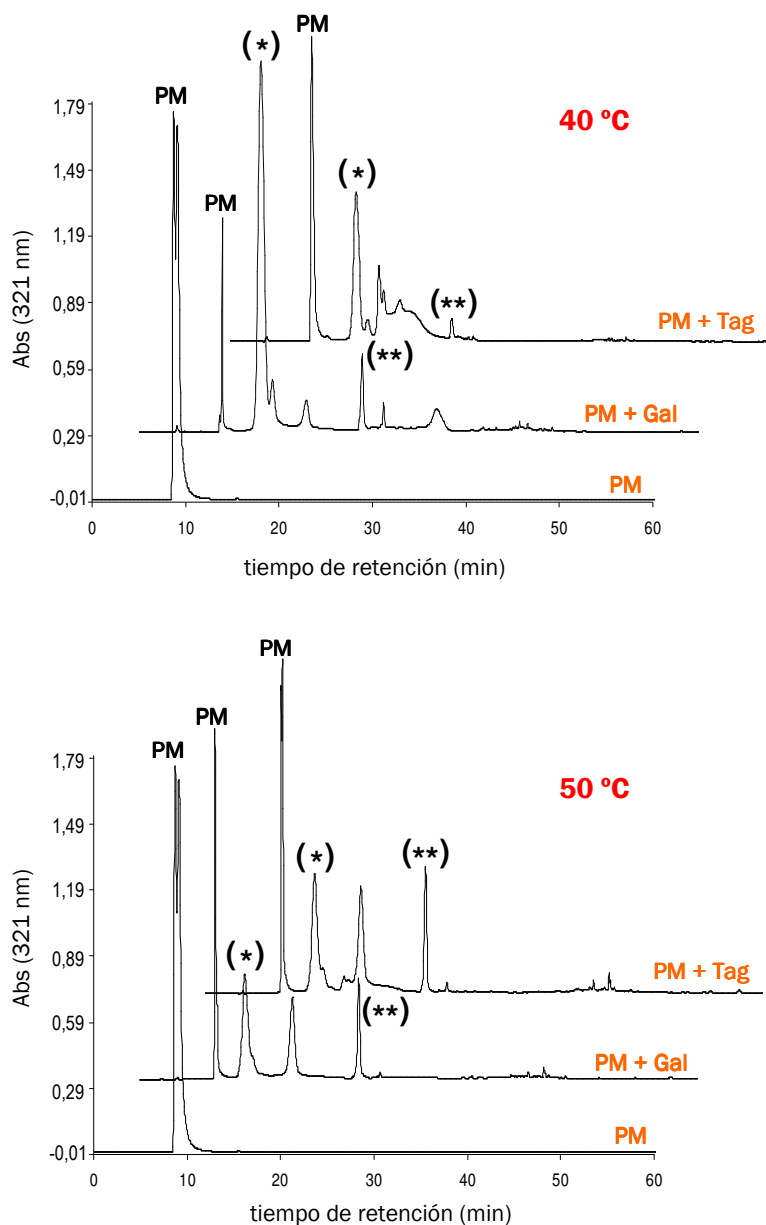


**Figura R14.** Determinación por el método de antrona-ácido sulfúrico en microplaca de la pérdida de carbohidratos durante la incubación del control Gal/Tag y de la  $\beta$ -Lg glicada con Gal/Tag en ausencia y en presencia de PM durante 144 h a 40 y 50 °C. Gal a  $\square$  40 y  $\blacksquare$  50 °C; Gal+PM a  $\square$  40 y  $\blacksquare$  50 °C; Tag a  $\diamond$  40 y  $\blacklozenge$  50 °C; Tag+PM a  $\diamond$  40 y  $\blacklozenge$  50 °C;  $\beta$ -Lg:Gal a  $\square$  40 y  $\blacksquare$  50 °C;  $\beta$ -Lg:Gal+PM a  $\square$  40 y  $\blacksquare$  50 °C;  $\beta$ -Lg:Tag a  $\diamond$  40 y  $\blacklozenge$  50 °C;  $\beta$ -Lg:Tag+PM a  $\diamond$  40 y  $\blacklozenge$  50 °C.

Además, los resultados mostraron un consumo mayor de Gal que de Tag a lo largo de toda la reacción, tanto en presencia como en ausencia de  $\beta$ -Lg, indicando una mayor reactividad de la Gal, no sólo hacia los grupos amino libres de la  $\beta$ -Lg, como ya se indicó anteriormente, sino también hacia el grupo amino primario de la PM.

#### 4.1.3.1.1 Determinación de los aductos piridoxamina:galactosa/tagatosa por RP-LC-UV

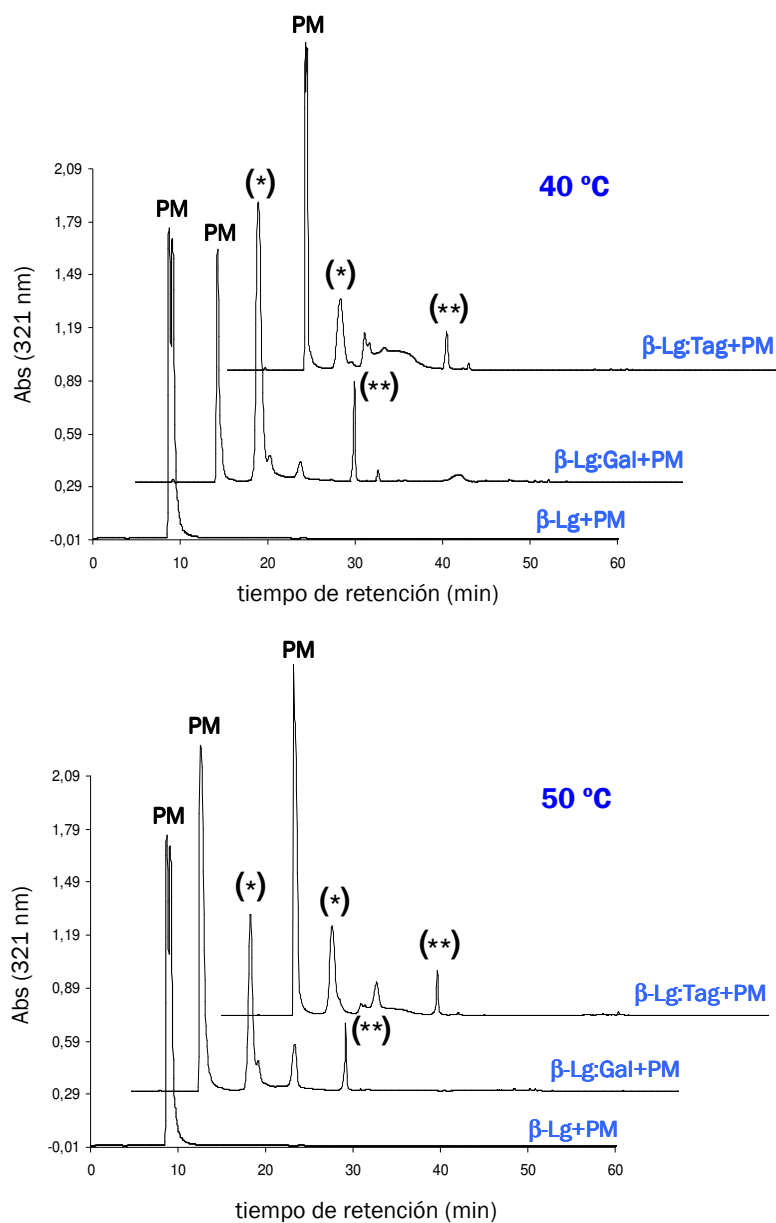
Para confirmar la existencia de productos de interacción entre la PM y la Gal o la Tag, la PM se incubó con ambos carbohidratos en ausencia de  $\beta$ -Lg a 40 y 50°C, y posteriormente se analizó por RP-LC-UV, siendo ésta la primera vez que se estudiaban los compuestos resultantes de la interacción entre la PM y una cetosa, concretamente la Tag (**Figura R15**).



**Figura R15.** Cromatogramas de RP-LC-UV para la reacción entre la piridoxamina (PM) y la galactosa (Gal) o tagatosa (Tag), en ausencia de  $\beta$ -Lg, durante 24 h a 40 y 50°C.

Los perfiles cromatográficos de la PM incubada a 40 y 50 °C en ausencia de carbohidratos se caracterizó por un único pico doble con un tiempo de retención de 8,7 min, correspondiente a diferentes tautómeros de la PM. Sin embargo, los perfiles de la PM incubada con los carbohidratos mostraron varios picos cromatográficos correspondientes a los productos resultantes de la interacción entre la PM y la Gal o la Tag a ambas temperaturas (**Figura R15**). Estos productos también se detectaron cuando se analizó el permeado obtenido tras la ultrafiltración de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag, incubados en presencia de PM bajo las mismas condiciones de reacción (**Figura R16**).



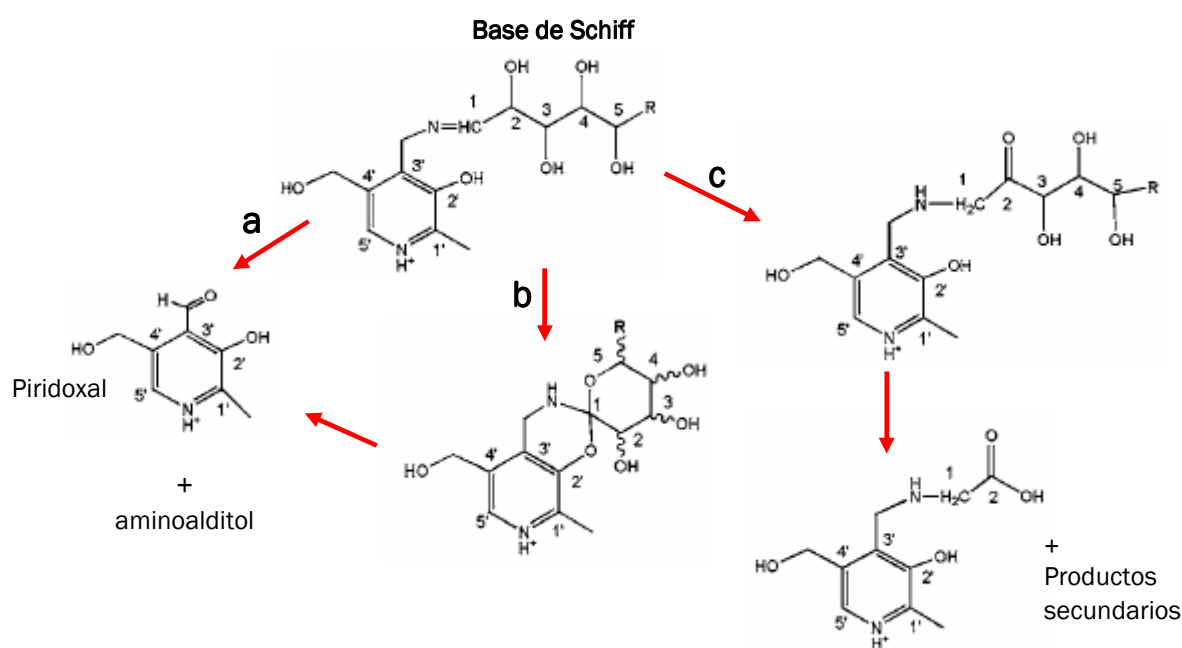


**Figura R16.** Cromatogramas de RP-LC-UV para la reacción entre la piridoxamina (PM) y la galactosa (Gal) o tagatosa (Tag), en presencia de  $\beta$ -Lg, durante 24 h a 40 y 50°C.

Como se observa en la **Figura R16**, estas muestras presentaron unos perfiles cromatográficos muy similares, desde un punto de vista cualitativo, a los de las muestras de PM incubada con Gal o Tag en ausencia de  $\beta$ -Lg (**Figura R15**), sugiriendo que las reacciones producidas entre el carbohidrato y la PM tanto en presencia como en ausencia de  $\beta$ -Lg podrían tener lugar a través de los mismos mecanismos de interacción.

Los perfiles cromatográficos mostrados en las **Figuras R15 y R16** son muy similares a los obtenidos por Adrover y col. (2005, 2007) en una serie de estudios realizados sobre la

cinética de la interacción entre la PM y diversas aldosas (hexosas y pentosas) en condiciones fisiológicas de pH y temperatura. Estos autores purificaron e identificaron por RMN algunos de los productos formados y establecieron el mecanismo de la interacción entre la PM y las aldosas. Para el caso de la hexosas, en primer lugar, el grupo carbonilo del azúcar reductor en forma acíclica experimenta un ataque nucleofílico por el grupo amino primario desprotonado ( $-NH_2$ ) de la PM, dando lugar a una base de Schiff, la cual puede evolucionar de tres formas diferentes en función de la naturaleza del carbohidrato (**Esquema R1**): **(a)** descomposición por transaminación dando lugar a piridoxal, otro vitámero natural de la vitamina B<sub>6</sub>, y a un aminoalditol; **(b)** doble ciclación interna en la parte del carbohidrato, dando lugar a la estructura tentativa del pico marcado con un doble asterisco en las **Figuras R15 y R16**, y que a su vez puede degradarse para formar nuevos vitámeros como el piridoxal, la piridoxina y el ácido 4-piridóxico (aunque éste último compuesto también puede proceder de la oxidación del piridoxal) (Gregory y Kirk, 1978); **(c)** reordenamiento en un compuesto de Amadori, el cual, a su vez, se descompone para dar lugar a la estructura tentativa del pico marcado con un asterisco en las **Figuras R15 y R16**.



**Esquema R1.** Rutas principales de formación de los principales productos derivados de la interacción entre la PM y aldohexosas. Basado en Adrover y col. (2007).

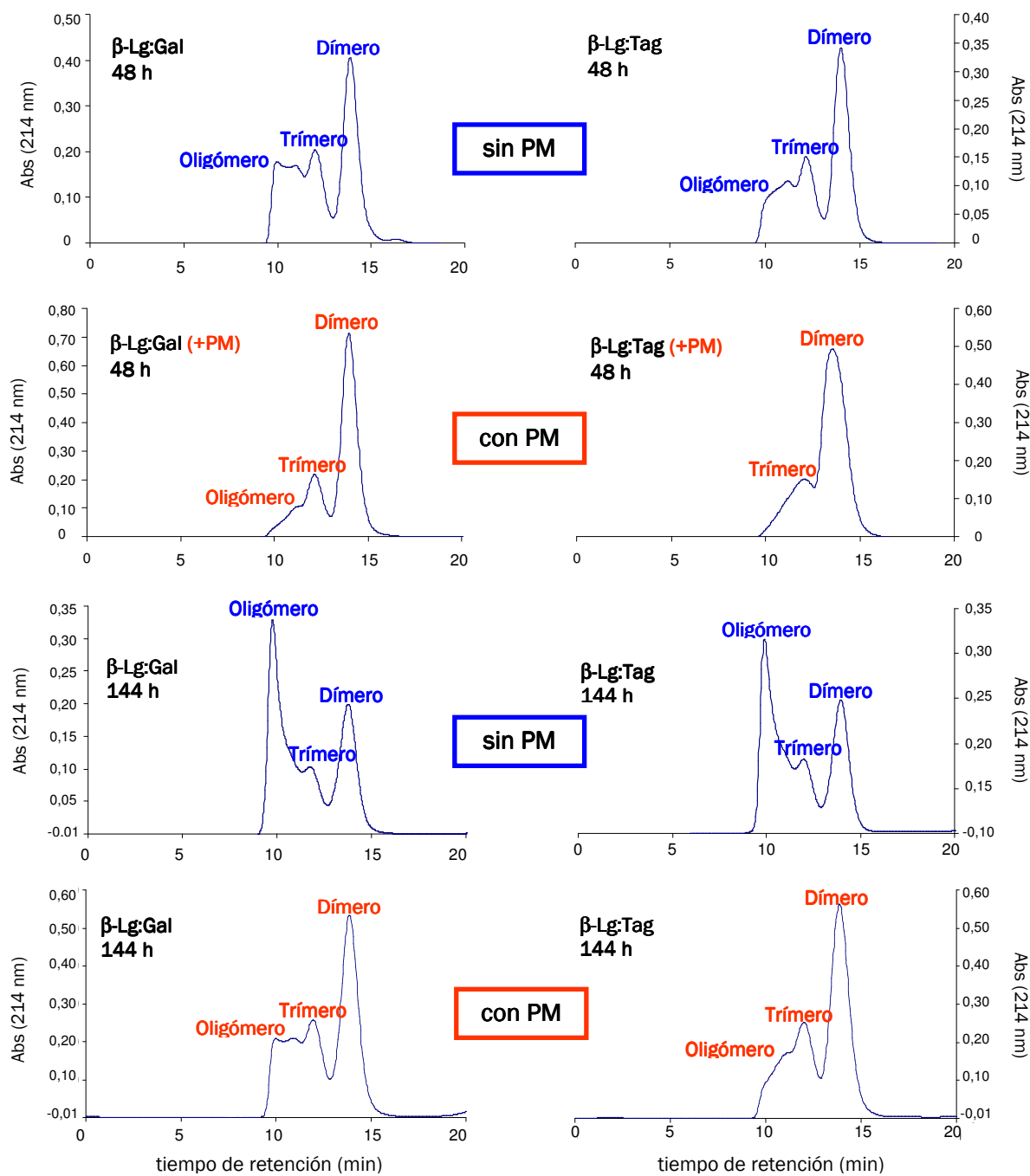
#### **4.1.3.2 Etapas avanzadas y finales**

Con el fin de estudiar el efecto inhibitor de la PM en presencia de  $\beta$ -Lg sobre las etapas avanzadas y finales de la RM, se determinó el grado de agregación y el pardeamiento tanto de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag incubados con PM como de los carbohidratos Gal/Tag incubados con PM en ausencia de  $\beta$ -Lg.

##### **4.1.3.2.1 *Determinación del grado de agregación***

Para evaluar el efecto de la PM sobre la agregación proteica, el grado de polimerización de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal y Tag en presencia de PM se evaluó por SEC bajo condiciones no desnaturalizantes.

La inhibición de la agregación proteica debida a la PM fue especialmente notable tras el almacenamiento a 50 °C durante 48 y 144 h. Como se puede observar en la [Figura R17](#), la  $\beta$ -Lg glicada sin PM a 50°C durante 48 y 144 h, condiciones que favorecen la agregación proteica, eluyó principalmente como polímero, mientras que, en presencia de PM, la forma mayoritaria fue la dimérica.



**Figura R17.** Cromatogramas obtenidos por SEC bajo condiciones no desnaturalizantes de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag incubados durante 48 y 144 h a 50°C en presencia y ausencia de PM.

Asimismo, como se puede observar en la [Tabla R5](#), en presencia de PM, los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag presentaron una relación polímero (especies triméricas + oligoméricas) / dímero notablemente menor que en ausencia de PM a ambas temperaturas, indicando, por tanto, un menor grado de agregación en presencia del inhibidor.

**Tabla R5.** Porcentaje de las formas dimérica, trimérica y oligomérica de  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con PM a 40 y 50°C durante 144 h, estimado después de su análisis por SEC en condiciones no desnaturalizantes. También se muestran las relaciones polímero/dímero obtenidas en ausencia de PM.

Temperatura (°C)	Muestra	Tiempo de almacenamiento (h)	Dímero (%)	Trímero (%)	Oligómero (%)	Relación polímero/dímero con PM	Relación polímero/dímero sin PM (tabla R2, apartado 4.1.2.5)	
40	$\beta$ -Lg nativa	0	96,0 $\pm$ 0,28*	4,0 $\pm$ 0,28				
	$\beta$ -Lg control calentada	96	92,0 $\pm$ 0,57	8,0 $\pm$ 0,57				
		144	90,0 $\pm$ 0,25	10,0 $\pm$ 0,25				
	$\beta$ -Lg:Gal	24	89,7 $\pm$ 0,71	10,3 $\pm$ 0,71		0,11	0,19	
		96	80,0 $\pm$ 2,28	20,0 $\pm$ 2,28		0,25	0,69	
		144	69,7 $\pm$ 1,95	30,3 $\pm$ 1,95		0,43	0,73	
	$\beta$ -Lg:Tag	24	91,0 $\pm$ 0,49	9,0 $\pm$ 0,49		0,10	0,19	
		96	82,2 $\pm$ 2,4	17,8 $\pm$ 2,4		0,22	0,98	
		144	71,4 $\pm$ 1,68	28,6 $\pm$ 1,68		0,40	0,99	
	50	$\beta$ -Lg control	48	95,3 $\pm$ 0,02	4,7 $\pm$ 0,02			
			144	91,7 $\pm$ 0,13	8,3 $\pm$ 0,13			
		$\beta$ -Lg:Gal	24	78,7 $\pm$ 3,25	21,3 $\pm$ 3,25		0,27	0,72
48			67,1 $\pm$ 0,2	22,3 $\pm$ 0,02	10,6 $\pm$ 0,22	0,49	1,18	
144			48,1 $\pm$ 0,01	23,7 $\pm$ 0,13	28,2 $\pm$ 0,11	1,08	2,46	
$\beta$ -Lg:Tag		24	84,6 $\pm$ 1,08	15,4 $\pm$ 1,08		0,18	0,66	
		48	73,0 $\pm$ 0,25	27,0 $\pm$ 0,25		0,37	1,04	
		144	55,0 $\pm$ 1,69	26,6 $\pm$ 0,08	18,4 $\pm$ 1,61	0,82	2,18	

\* Los datos son la media de dos experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar de la media.

Tales resultados sugieren que la PM inhibe fuertemente las reacciones de entrecruzamiento proteico asociadas a las etapas avanzadas de la RM. Además, comparando el comportamiento del inhibidor con ambos carbohidratos, se detectó una mayor inhibición en el caso de la reacción con Tag, particularmente a 40 °C (Tabla R5). Estos resultados suponen la primera evidencia de que la PM inhibe eficientemente la formación de agregados “post-Heyns” tras la glicación proteica con una cetosa.

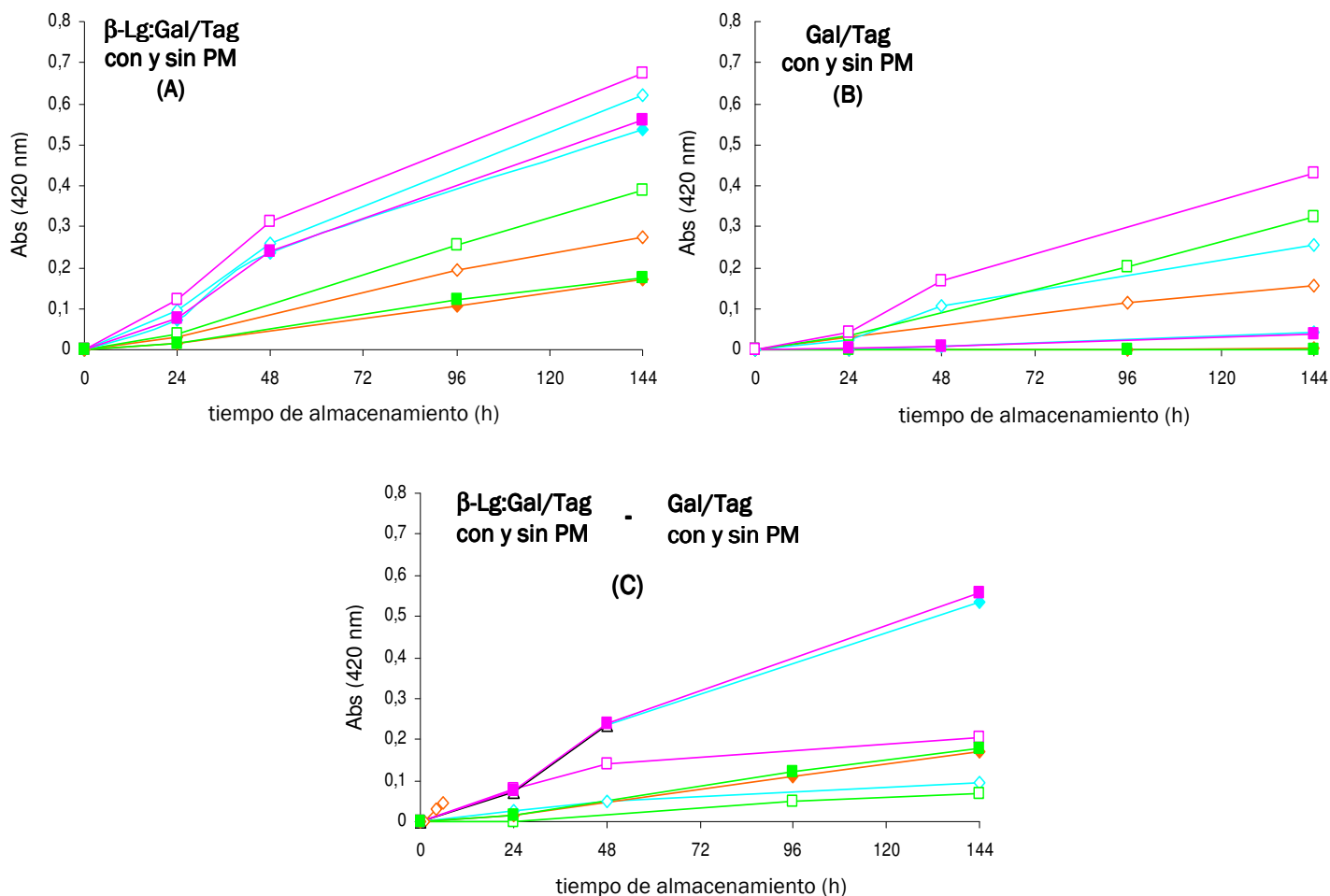
En estudios llevados a cabo con colágeno y ribonucleasa A, bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura, se describieron resultados similares con otros inhibidores de las etapas avanzadas de la RM, tales como la aminoguanidina (Brownlee y col., 1986) y la D-penicilamina (McPherson y col., 1988). En estos casos la inhibición de la agregación proteica fue atribuida a la interacción entre el grupo NH<sub>2</sub> de los inhibidores y los intermediarios carbonilo altamente reactivos, precursores de los compuestos agregados formados durante las etapas avanzadas y finales de la RM. Además, de acuerdo con Adrover y col. (2005, 2007, 2009), algunos de los productos de degradación de la base de Schiff resultante de la interacción PM-aldosa poseen grupos carbonilo libres que podrían también interaccionar con los grupos NH<sub>2</sub> libres de las proteínas, impidiendo reacciones posteriores de entrecruzamiento y, por tanto, la formación de agregados de elevado peso molecular.

#### **4.1.3.2.2 Medida del pardeamiento no enzimático**

En cuanto al efecto de la PM sobre el desarrollo de color, contrariamente a lo que cabía esperar, la absorbancia a 420 nm de los glicoconjugados ( $\beta$ -Lg:Gal/Tag) obtenidos tras la incubación en presencia de PM fue mayor que la de los glicoconjugados ( $\beta$ -Lg:Gal/Tag) sin PM, con ambos carbohidratos y a ambas temperaturas, tal y como se observa en la Figura R18 (A).

A continuación, con el fin de esclarecer esta contradicción, se decidió medir la absorbancia a 420 nm de los carbohidratos Gal y Tag incubados con PM en ausencia de  $\beta$ -Lg, bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura (Figura R18 (B)). Estas muestras presentaron un desarrollo de color mucho mayor comparado con el de los azúcares incubados en ausencia de PM, lo cual podría ser atribuido a la formación de compuestos coloreados resultantes de la degradación de los aductos PM-Gal/Tag. Asimismo, las muestras Gal+PM desarrollaron una absorbancia a 420 nm mayor que las muestras

Tag+PM, confirmando la mayor reactividad de la aldosa (Gal) que la cetosa (Tag) con el grupo amino de la PM, previamente observada.



**Figura R18.** Evolución de la absorbancia a 420 nm de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag con y sin PM (A), de la Gal/Tag con y sin PM (B) y de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag con y sin PM, sustrayéndose la absorbancia debida a la interacción PM-carbohidrato (C). [A - B = C].  $\square$   $\beta$ -Lg:Gal o Gal + PM 50°C;  $\diamond$   $\beta$ -Lg:Tag o Tag + PM 50°C;  $\square$   $\beta$ -Lg:Gal o Gal + PM 40°C;  $\diamond$   $\beta$ -Lg:Tag o Tag + PM 40°C;  $\blacksquare$   $\beta$ -Lg:Gal o Gal 50°C;  $\blacklozenge$   $\beta$ -Lg:Tag o Tag 50°C;  $\blacksquare$   $\beta$ -Lg:Gal o Gal 40°C;  $\blacklozenge$   $\beta$ -Lg:Tag o Tag 40°C.

Finalmente, para obtener la absorbancia a 420 nm correspondiente únicamente a los compuestos coloreados formados durante las etapas avanzadas y finales de la glicación de la  $\beta$ -Lg con Gal y Tag en presencia de PM, se calculó la diferencia entre la absorbancia a 420 nm de los conjugados obtenidos en presencia de PM y la de los complejos resultantes

de la interacción entre la PM y los carbohidratos. El resultado se muestra en la [Figura R18 \(C\)](#). Como se puede observar, el desarrollo de color en los conjugados incubados con PM fue menor que el de los conjugados incubados en ausencia de PM, demostrándose, por tanto, el efecto inhibitor de ésta sobre el avance de las etapas finales de la RM. Recientemente, Arribas-Lorenzo y Morales (2009), observaron también este efecto inhibitor de la PM sobre las etapas finales de la RM, concretamente sobre la formación de acrilamida, en un sistema modelo de asparagina-glucosa en solución. Estos autores atribuyeron tal efecto a la capacidad de la PM para atrapar los compuestos coloreados y precursores derivados de la degradación de los azúcares durante la RM.

### ***Conclusiones parciales***

Los resultados mostrados indican que la PM compite con los grupos amino libres de la  $\beta$ -Lg por el grupo carbonilo de la Gal/Tag, inhibiendo o retrasando ligeramente la formación de la base de Schiff y, por tanto, de los correspondientes compuestos de Amadori y de Heyns durante las etapas iniciales de la RM. Además, en estados más avanzados de la reacción, la PM previno más notablemente las reacciones de entrecruzamiento y, por tanto, la formación de agregados tras la glicación con ambos carbohidratos, particularmente con Tag a 40 °C.

Hasta nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se ha demostrado la utilidad de la PM para controlar la glicación en estado sólido de proteínas alimentarias y que se han estudiado los productos resultantes de la interacción entre la PM y una cetosa, concretamente la Tag. Los resultados de este trabajo suponen un avance en la glicosilación deliberada de proteínas vía RM, ya que el empleo de la PM, como un inhibidor de grado alimentario del avance de la RM, podría permitir la formación de neoglicoconjugados seguros para el consumo humano y con propiedades funcionales mejoradas, sin empeorar notablemente la calidad nutricional de las proteínas.



## **4.2 GLICOCONJUGADOS DE CASEINATO SÓDICO**

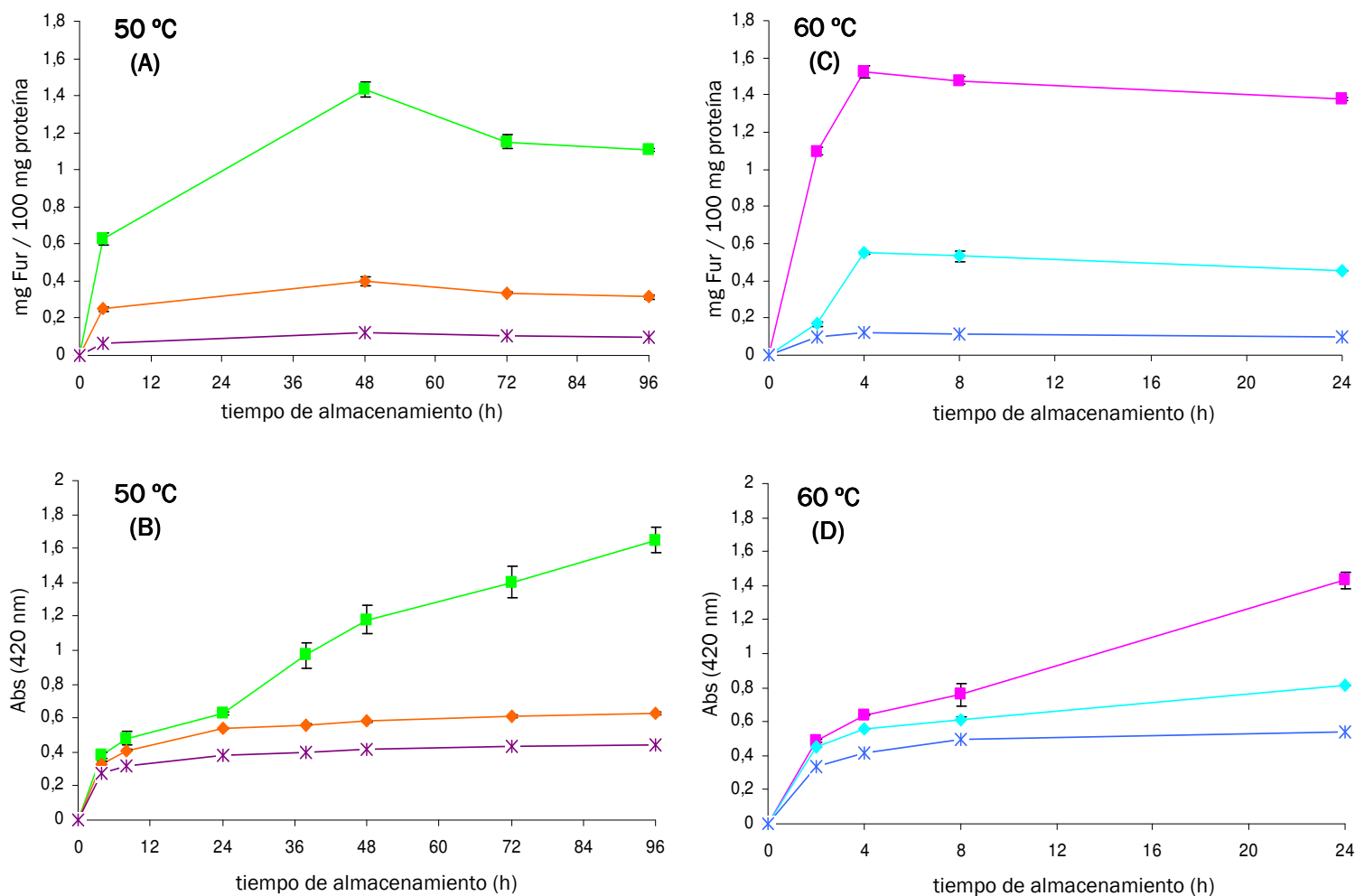
### **4.2.1 Determinación del avance de la reacción de Maillard**

#### **4.2.1.1 Etapas iniciales**

El compuesto de Amadori correspondiente a cada uno de los conjugados (SC:Gal/Lac/DX<sub>10</sub>) obtenidos tras la incubación a 50 y 60 °C durante 96 y 24 h, respectivamente, se determinó y cuantificó indirectamente por RP-LC-UV, como indicador de las etapas iniciales de la RM, a partir del derivado furoilo (furosina) formado tras la hidrólisis ácida ([Figura R19](#)).

Como se puede observar en las [Figuras R19 \(A\) y \(C\)](#), la glicación del SC con Gal a ambas temperaturas dio lugar a una mayor cantidad de furosina que la glicación con Lac y DX<sub>10</sub>, indicando que, durante las etapas iniciales de la RM, la Gal reaccionó en mayor medida y más rápidamente con los grupos ε-amino de los residuos de Lys que la Lac y el DX<sub>10</sub>, tal y como ocurrió anteriormente con la β-Lg. De forma que, el máximo nivel de furosina en el sistema SC:Gal fue 3 veces mayor que en el sistema SC:Lac y 12 veces mayor que en el sistema SC:DX<sub>10</sub> a 50 y 60 °C. Además, a partir de las 48 h de almacenamiento de la β-Lg con Gal a 50°C, la cantidad de furosina se redujo notablemente, sugiriendo que la degradación del compuesto de Amadori prevalecía sobre su formación.

Como era de esperar, la reactividad del azúcar hacia el SC fue galactosa > lactosa > dextrano. Asimismo, también se ha descrito que el DX reacciona pobremente con las proteínas debido al impedimento estérico ejercido por el elevado grado de ramificación de sus moléculas, lo cual dificulta la reacción del único grupo reductor de cada molécula de dextrano con los grupos amino libres de la proteína (Aminlari y col., 2005).



**Figura R19.** Evolución del contenido en furosina (A y C) y desarrollo de color (Abs 420 nm) (B y D) durante el almacenamiento durante 96 h a 50 °C y 24 h a 60 °C de los glicoconjugados —■— SC:Gal a 50 °C, —■— SC:Gal a 60 °C, —◆— SC:Lac a 50 °C, —◆— SC:Lac a 60 °C, —×— SC:DX<sub>10</sub> a 50 °C y —×— SC:DX<sub>10</sub> a 60 °C.

#### 4.2.1.2 Etapas avanzadas y finales

De acuerdo con el orden de reactividad anteriormente descrito, el mayor desarrollo de color, indicador del avance de la RM hacia etapas avanzadas y finales, se observó en el SC glicosilado con Gal (conjugados marrón oscuro), seguido por el SC glicosilado con Lac (conjugados marrón claro). Sin embargo, los conjugados SC:DX<sub>10</sub> presentaron un color amarillo claro, tanto a 50 como a 60 °C, incluso a tiempos prolongados de incubación, confirmando el limitado avance de la RM con el DX<sub>10</sub>, como consecuencia de la baja reactividad de este polisacárido. De acuerdo a lo anterior, como muestran las Figuras R19 (B) y (D), en el caso del SC glicosilado con Gal a 50 y 60 °C, la formación de compuestos pardos incrementó progresivamente a lo largo de toda la incubación, sugiriendo un extenso progreso de la RM hacia etapas muy avanzadas. El SC lactosilado también mostró un

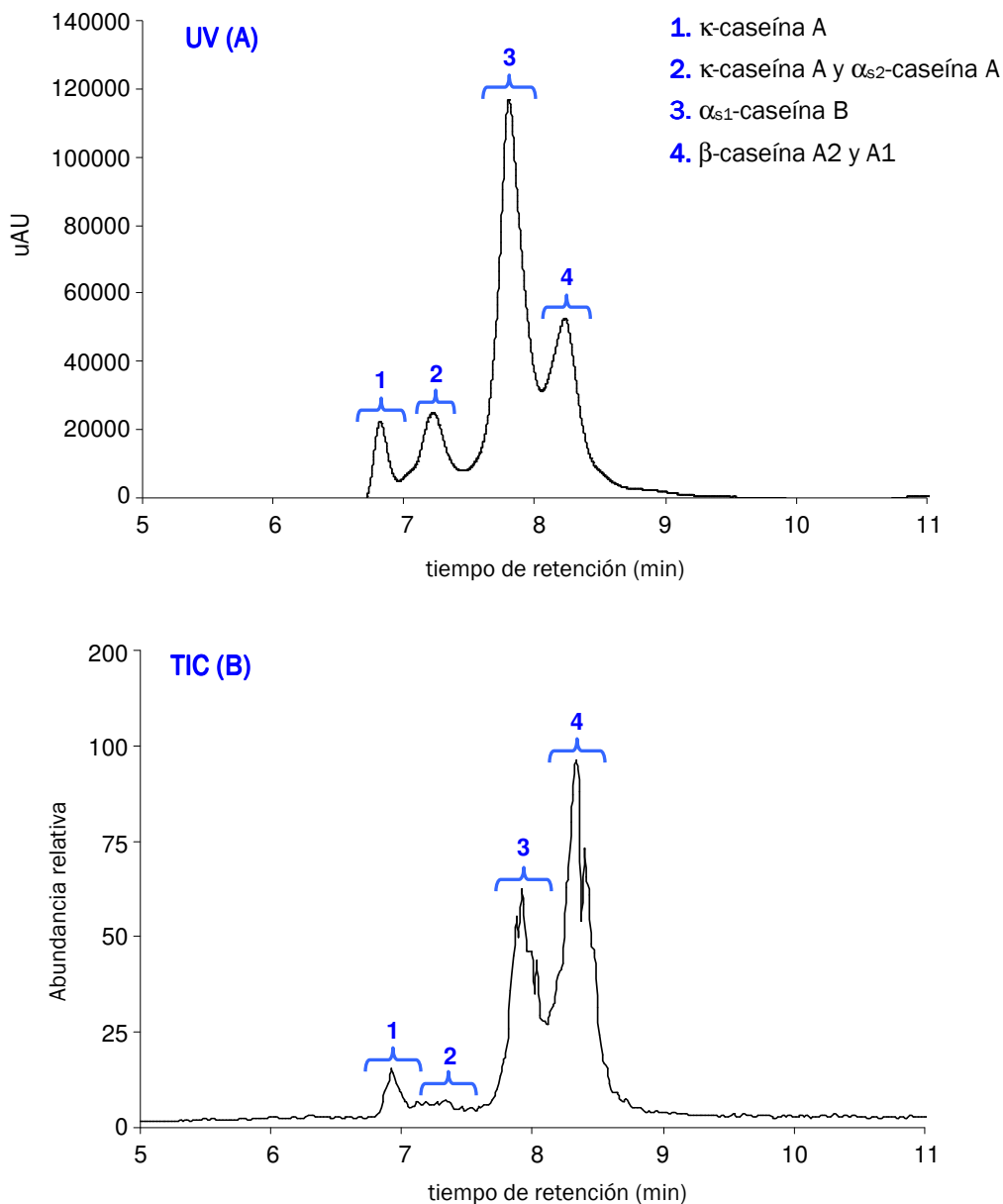
incremento en el desarrollo de color a lo largo de todo el almacenamiento, particularmente evidente a 60 °C, aunque mucho menos marcado que el del SC galactosilado. Los valores de pardeamiento más bajos se observaron, obviamente, para el SC glicado con DX<sub>10</sub> a ambas temperaturas.

## **4.2.2 Caracterización estructural de los glicoconjugados**

### **4.2.2.1 Análisis por espectrometría de masas: LC-ESI-MS**

El acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas con fuente de ionización de electrospray (LC-ESI-MS) ha demostrado ser una técnica resolutive en la determinación de masas moleculares, con gran aplicación en el estudio de estructuras primarias de proteínas y péptidos. Esto es posible debido a que la ionización por electrospray produce una enorme cantidad de iones con carga múltiple, lo que permite la determinación de elevadas masas moleculares, como pueden ser las de proteínas o péptidos de alto peso molecular. La ionización por electrospray, al realizarse a presión y temperatura ambiente, es extremadamente suave, consiguiendo iones quasi-moleculares, y evitando la ruptura de enlaces de tipo covalente, por muy delicados que sean. Todas estas ventajas, unidas a la separación previa por cromatografía de líquidos, ha hecho que este acoplamiento haya sido utilizado con éxito en el análisis de proteínas lácteas de diferente origen (Léonil y col., 1995; Trujillo y col., 2000; Ferranti y col., 2001). Asimismo, la utilidad de la LC-ESI-MS para la monitorización y caracterización de la glicación proteica está sobradamente demostrada (Yeboah y Yaylayan, 2001).

En nuestro caso, el análisis por LC-ESI-MS permitió la separación cromatográfica de las cuatro fracciones de caseína, tanto en forma nativa como glicada, en tan sólo 9 minutos. En la [Figura R20](#) se muestran los cromatogramas obtenidos con el detector ultravioleta (280 nm) y con el espectrómetro de masas (corriente total de iones o TIC) del SC nativo.



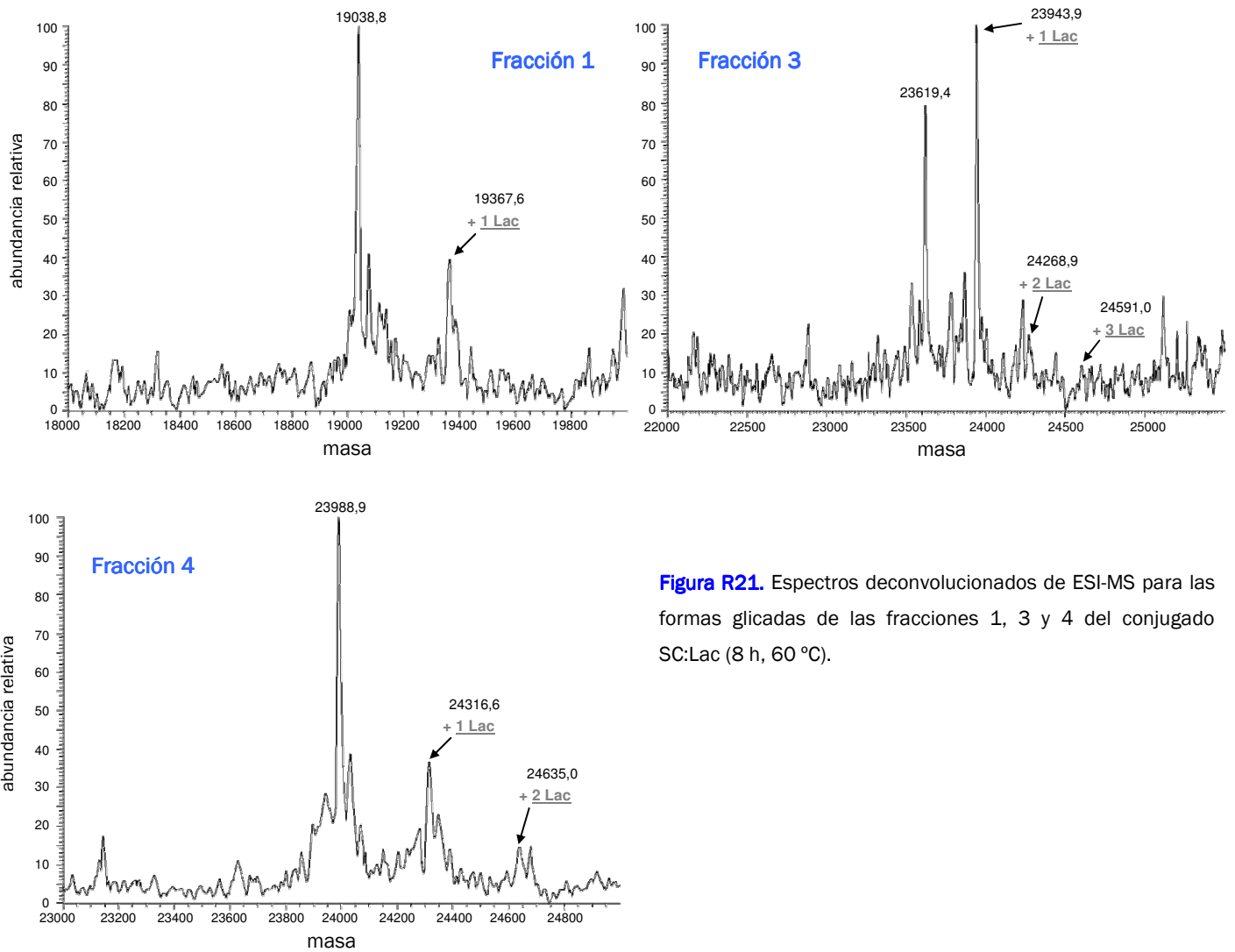
**Figura R20.** Cromatogramas UV (A) y de la corriente total de iones (TIC) (B) del SC nativo tras su análisis por LC-ESI-MS.

El análisis por ESI-MS se registró en modo negativo debido al alto contenido en serinas fosforiladas que presentan las caseínas. De este modo, se lograron identificar, en orden creciente de tiempo de retención, la variante genética A monofosforilada de la  $\kappa$ -caseína (**fracción 1**), la variante genética B monofosforilada de la  $\kappa$ -caseína y la variante genética A no fosforilada de  $\alpha_{s2}$ -caseína (**fracción 2**), la variante genética B octafosforilada de la  $\alpha_{s1}$  (**fracción 3**) y las variantes genéticas A2 y A1 pentafosforiladas de la  $\beta$ -caseína (**fracción 4**), cuyas masas moleculares fueron 19.038 (fracción 1), 19.008 y 25.223 (fracción 2), 23.619 (fracción 3) y 23.987 y 24.030 Da (fracción 4), respectivamente, de

acuerdo con los datos previamente publicados por Leónil y col. (1995) y van der Ven (2002) ([Figura R20 \(A\)](#)).

Comparando ambos perfiles, se observó cómo la fracción 4, correspondiente a la  $\beta$ -caseína, fue la que experimentó una mejor ionización, seguida de las fracciones 3 ( $\alpha_{s1}$ -caseína) y 1 ( $\kappa$ -caseína variante genética A). Mientras que la fracción 2, que contiene tanto a la  $\alpha_{s2}$ -caseína como a la variante genética B de la  $\kappa$ -caseína, apenas pudo detectarse por el espectrómetro de masas debido a su pobre ionización. La diferencia de intensidad de algunos picos encontrada entre ambos cromatogramas es debida a que la detección está basada en diferentes principios físicos. Así, el detector UV es sensible al número de grupos cromóforos que absorben a 280 nm, mientras que el espectrómetro de masas es sensible a una variedad de parámetros, tales como la composición del disolvente, el número de aminoácidos básicos, modificaciones post-traduccionales, las condiciones de desolvatación del spray, etc. (Leónil y col., 1995).

Con respecto al SC glicado con Gal y Lac, los espectros deconvolucionados correspondientes a cada una de las fracciones de caseína mostraron una mezcla heterogénea de glicofomas, las cuales diferían en el número de residuos de carbohidrato unidos a la cadena peptídica, tal y como se observa en la [Figura R21](#) para el conjugado SC:Lac (8 h, 60 °C), a modo de ejemplo. Recientemente, Oliver y col. (2009) observaron un comportamiento similar tras la glicación del SC con glucosa en soluciones acuosas. Además, en nuestro caso, la deconvolución de los espectros de masas no fue satisfactoria tras la glicación del SC con DX<sub>10</sub>, lo que podría atribuirse tanto a la baja eficiencia de ionización de los polisacáridos de alto peso molecular en ESI (Hsu y col., 2007), como al lento progreso de la RM usando DX<sub>10</sub> como azúcar reductor.



**Figura R21.** Espectros deconvolucionados de ESI-MS para las formas glicadas de las fracciones 1, 3 y 4 del conjugado SC:Lac (8 h, 60 °C).

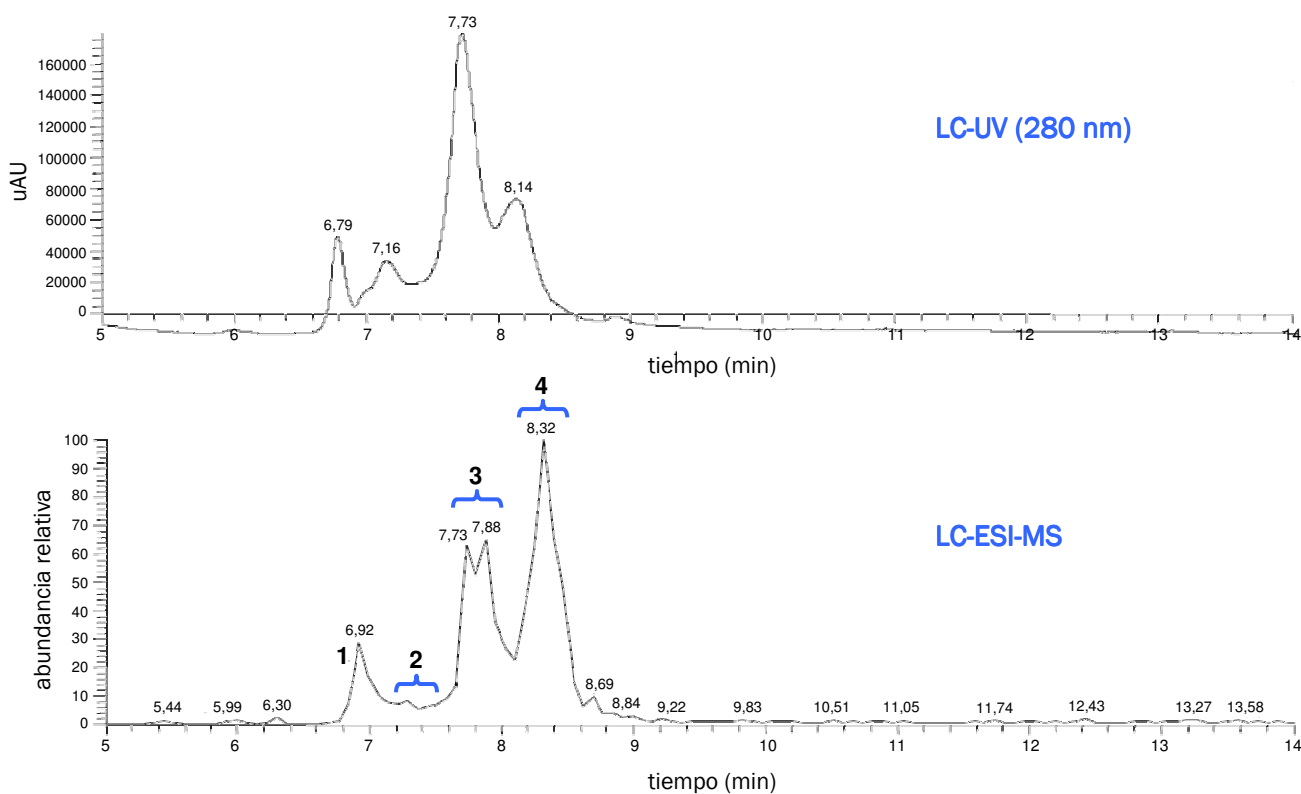
La **Tabla R6** recoge el número de moléculas de Gal y Lac unidas covalentemente a las principales fracciones de caseína ( $\kappa$ -,  $\alpha_{s1}$ - y  $\beta$ -caseínas) calculadas por LC-ESI-MS. Para facilitar la presentación de los resultados obtenidos, en esta tabla sólo se incluyó la variante genética más abundante de cada fracción de caseína, es decir, la variante genética A de la  $\kappa$ -caseína y la variante genética A2 de la  $\beta$ -caseína, ya que no se encontraron diferencias en los patrones de glicación de las diferentes variantes genéticas correspondientes a la misma fracción caseínica. Además, los espectros deconvolucionados correspondientes a la  $\alpha_{s2}$ -caseína glicada no fueron satisfactorios debido a la baja ionización exhibida por la fracción 2, lo cual impidió la estimación de su grado de glicación (**Figura R22**).

**Tabla R6.** Masas moleculares de la  $\kappa$ -caseína (variante genética A),  $\alpha_{s1}$ -caseína (variante genética B) y  $\beta$ -caseína (variante genética A2) y número de moléculas de Gal y Lac unidas al SC tras su glicación, estimado por LC-ESI-MS.

Temperatura (°C)	Muestra	Tiempo de incubación (h)	Masas moleculares (Da) observadas para la $\kappa$ -caseína A <sup>a</sup> (nº. de aductos de azúcar unidos)	Masas moleculares (Da) observadas para la $\alpha_{s1}$ -caseína B <sup>b</sup> (nº. de aductos de azúcar unidos)	Masas moleculares (Da) observadas para la $\beta$ -caseína A2 <sup>c</sup> (nº. de aductos de azúcar unidos)		
50	SC:Gal	4	19.038 (0 Gal)	23.619 (0 Gal)	23.987 (0 Gal)		
			19.200 (1 Gal)	23.781 (1 Gal)	24.149 (1 Gal)		
			19.362 (2 Gal)	23.943 (2 Gal)	24.311 (2 Gal)		
		48	24.105 (3 Gal)	24.267 (4 Gal)			
			19.038 (0 Gal)	23.619 (0 Gal)	23.987 (0 Gal)		
			19.200 (1 Gal)	23.781 (1 Gal)	24.149 (1 Gal)		
	19.362 (2 Gal)	23.943 (2 Gal)	24.311 (2 Gal)				
	19.524 (3 Gal)	24.105 (3 Gal)	24.473 (3 Gal)				
	24.267 (4 Gal)	24.429 (5 Gal)	24.635 (4 Gal)				
	SC:Lac	4	4	19.038 (0 Lac)	23.619 (0 Lac)	23.987 (0 Lac)	
				19.362 (1 Lac)	23.943 (1 Lac)	24.311 (1 Lac)	
					24.267 (2 Lac)	24.635 (2 Lac)	
48			19.038 (0 Lac)	23.619 (0 Lac)	23.987 (0 Lac)		
			19.362 (1 Lac)	23.943 (1 Lac)	24.311 (1 Lac)		
				24.267 (2 Lac)	24.635 (2 Lac)		
24.591 (3 Lac)							
72		4	4	19.038 (0 Lac)	23.619 (0 Lac)	23.987 (0 Lac)	
				19.362 (1 Lac)	23.943 (1 Lac)	24.311 (1 Lac)	
					24.267 (2 Lac)	24.635 (2 Lac)	
		96	4	4	19.038 (0 Lac)	23.619 (0 Lac)	23.987 (0 Lac)
					19.362 (1 Lac)	23.943 (1 Lac)	24.311 (1 Lac)
					24.267 (2 Lac)	24.635 (2 Lac)	
24.591 (3 Lac)	24.915 (4 Lac)	24.959 (3 Lac)					
60	SC:Gal	2	19.038 (0 Gal)	23.619 (0 Gal)	23.987 (0 Gal)		
			19.200 (1 Gal)	23.781 (1 Gal)	24.149 (1 Gal)		
			19.362 (2 Gal)	23.943 (2 Gal)	24.311 (2 Gal)		
		4	24.105 (3 Gal)	24.267 (4 Gal)	24.473 (3 Gal)		
			24.267 (4 Gal)	24.429 (5 Gal)	24.635 (4 Gal)		
			24.429 (5 Gal)	24.591 (6 Gal)	24.797 (5 Gal)		
	SC:Lac	2	2	19.038 (0 Lac)	23.619 (0 Lac)	23.987 (0 Lac)	
				19.362 (1 Lac)	23.943 (1 Lac)	24.311 (1 Lac)	

		24.267 (2 Lac)	24.635 (2 Lac)
4	19.038 (0 Lac) 19.362 (1 Lac)	23.619 (0 Lac) 23.943 (1 Lac) 24.267 (2 Lac)	23.987 (0 Lac) 24.311 (1 Lac) 24.635 (2 Lac)
8	19.038 (0 Lac) 19.362 (1 Lac)	23.619 (0 Lac) 23.943 (1 Lac) 24.267 (2 Lac) 24.591 (3 Lac)	23.987 (0 Lac) 24.311 (1 Lac) 24.635 (2 Lac)
24	19.038 (0 Lac) 19.362 (1 Lac)	23.619 (0 Lac) 23.943 (1 Lac) 24.267 (2 Lac) 24.591 (3 Lac) 24.915 (4 Lac)	23.987 (0 Lac) 24.311 (1 Lac) 24.635 (2 Lac) 24.959 (3 Lac)

<sup>a</sup> Forma monofosforilada; <sup>b</sup> forma octofosforilada; <sup>c</sup> forma pentaosforilada



**Figura R22.** Cromatogramas UV y de la corriente total de iones del sistema SC:Lac (8 h, 60 °C) tras su análisis por LC-ESI-MS.



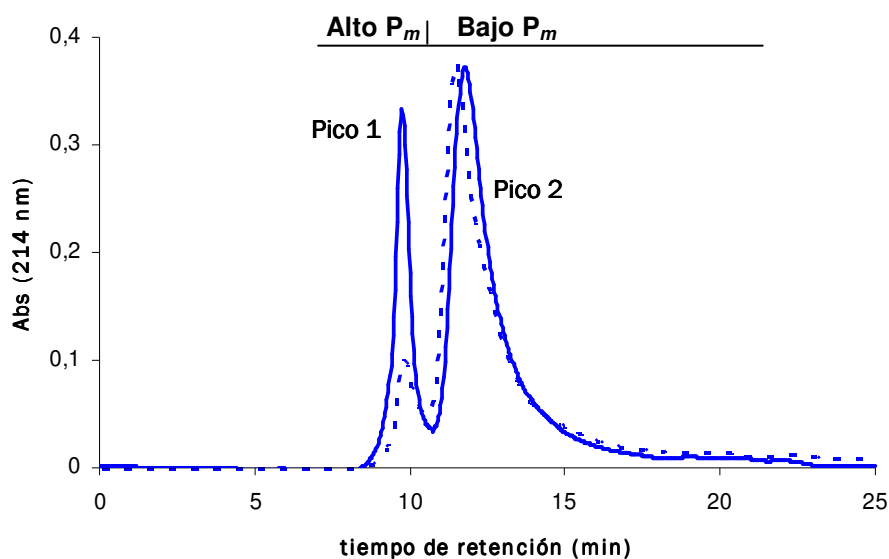
En términos generales, se unió un mayor número de moléculas de Gal y Lac a las fracciones de caseína más abundantes, es decir, a las  $\alpha_{s1}$ - y  $\beta$ -caseínas, siendo la  $\alpha_{s1}$ -caseína la que presentó una mayor reactividad. Datos recientes acerca de la reactividad de las caseínas con azúcares reductores durante la RM concuerdan con nuestros resultados (Scaloni y col., 2002). Tras la incubación del SC con Lac durante 96 h a 50 °C y durante 24 h a 60 °C se pudo detectar en ambos casos un máximo de 4, 3 y 1 moléculas de Lac unidas a las  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas, respectivamente. Con respecto a los conjugados SC:Gal, se detectaron un máximo de 5, 4 y 3 residuos de Gal unidos a las  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas, respectivamente, tras la incubación del SC durante 48 h a 50 °C, y 6, 5 y 3 residuos de Gal unidos a las  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas, respectivamente, tras el almacenamiento del SC durante 4 h a 60 °C (Tabla R6). Los espectros deconvolucionados correspondientes a los conjugados SC:Gal obtenidos tras los dos periodos de almacenamiento más largos (72 y 96 h a 50 °C; 8 y 24 h a 60 °C) fueron muy complejos y confusos, lo cual impidió la determinación de su grado de glicación. Esto se debió, probablemente, al elevado número de productos formados durante las etapas avanzadas de la RM, como consecuencia del rápido avance de la misma con este carbohidrato. Por tanto, teniendo en cuenta que las  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas contienen, respectivamente, 14, 11 y 9 residuos de Lys susceptibles de participar en la RM (Whitney, 1988; Aminlari y col., 2005), es muy probable que un mayor número de moléculas de Gal se unan al SC tras largos periodos de incubación.

#### **4.2.2.2 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)**

Con el objetivo de obtener más información acerca de los cambios estructurales producidos en el SC nativo como resultado de su interacción con Gal, Lac o DX<sub>10</sub>, se estudió el grado de polimerización del SC nativo, control incubado y glicado por SEC bajo condiciones no desnaturalizantes.

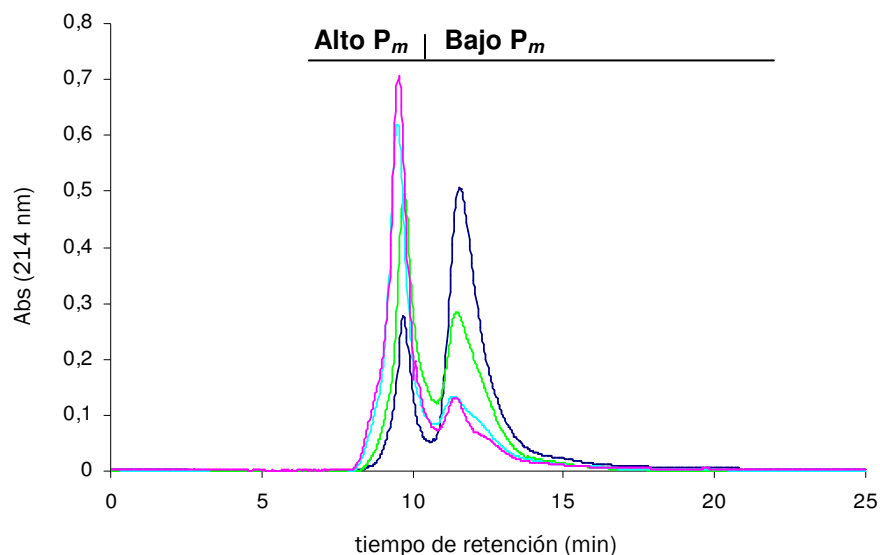
De acuerdo con varios estudios anteriores (Lynch y col., 1997; Lucey y col., 2000), el SC nativo eluyó como dos picos parcialmente resueltos, el primero de los cuales muy cerca del volumen muerto de la columna (Figura R23). Sin embargo, cuando el SC se trató con urea y DTT (condiciones desnaturalizantes), el pico 1 (fracción de alto  $P_m$ ) disminuyó substancialmente con respecto al pico 2 (fracción de bajo  $P_m$ ) (Figura R23), indicando que el primero estaba constituido por agregados de caseína de naturaleza covalente y no covalente; concretamente, y de acuerdo por Lucey y col. (2000), por polímeros de  $\kappa$ -caseína y algunos complejos de  $\alpha_{s1}$ - y  $\beta$ -caseína. Además, el pico 2 presentó una amplia distribución de tamaño desde un peso molecular relativo de ~ 80 kDa, al comienzo del

pico, a ~ 25-30 kDa, próximo al peso molecular teórico de los monómeros de caseína, en la cola del pico.



**Figura R23.** Cromatogramas obtenidos por SEC del  SC nativo y del  SC tratado con urea y DTT.

Como se observa en la [Tabla R7](#), la proteína control calentada mostró un ligero incremento de la fracción de alto  $P_m$  ( $AP_m$ ) con respecto al SC nativo, indicando la formación de formas agregadas minoritarias durante el calentamiento, probablemente debido a interacciones hidrofóbicas. Asimismo, los conjugados SC:Lac a 60 °C y SC:Gal a 50 y 60 °C mostraron un notable incremento de la fracción  $AP_m$  con respecto a la fracción de bajo  $P_m$  ( $BP_r$ ) con el tiempo de incubación ([Tabla R7](#)), siendo éste especialmente evidente en los derivados de Gal a 50 °C ([Figura R24](#)). Tales resultados indicaron que la glicación del SC, bajo estas condiciones de incubación, promueve su polimerización principalmente a través de entrecruzamientos covalentes, durante las etapas más avanzadas de la RM.



**Figura R24.** Perfil de elución obtenido por SEC del SC glicado con Gal a 50 °C durante — 4 h, — 48 h, — 72 h y — 96 h.

Los perfiles de SEC del SC glicado con Lac a 50 °C y con DX<sub>10</sub> a 50 y 60 °C fueron, en cambio, muy similares a los de la proteína sin glicar, confirmando el limitado avance de la RM hacia etapas avanzadas bajo estas condiciones de incubación, de acuerdo con los resultados derivados del análisis de furosina y de la evaluación del desarrollo de color (Figura R19, apartado 4.2.1). El mayor desarrollo de color y la rápida polimerización del SC glicado con Gal podrían ser debidos a la rápida degradación del correspondiente compuesto de Amadori, tagatosil-lisina, durante las etapas avanzadas de la RM, dando lugar a productos de la RM altamente reactivos y polímeros pardos de alto peso molecular. Kato y col. (1988) describieron una tendencia similar para la ovoalbúmina glicada con glucosa y lactosa a 50 °C. Estos autores mostraron que el limitado progreso de la RM en los conjugados con lactosa era debido al grupo galactopiranosido situado en el grupo hidroxilo del C<sub>4</sub> de la glucosa, el cual actúa inhibiendo o previniendo la degradación del compuesto de Amadori formado.

**Tabla R7.** Porcentaje de las fracciones de alto (AP<sub>m</sub>) y bajo (BP<sub>m</sub>) peso molecular (kDa) del SC nativo, control calentado y glicado con Gal, Lac y DX<sub>10</sub> a 50 y 60 °C, estimado por SEC bajo condiciones no desnaturalizantes.

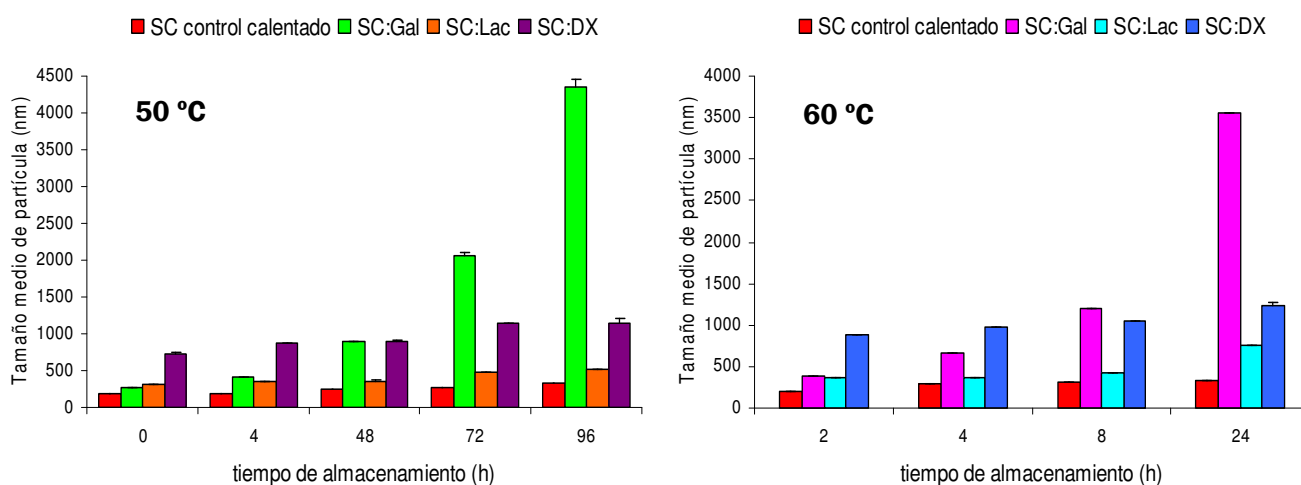
Temperatura (°C)	Muestra	Tiempo de incubación (h)	Fracción AP <sub>m</sub> (%)	Fracción BP <sub>m</sub> (%)	Relación AP <sub>m</sub> /BP <sub>m</sub>	
50	SC Nativo	0	23,99 ± 0,28*	76,01 ± 0,28	0,31	
	SC control calentado	4	24,39 ± 0,41	75,61 ± 0,41	0,32	
		48	30,71 ± 0,84	69,29 ± 0,84	0,44	
		72	30,89 ± 0,33	69,11 ± 0,33	0,45	
		96	32,17 ± 1,13	67,85 ± 1,13	0,47	
	SC:Gal	4	25,02 ± 0,65	74,98 ± 0,65	0,33	
		48	53,60 ± 0,85	46,40 ± 0,85	1,16	
		72	76,49 ± 0,49	23,51 ± 0,49	3,25	
		96	81,25 ± 0,71	18,75 ± 0,71	4,33	
	SC:Lac	4	24,58 ± 1,56	75,42 ± 1,56	0,33	
		48	33,35 ± 1,02	66,65 ± 1,02	0,50	
		72	35,13 ± 0,36	64,87 ± 0,36	0,54	
		96	37,22 ± 0,44	62,78 ± 0,44	0,59	
	SC:DX <sub>10</sub>	96	33,32 ± 0,23	66,68 ± 0,23	0,50	
	60	SC control calentado	2	23,82 ± 0,76	76,18 ± 0,76	0,31
			4	26,81 ± 0,88	73,19 ± 0,88	0,36
8			27,05 ± 1,41	72,95 ± 1,41	0,37	
24			30,59 ± 0,94	69,41 ± 0,94	0,44	
SC:Gal		2	25,97 ± 0,76	74,03 ± 0,76	0,35	
		4	33,13 ± 0,84	66,87 ± 0,84	0,50	
		8	39,82 ± 0,54	60,18 ± 0,54	0,66	
		24	78,40 ± 0,35	21,60 ± 0,35	3,63	
SC:Lac		2	24,44 ± 1,12	75,56 ± 1,12	0,32	
		4	27,85 ± 0,89	72,15 ± 0,89	0,39	
		8	36,52 ± 0,99	63,48 ± 0,99	0,57	
		24	39,82 ± 1,70	60,18 ± 1,70	0,66	
SC:DX <sub>10</sub>		24	33,90 ± 1,05	66,10 ± 1,05	0,51	

\* Los datos son la media de dos experimentos independientes ± desviación estándar de la media.

#### 4.2.2.3 Determinación del tamaño medio de partícula

Además de los análisis por SEC, se llevó a cabo un estudio sobre el tamaño medio de partícula de los glicoconjugados por espectroscopía de correlación de fotones, técnica que contribuye al estudio de las modificaciones estructurales asociadas a las etapas avanzadas de la RM. Como se observa en la **Figura R25**, el tamaño medio de partícula del SC control incubado no experimentó cambios importantes durante el almacenamiento a 50 y 60 °C con respecto al SC nativo. Asimismo, de acuerdo con los resultados derivados del

análisis por SEC (Tabla R7), el tamaño medio de partícula de los glicoconjugados SC:Gal a ambas temperaturas y SC:Lac a 60 °C aumentó notablemente a lo largo del almacenamiento, particularmente en el caso del SC galactosilado a partir de las 48 h de incubación a 50 °C, confirmando que la glicación del SC, bajo estas condiciones de incubación, promueve su polimerización durante las etapas más avanzadas de la RM. Finalmente, en el SC glicado con Lac a 50 °C y con DX<sub>10</sub> a ambas temperaturas, el tamaño medio de partícula tampoco se vio apenas modificado.



**Figura R25.** Variación del tamaño medio de partícula en función del tiempo de incubación para el SC control calentado y glicado con Gal, Lac y DX<sub>10</sub> a 50 y 60 °C.

#### 4.2.2.4 Determinación de la hidrofobicidad superficial de los glicoconjugados

A continuación, se determinó la hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ) del SC nativo, control calentado y glicado, mediante su capacidad de unión al ANS (Tabla R8). Para ello, se seleccionaron aquellas condiciones de incubación bajo las cuales se obtuvo, por un lado, la máxima formación del compuesto de Amadori y la mínima formación de agregados proteicos (SC:Gal 4 h a 60 °C; SC:Lac 8 h a 60 °C; y SC:DX<sub>10</sub> 8 h a 60 °C), y por otro lado, el máximo grado de glicación y de agregación proteica (SC:Gal 72 h a 50 °C; SC:Lac 24 h a 60 °C; y SC:DX<sub>10</sub> 96 h a 50 °C), con el fin de estudiar el efecto del avance de la RM.

**Tabla R8.** Hidrofobicidad superficial ( $S_o$ ), medida como fluorescencia del ANS, del SC nativo, control calentado y glicado con Gal, Lac y DX<sub>10</sub>.

Muestra	Condiciones de almacenamiento	Fluorescencia del ANS
SC nativo		23,9 ± 0,32*
SC calentado	4 h a 60 °C	22,8 ± 0,62
	72 h a 50 °C	18,3 ± 0,09
SC:Gal	4 h a 60 °C	18,9 ± 0,43
	72 h a 50 °C	9,0 ± 0,76
SC calentado	8 h a 60 °C	20,4 ± 0,24
	24 h a 60 °C	18,7 ± 0,36
SC:Lac	8 h a 60 °C	17,8 ± 0,95
	24 h a 60 °C	13,5 ± 0,36
SC calentado	8 h a 60 °C	20,4 ± 0,24
	96 h a 50 °C	15,1 ± 0,38
SC:DX <sub>10</sub>	8 h a 60 °C	16,1 ± 0,15
	96 h a 50 °C	12,9 ± 0,41

\* Los datos son la media de dos experimentos independientes ± desviación estándar de la media.

El SC nativo, por su estructura más abierta y flexible, debería presentar una hidrofobicidad superficial ( $S_o$ ) mayor que la  $\beta$ -Lg. Sin embargo, si comparamos el valor de  $S_o$  obtenido para el SC nativo (23,9 ± 0,32) (Tabla R8) con el de la  $\beta$ -Lg nativa (40,8 ± 1,15) (Tabla R3), llama la atención el hecho de que la  $S_o$  del SC sea menor que la de la  $\beta$ -Lg. De acuerdo con Nötzold y col. (1991) y con Wagner y Guéguen (1999), el bajo valor de  $S_o$  del SC posiblemente refleja las interacciones hidrofóbicas existentes entre los monómeros de caseína, quedando ocultos los residuos hidrofóbicos en el interior de la estructura.

Con respecto al efecto del tratamiento térmico sobre la  $S_o$  del SC, en la Tabla R8 se puede observar cómo la  $S_o$  de las muestras de SC control calentado disminuyó ligeramente con respecto a la del SC nativo tras la incubación a 50 y 60 °C. Además, el efecto del calentamiento sobre la  $S_o$  del SC fue menor que el observado anteriormente con la  $\beta$ -Lg (Tabla R3), lo cual podría atribuirse a la mayor estabilidad al calor de los monómeros de caseína, que apenas sufren modificaciones estructurales en este rango de temperatura (Hiller y col., 2008).

La glicación con Gal y Lac, en cambio, redujo notablemente la  $S_0$  del SC con el aumento del tiempo de incubación a ambas temperaturas, indicando importantes cambios estructurales en la configuración tridimensional de la proteína. Como para el caso de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg, estos resultados se deben posiblemente a la agregación proteica producida durante las etapas avanzadas de la RM (Tabla R7), quedando los residuos hidrofóbicos más ocultos, así como al bloqueo de los residuos de Lys y/o Arg por las moléculas de carbohidrato, a los cuales puede también unirse el ANS, como indicamos anteriormente para el caso de la  $\beta$ -Lg. En el caso de la glicación con DX<sub>10</sub>, la  $S_0$  del SC también disminuyó substancialmente a ambas condiciones de tiempo y temperatura ensayadas. Sin embargo, en este caso, debido al escaso progreso de la RM bajo estas condiciones y, por tanto, a la limitada modificación estructural del SC glicado con este polisacárido, la reducción observada en la  $S_0$  probablemente se deba al apantallamiento de las regiones hidrofóbicas presentes en la superficie del SC por el DX<sub>10</sub> covalentemente unido, debido a su elevado tamaño, en comparación con la Gal y la Lac.

### **Conclusiones parciales**

El análisis del contenido en furosina, la medida de la formación de AGEs y la determinación del pardeamiento, nos permitió estudiar la influencia del peso molecular del azúcar reductor sobre el avance de la RM durante la formación de los glicoconjugados SC:Gal, SC:Lac y SC:DX<sub>10</sub>, observándose una reactividad mayor de la Gal, seguida por la Lac y el DX<sub>10</sub> y, consecuentemente, un avance más rápido de la reacción con este carbohidrato hacia los estados más avanzados. Asimismo, como cabía esperar, los resultados derivados del análisis de los conjugados de SC por LC-ESI-MS, SEC, espectroscopía electrónica de fotones y espectrofluorimetría (determinación de la hidrofobicidad superficial) indicaron que la glicación con Gal dio lugar a un mayor grado de glicación y de agregación proteica del SC, en comparación con la glicación con Lac y DX<sub>10</sub>.

Así, de acuerdo con los resultados obtenidos, las condiciones de glicación (tiempo y temperatura) más adecuadas para estudiar el efecto del grado de glicación y de agregación sobre la potencial funcionalidad de los glicoconjugados de Gal y Tag fueron, respectivamente, 24 h a 40 °C (condiciones bajo las cuales el número de aductos de carbohidrato unidos a la  $\beta$ -Lg difirió en mayor medida (14 de Gal por 3 de Tag)) y 48 h a 50 °C (condiciones que favorecieron la agregación proteica, sin comprometer en gran medida la solubilidad de los glicoconjugados resultantes).

## **PARTE II: FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA DE LOS GLICOCONJUGADOS**

Una vez conocidas de forma exhaustiva las características estructurales de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC, se procedió al estudio de la funcionalidad tecnológica de los mismos, con el fin de conocer su potencial aplicabilidad como ingredientes alimentarios.

### **4.3 PROPIEDADES REOLÓGICAS**

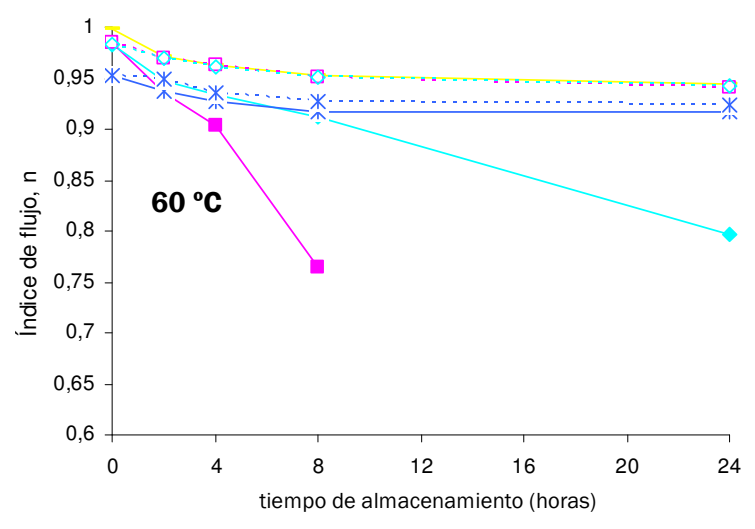
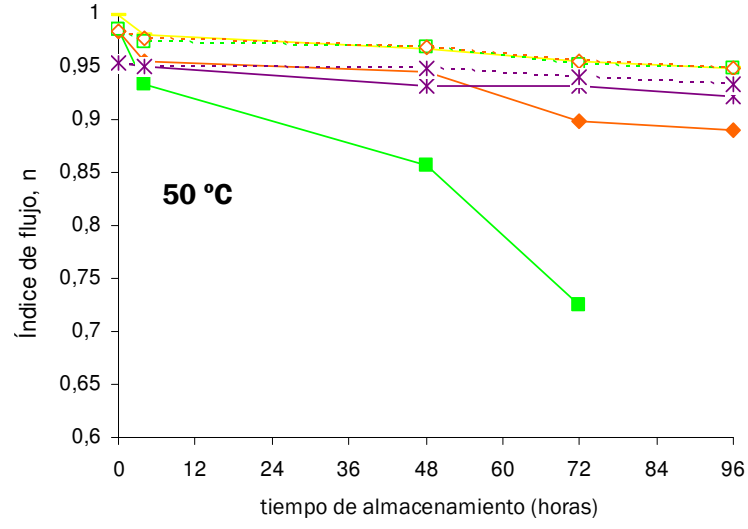
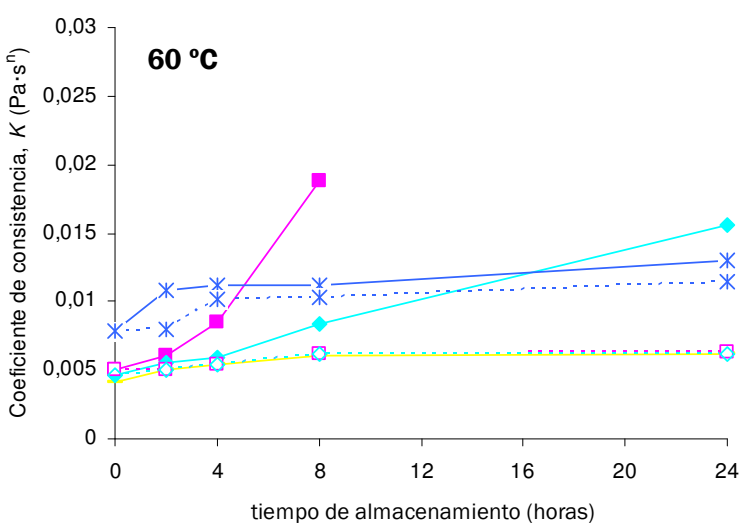
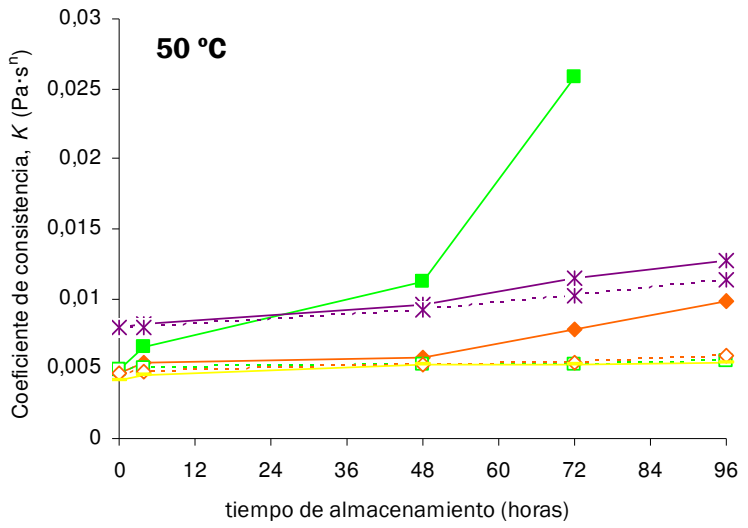
Numerosos estudios llevados a cabo con proteínas de distinta naturaleza, principalmente proteínas globulares, apoyan la hipótesis que sugiere que el entrecruzamiento y la agregación proteica que tienen lugar durante las etapas avanzadas de la RM tienen un importante impacto sobre sus propiedades reológicas (Hill y col., 1992; Armstrong y col., 1994; Cabodevilla y col., 1994; Oliver y col., 2006b). En este sentido, la glicación con carbohidratos de distinto peso molecular, como son la Gal, la Lac y el DX, con distinta reactividad en la RM, podrían dar lugar a glicoconjugados con propiedades reológicas.

En el presente trabajo, se determinaron las propiedades de flujo y viscoelásticas de los glicoconjugados obtenidos tras la incubación del SC con Gal, Lac y DX<sub>10</sub>, bajo las condiciones de reacción indicadas en la Tabla M8, las cuales, de acuerdo con los análisis de caracterización anteriores, dieron lugar a conjugados SC:Gal/Lac en estados iniciales (elevado grado de glicación y escasa agregación proteica) y avanzados (elevado grado de glicación y de agregación) de la RM, y a conjugados SC:DX<sub>10</sub> en estados iniciales de la reacción, con la máxima formación del compuesto de Amadori.

#### **4.3.1 Comportamiento de flujo y viscosidad**

La **Figura R26** muestra el coeficiente de consistencia,  $K$ , y el índice de comportamiento de flujo,  $n$ , del control calentado de SC+carbohidrato, así como del SC control calentado y glicado con Gal, Lac y DX<sub>10</sub>, obtenidos tras la incubación a 50 y 60 °C durante 96 y 24 h, respectivamente.



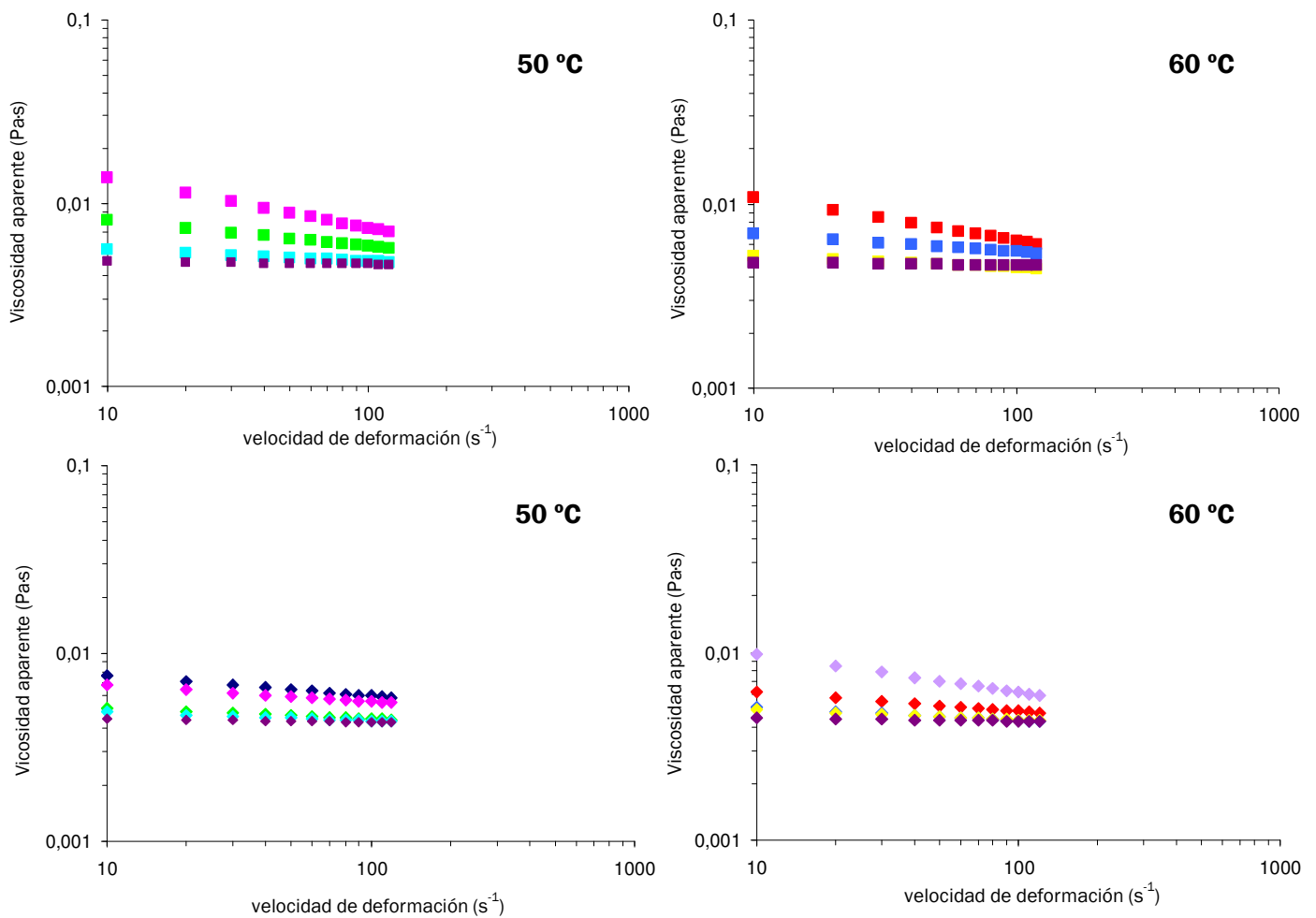


**Figura R26.** Cambios en el coeficiente de consistencia,  $K$ , y en el índice de flujo,  $n$ , del — SC control calentado, control calentado de SC + carbohidrato [SC+Gal a ---□--- 50 y ---□--- 60 °C; SC+Lac a ---◇--- 50 y ---◇--- 60 °C; SC+DX<sub>10</sub> a ---\*--- 50 y ---\*--- 60 °C] y glicado [SC:Gal a —■— 50 y —■— 60 °C; SC:Lac a —◆— 50 y —◆— 60 °C; SC:DX<sub>10</sub> a —\*— 50 y —\*— 60 °C], incubados a 50 °C durante 96 h y a 60 °C durante 24 h. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Los datos representan la media, siendo la desviación estándar en todos los casos < 0,01.

En el caso de los conjugados SC:DX<sub>10</sub>, no se observaron diferencias importantes entre las propiedades de flujo, en comparación con sus correspondientes controles, contrariamente a lo observado con los conjugados SC:GalLac (Figura R26), probablemente debido a la baja reactividad del DX<sub>10</sub> (Figura R19, apartado 4.2.1). Tales resultados indicaron que la alteración en las propiedades de flujo del SC glicado con DX<sub>10</sub>, a ambas temperaturas, se debió principalmente a las propiedades intrínsecas del polisacárido. Por ello, a partir de ahora, con objeto de simplificar, se comentarán para las propiedades reológicas del SC glicado únicamente con Gal y Lac.

Dentro del rango de velocidad de deformación aplicado (de 0 a 120 s<sup>-1</sup>), el flujo del SC nativo y control calentado fue muy próximo al Newtoniano ( $n \sim 1$ ) con unos coeficientes de correlación ( $R^2$ ) por encima de 0,993. Sin embargo, en el caso de los glicoconjugados se observó un incremento en el coeficiente de consistencia  $K$ , así como una evolución del comportamiento de flujo de Newtoniano a pseudoplástico ( $0 < n < 1$ ) con el tiempo de incubación ([Figura R26](#)). De modo que el comportamiento de flujo del SC glicado se ajustó mejor al modelo de la ley de potencial o de Ostwald ( $R^2 > 0,997$ ) que al modelo Newtoniano. Este efecto fue particularmente evidente en los derivados galactosilo, obtenidos tras el almacenamiento a 50 y 60 °C, y en los derivados lactosilo, obtenidos tras el almacenamiento a 60 °C. Así, las curvas de flujo de los glicoconjugados SC:Gal incubados durante 72 h a 50 °C y 8 h a 60 °C, y el sistema SC:Lac incubado 24 h a 60 °C presentaron un índice de comportamiento de flujo ( $n$ ) de 0,73 (vs. 0,96 del SC control calentado correspondiente), 0,76 (vs. 0,95 del SC control calentado correspondiente) y 0,80 (vs. 0,94 del SC control calentado correspondiente), y unos factores de consistencia ( $K$ ) 4,9, 3,1 y 2,5 veces mayor que los correspondientes controles, respectivamente, lo que sugiere una estructura más compacta en tales glicoconjugados, especialmente en los sistemas SC:Gal.

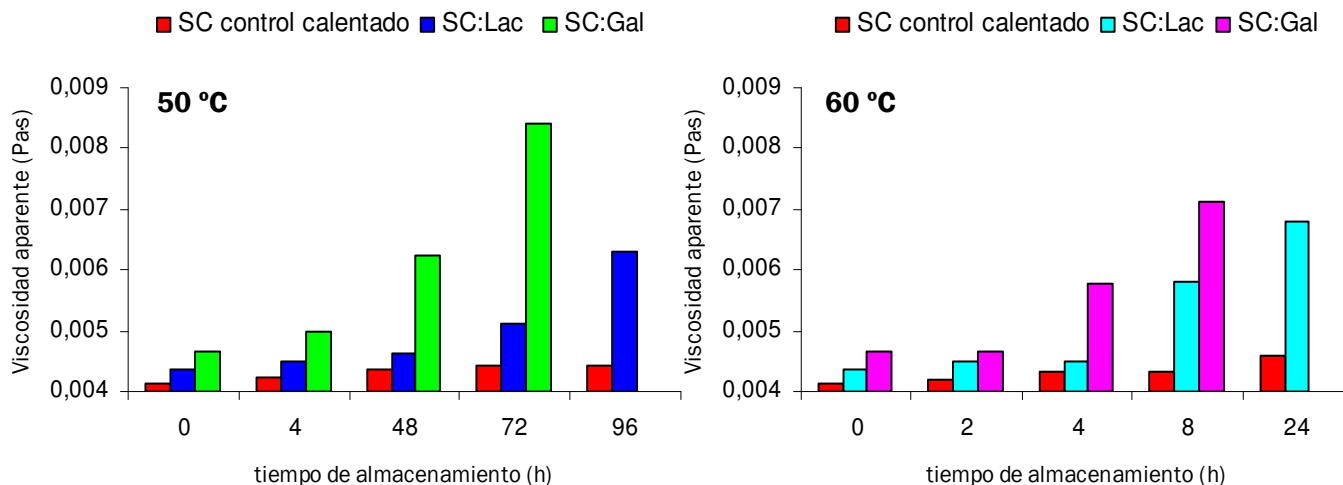
A continuación, con el objetivo de confirmar el comportamiento pseudoplástico observado en los glicoconjugados, se representó su viscosidad aparente, calculada tal y como se explicó en la sección de materiales y métodos (apartado 3.5.1), en función de la velocidad de deformación aplicada. Como se observa en la [Figura R27](#), la viscosidad aparente del control calentado SC + Gal/Lac a tiempo cero se mantuvo prácticamente constante a lo largo de todo el rango de velocidad de deformación estudiado, presentando, por tanto, un comportamiento de flujo muy próximo al Newtoniano. En cambio, en el caso de los glicoconjugados SC:Gal y SC:Lac, la viscosidad disminuyó con el incremento de la velocidad de deformación a lo largo de todo el rango de aplicación, lo cual es característico de los fluidos pseudoplásticos. Además, de acuerdo con los resultados anteriores, la variación de la viscosidad en función de la velocidad de deformación, en orden decreciente, fue SC:Gal 50 °C > SC:Gal 60 °C > SC:Lac 60 °C > SC:Lac 50 °C. Estos resultados indican que la glicación con Gal alteró en mayor medida el comportamiento de flujo del SC que la glicación con Lac.



**Figura R27.** Variación de la viscosidad aparente con la velocidad de deformación para el SC nativo + carbohidrato [■ SC+Gal a t=0; ◆ SC+Lac a t=0] y SC glicado con Gal y Lac a 50 y 60 °C durante 96 y 24 h, respectivamente [SC:Gal a 50 °C □ 4, ■ 48 y ◆ 72 h; SC:Gal a 60 °C □ 2, ■ 4 y ◆ 8 h; SC:Lac a 50 °C □ 4, ◆ 48, ◆ 72 y ◆ 96 h; SC:Lac a 60 °C □ 2, ◆ 4, ◆ 8 y ◆ 24 h].

Asimismo, la viscosidad aparente del SC glicado aumentó notablemente con el tiempo de incubación, mientras que la viscosidad aparente del SC control calentado, aunque también se incrementó ligeramente, permaneció baja independientemente del tiempo de calentamiento (Figura R28). El mayor incremento en la viscosidad aparente se observó en el SC glicado con Gal a partir de las 48 h de incubación a 50 °C, presentando una viscosidad 2 veces mayor que la del SC control calentado a las 72 h. Asimismo, la incubación con Gal y Lac a partir de las 2 y 4 h de incubación a 60 °C, respectivamente, también resultó en un incremento notable de la viscosidad aparente con respecto al SC control (Figura R28). Debido a la mayor reactividad de la Gal y al rápido progreso de la RM con este carbohidrato en comparación con la Lac, los complejos SC:Gal obtenidos tras el almacenamiento a 50 y 60 °C durante 96 y 24 h, respectivamente, dieron lugar a

dispersiones con polímeros pardos altamente insolubles (“partículas insolubles”), que interferían en la medida del reómetro, siendo imposible determinar su viscosidad.



**Figura R28.** Efecto de la glicosilación vía RM sobre la viscosidad aparente del SC glicado con Gal y Lac a 50 y 60 °C.

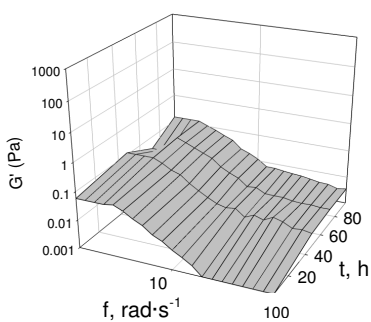
Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Oliver y col. (2006b), en un estudio en el que glicaron el SC con glucosa, ribosa, fructosa, lactosa y fructooligosacáridos (inulina) con el objetivo de estudiar la viscosidad de los glicoconjugados resultantes. Estos glicoconjugados mostraron un comportamiento de flujo no Newtoniano así como una viscosidad mayor que la del SC sin modificar. Sin embargo, estos autores no investigaron la viscoelasticidad de tales glicoconjugados, lo cual es necesario para evaluar su capacidad para formar geles y caracterizar completamente su comportamiento reológico. Por ello, en el presente trabajo se llevó a cabo un estudio del comportamiento viscoelástico de los glicoconjugados de SC, con el fin de profundizar en el conocimiento de los factores determinantes de la textura y potencial aceptabilidad del alimento al que podrían añadirse dichos glicoconjugados como agentes espesantes o gelficantes. Los resultados se muestran a continuación.

#### 4.3.2 Propiedades viscoelásticas

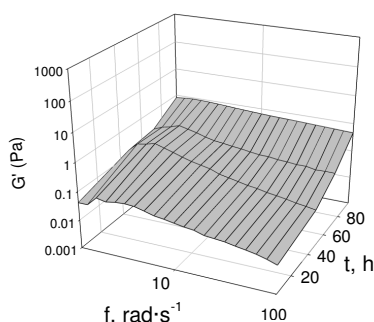
Para la determinación de las propiedades viscoelásticas de los glicoconjugados se llevó a cabo un ensayo dinámico oscilatorio, monitorizando los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) como respuesta a la deformación dinámica aplicada. La **Figura R29** muestra la

variación del módulo  $G'$  en función de la frecuencia ( $f$ ,  $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y del tiempo de incubación de los glicoconjugados. El valor de  $G'$  del SC control calentado a 50 y 60 °C permaneció bajo y constante a lo largo de todo el periodo de almacenamiento ( $G' < 0,1$ ), de forma similar a lo que ocurrió con el SC nativo (datos no mostrados). Sin embargo, el valor de  $G'$  de los glicoconjugados, en general, tendió a aumentar con el tiempo de incubación, es decir, con el avance de la RM. Asimismo, mientras que el valor de  $G'$  del SC glicado, especialmente con Gal, no mostró una fuerte dependencia de la frecuencia, el valor de  $G'$  del SC control calentado cayó notablemente, especialmente a partir de frecuencias  $> 10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  (Figura R29).

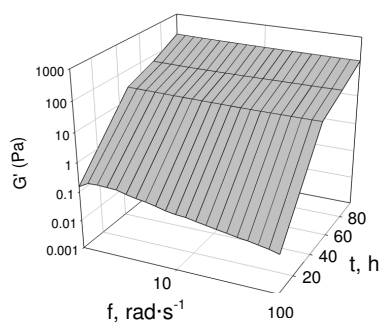
50 °C



SC control calentado

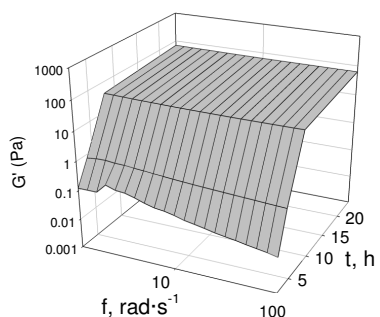
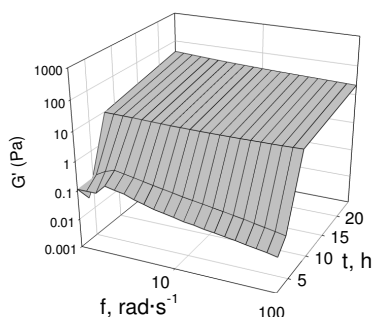
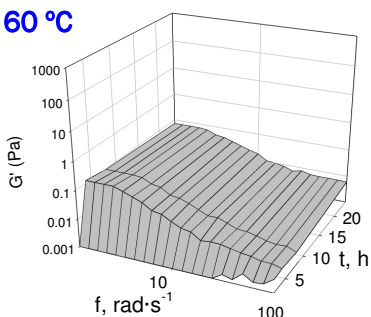


Conjugados SC:Lac



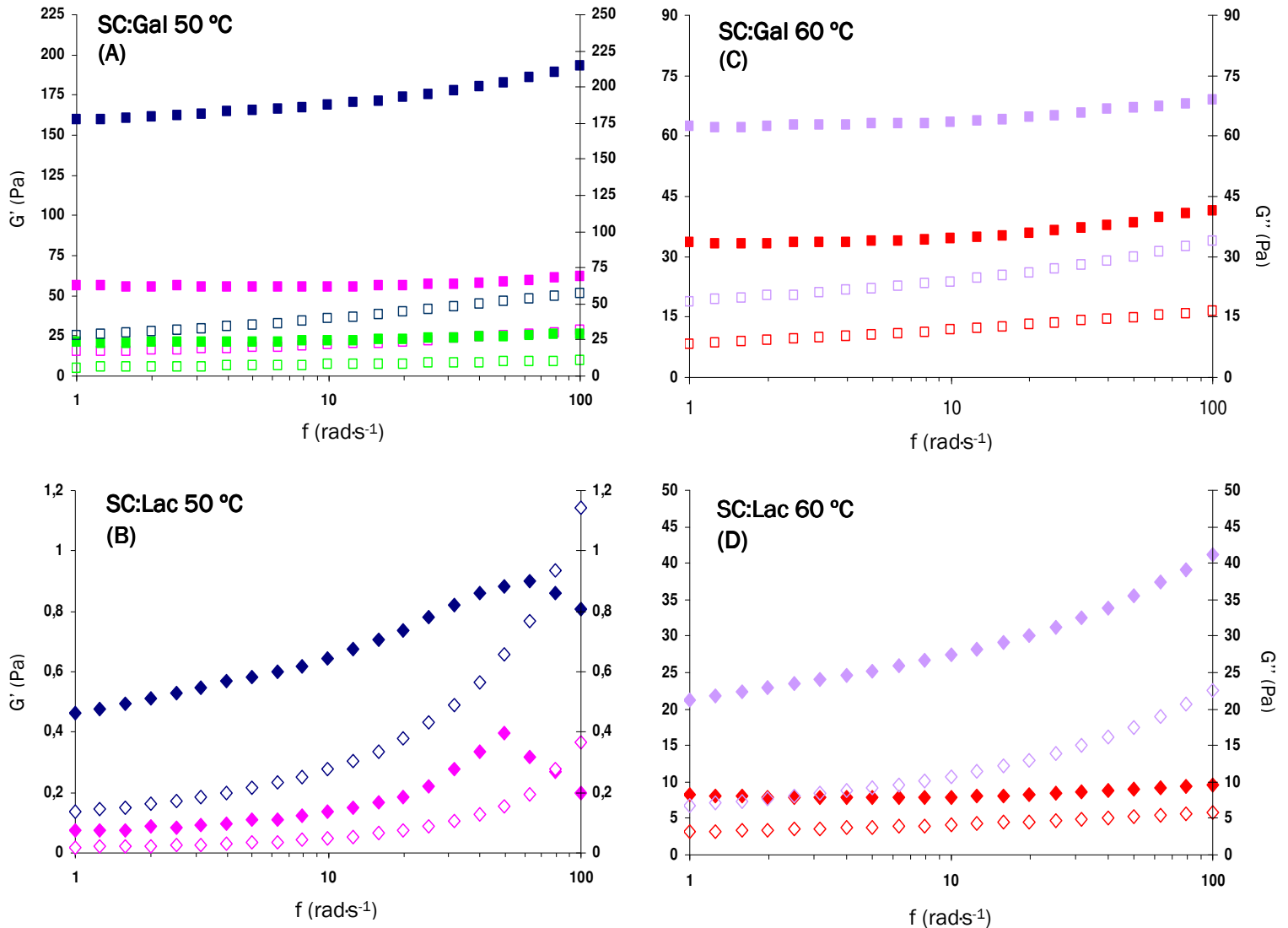
Conjugados SC:Gal

60 °C



**Figura R29.** Variación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) en función de la frecuencia aplicada ( $f$ ,  $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y del tiempo de almacenamiento ( $t$ , h) para el SC control calentado y glicado con Gal y Lac, incubado durante 96 h a 50 °C y durante 24 h a 60 °C.

A tiempos de incubación cortos, el comportamiento viscoelástico de los glicoconjugados (SC:Gal 4 h a 50 °C; SC:Gal 2 y 4 h a 60 °C; SC:Lac 4 y 48 h a 50 °C; SC:Lac 2 y 4 h a 60 °C) se caracterizó por un módulo  $G''$  mayor que el  $G'$  (Figura R30), el cual se mantuvo en valores muy bajos, próximos a cero ( $1 > G' > 0$ ), y prácticamente constante a lo largo de todo el rango de frecuencia estudiado (Figura R29), típico de soluciones viscosas. Este flujo viscoso es característico de fluidos Newtonianos o ligeramente pseudoplásticos, confirmando los resultados derivados del estudio del comportamiento de flujo para estos glicoconjugados.



**Figura R30.** Dependencia de los módulos  $G'$  (símbolo cerrado) y  $G''$  (símbolo abierto) de la frecuencia ( $f$ ,  $\text{rads}^{-1}$ ) aplicada para los glicoconjugados. SC:Gal a 50 °C ■ 48, ■ 72 y ■ 96 h (A); SC:Gal a 60 °C ■ 8 y ■ 24 h (C); SC:Lac a 50 °C ◆ 72 y ◆ 96 h (B); SC:Lac a 60 °C ◆ 8 y ◆ 24 h (D).

A tiempos largos de incubación, algunos de los glicoconjugados obtenidos presentaron un comportamiento viscoelástico característico de los geles. Esto es: i)  $G' > 1$ ; ii)  $G' > G''$ ; y iii) ambos,  $G'$  y  $G''$ , casi independientes de la frecuencia de oscilación transcurriendo en paralelo a lo largo de todo el rango de frecuencia aplicado. Este comportamiento fue claro en los sistemas SC:Gal, a partir de las 48 y 8 h de incubación a 50 y 60 °C, respectivamente (**Figura R30 (A) y (C)**), así como en los conjugados SC:Lac, a partir de las 8 h de incubación a 60 °C (**Figura R30 (D)**). El  $G'$  de estos glicoconjugados no mostró una fuerte dependencia de la frecuencia, observándose un ligero incremento a frecuencias  $> 50 \text{ rads}^{-1}$ , lo cual es indicativo de una estructura bien organizada y cohesiva, típica de un gel verdadero. Además, el  $G'$  de los conjugados SC:Gal fue mayor que el de los sistemas SC:Lac, observándose un menor efecto del incremento de la frecuencia sobre los primeros. Esto sugirió que los geles de SC glicado con Gal estaban constituidos por redes más elásticas que los de SC glicado con Lac. En los sistemas SC:Lac obtenidos tras la incubación a 50 °C durante 72 y 96 h (**Figura R30 (B)**), el  $G'$  fue también mayor que el  $G''$  durante prácticamente todo el rango de frecuencia; sin embargo, no los consideramos geles verdaderos, ya que  $G' < 1$ . En estos casos,  $G'$  y  $G''$  aumentaron durante todo el rango de frecuencia estudiado, pero a altas frecuencias el módulo  $G'$  cayó ligeramente, probablemente debido a los efectos de la inercia del reómetro. Estos resultados confirmaron un nivel de estructura interna notablemente mayor en los sistemas SC:Gal que en los sistemas SC:Lac, de acuerdo con los resultados derivados de la determinación de las propiedades de flujo.

### ***Conclusiones parciales***

El efecto de la conjugación covalente con DX<sub>10</sub> sobre las propiedades reológicas del SC se debieron principalmente a las propiedades intrínsecas del polisacárido y no a la glicosilación vía RM, debido a la baja reactividad del DX<sub>10</sub> con los grupos amino libres del SC y, por tanto, al limitado avance de la RM tanto a 50 como a 60 °C. En cambio, la glicación con Gal y Lac alteró notablemente las características de flujo y viscoelásticas del SC, obteniéndose glicoconjugados con un comportamiento de flujo pseudoplástico, una mayor viscosidad y un comportamiento viscoelástico intenso, especialmente tras los periodos de incubación más largos. Esto indica que la mejora observada en las propiedades reológicas del SC glicado, particularmente con Gal, probablemente se deba a la agregación proteica producida durante las etapas avanzadas de la RM a través de entrecruzamientos covalentes, en concordancia con varios estudios anteriores (Hill y col., 1992; Armstrong y col., 1994; Cabodevilla y col., 1994; Oliver y col., 2006b).

Los resultados aquí mostrados indican que el empleo de carbohidratos de distinto peso molecular permite el control de la velocidad y de la extensión de la RM, siendo factible la obtención de glicoconjugados con una mayor viscosidad y mejores propiedades gelificantes que el SC nativo. Además, esta mejora permite obtener dispersiones viscosas a una concentración de proteína mucho menor (3%, p/v) que la requerida para el SC nativo (10%, p/v; Oliver y col. 2006a). De este modo, los glicoconjugados de SC, especialmente los obtenidos con Gal a 50 °C durante 72 h, podrían constituir una alternativa más eficaz al SC nativo, como agente espesante y gelificante con un menor coste de producción.

#### **4.4 PROPIEDADES EMULSIONANTES**

Se sabe que la glicosilación vía RM, bajo condiciones controladas de reacción, favorece la difusión y la adsorción de proteínas de distinta naturaleza, incluido el SC, a la interfase aceite/agua (o/w), mejorando su capacidad para formar emulsiones (Hattori y col., 1997; Moreno y col., 2002; Fenaille y col., 2003; Oliver y col., 2006b; Fechner y col., 2007). En todos estos estudios, las emulsiones O/W se formaron con diferentes sistemas de emulsificación mecánica, siendo la homogeneización uno de los más utilizados. Sin embargo, estos procesos son poco eficientes, ya que la mayoría de la energía aplicada se disipa como calor (Behrend y Schubert, 2000; Dickinson, 2009). En este sentido, en los últimos años se ha venido prestando especial atención a los ultrasonidos de alta intensidad (HI-US), que se presentan, entre otras posibles aplicaciones, como una alternativa más eficiente a los sistemas de emulsificación convencionales (Soria y Villamiel, 2010). Esto se debe a que permiten obtener emulsiones muy finas y altamente estables con un gasto de energía relativamente bajo y menor cantidad de agente emulsionante, en comparación con las técnicas mecánicas empleadas habitualmente (Bondy y Söllner, 1935; Knorr y col., 2004; Hielscher, 2005; Cucheval y Chow, 2008; Camino y col., 2009).

A pesar de los trabajos existentes acerca del empleo de los HI-US como método de emulsificación, entre los distintos sustratos usados hasta ahora no se encuentran las glicoproteínas obtenidas deliberadamente vía RM. Es por ello por lo que, en la presente memoria, se planteó el estudio de las propiedades emulsionantes de los glicoconjugados de SC empleando los HI-US como sistema de emulsificación, previa optimización de las condiciones de trabajo por US.

Los glicoconjugados seleccionados para este estudio fueron aquellos que se obtuvieron en estados iniciales (SC:Gal 4h a 60 °C, SC:Lac 8 h a 60 °C y SC:DX<sub>10</sub> 8 y 96 h a



60 y 50 °C, respectivamente) y avanzados (SC:Gal 72 h a 50 °C y SC:Lac 24 h a 60 °C) de la RM, bajo las condiciones de reacción indicadas en la Tabla M8.

#### 4.4.1 Emulsificación convencional y por ultrasonidos

Con el objetivo de comparar la eficacia para formar emulsiones de los HI-US con la de un sistema de emulsificación convencional, en este caso, la homogeneización convencional con un Ultra-Turrax, se formaron emulsiones usando disoluciones de SC ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como agente emulsionante mediante ambas técnicas. El EAI de la emulsión homogeneizada con Ultra-turrax ( $77,61 \pm 4,89 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ) fue mucho menor que el de las emulsiones sonicadas ( $> 785 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ), independientemente de la amplitud y del tiempo de sonicación empleados. Este resultado podría atribuirse al menor tamaño de partícula de las emulsiones obtenidas por HI-US, ya que, de acuerdo con Mu y col. (2006), una mayor turbidez podría corresponder a un menor tamaño de partícula. De hecho, a simple vista se pudo observar una mayor homogeneización de las emulsiones sonicadas en comparación con las obtenidas con el Ultra-Turrax se podía apreciar a simple vista, como se observa en la [Figura R31](#). Según Canselier y col. (2002), para un sistema dado y una concentración de emulsionante fijada, las emulsiones sonicadas son mejores que las agitadas u homogeneizadas, probablemente debido a una mayor formación de espuma en el caso de la agitación mecánica clásica.



**Figura R31.** Aspecto de las emulsiones de SC inmediatamente después de su formación mediante homogeneización con el Ultra-turrax convencional o mediante ultrasonidos de alta intensidad (HI-US).

#### 4.4.2 Optimización del proceso de emulsificación por ultrasonidos

Una vez comprobado que la técnica de ultrasonidos es mucho más eficiente que la homogeneización mecánica convencional para formar emulsiones o/w con una disolución de SC nativo ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como agente emulsionante, nuestro objetivo fue optimizar las condiciones de trabajo por ultrasonidos.

La optimización de un proceso de emulsificación va desde la selección de un emulsionante adecuado, así como su concentración óptima, hasta el establecimiento de las condiciones óptimas de procesado, incluyendo temperatura, tiempo, intensidad del tratamiento, etc (Sánchez y col., 2000). Como se describió en la sección de Materiales y Métodos (apartado 3.6.2), para optimizar el proceso de emulsificación por HI-US se evaluó el efecto de tres variables experimentales, incluyendo la concentración de proteína nativa ( $C$ ,  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), la amplitud de la oscilación ( $A$ , %) y el tiempo de sonicación ( $t$ , s). La selección de las condiciones óptimas de ultrasonidos para maximizar el índice de actividad emulsionante (EAI) de las emulsiones se llevó a cabo usando un diseño experimental Box-Behnken. Los parámetros de la ecuación polinómica propuesta (Ecuación M6) se calcularon por regresión lineal múltiple y se analizó el significado estadístico de los coeficientes de regresión estimados. Tras la exclusión de los términos del modelo que no eran significativamente diferentes de cero ( $P > 0,10$ ), se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{EAI} = 926,036 - 560 C + 11,344 A + 88,327 C^2 - 2,665 CA \quad [\text{R1}]$$

De acuerdo al diseño experimental, la variable con mayor impacto sobre las propiedades emulsionantes fue la concentración de SC. Así, las emulsiones estabilizadas con disoluciones de SC a  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  presentaron valores significativamente más altos de EAI (de 785 a  $1287 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ) que los obtenidos a 2,5 y  $4,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de SC (de 128 a  $312 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ), independientemente de las otras dos variables experimentales estudiadas (Tabla R9). De acuerdo con Canselier y col. (2002), el tamaño de gota, que determina la formación y la estabilidad de la emulsión, se reduce cuando la concentración de emulsionante aumenta hasta alcanzar una meseta. En nuestro caso, es probable que esta meseta se alcanzara alrededor de una concentración de SC de  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , quedando SC no adsorbido a la interfase o/w a mayores concentraciones, es decir a 2,5 y  $4,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Además, en varios estudios se ha descrito que, mientras que la  $\beta$ -caseína, proteína mayoritaria en el SC junto con la  $\alpha_{s1}$ -caseína, se adsorbe, preferentemente, en emulsiones formadas con niveles relativamente bajos de SC, la  $\alpha_{s1}$ -caseína, menos hidrofóbica y tensioactiva que la  $\beta$ -

caseína (Mitchell y col., 1970; Dickinson y col., 1988), se adsorbe a la interfase, preferentemente, en emulsiones con una elevada concentración de SC, quedando niveles substanciales de SC sin adsorber en la fase acuosa (Srinivasan y col., 1996). Basándonos en esto, podemos elucubrar que la proteína adsorbida preferentemente en nuestras emulsiones a  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  podría ser la  $\beta$ -caseína, con una mejor capacidad emulsionante que la  $\alpha_{s1}$ -caseína.

**Tabla R9.** Diseño Box-Behnken con los valores obtenidos experimentalmente para los índices de actividad (EAI) y estabilidad ( $\Delta\text{EAI}$ , %) emulsionante de las emulsiones con SC ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como agente emulsionante.

Concentración de proteína ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Amplitud (%)	Tiempo de sonicación (s)	EAI ( $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\Delta\text{EAI}\%$
0,5	40	20	$1021,00 \pm 7,19^*$	$85,83 \pm 0,75$
4,5	40	20	$162,92 \pm 11,29$	$46,58 \pm 5,04$
2,5	20	20	$180,80 \pm 8,99$	$25,00 \pm 3,05$
4,5	60	40	$202,99 \pm 11,72$	$46,31 \pm 11,89$
4,5	40	60	$182,38 \pm 5,81$	$1,48 \pm 1,23$
0,5	40	60	$1181,75 \pm 14,08$	$87,66 \pm 0,84$
0,5	20	40	$784,86 \pm 24,95$	$80,18 \pm 0,24$
2,5	60	60	$312,32 \pm 34,26$	$32,22 \pm 6,63$
2,5	20	60	$233,49 \pm 19,61$	$51,81 \pm 0,70$
2,5	60	20	$273,60 \pm 16,02$	$25,49 \pm 5,48$
4,5	20	40	$127,55 \pm 1,22$	$37,11 \pm 9,90$
0,5	60	40	$1286,76 \pm 8,41$	$89,94 \pm 0,87$
2,5	40	40	$292,36 \pm 9,31$	$37,79 \pm 1,19$
2,5	40	40	$285,82 \pm 7,95$	$39,11 \pm 1,77$
2,5	40	40	$278,88 \pm 14,20$	$36,72 \pm 1,75$

\* Los datos son la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar de la media.

La amplitud de la oscilación es uno de los factores que más influyen en la eficiencia de transformación de energía en cavitación (Hielscher, 2005), fenómeno físico más importante que tiene lugar durante la emulsificación por HI-US. Éste consiste en la formación de burbujas en un líquido, seguida por el crecimiento, colapso e implosión de las mismas. De forma que el colapso cavitacional en la interfase, o cerca de ella, produce una disrupción eficiente de las gotas de aceite, disminuyendo la tensión superficial. A  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de SC, el valor más elevado de EAI ( $1286,76 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ) se observó para un tiempo de

sonicación de 40 s y para la máxima amplitud ensayada, 60%, probablemente debido a la creación más efectiva de cavitación que a un 20 o un 40% de amplitud. De forma similar, los mayores valores de EAI a mayores concentraciones de SC, 2,5 y 4,5 mg·mL<sup>-1</sup>, también se obtuvieron con una amplitud del 60% (Tabla R9).

Sin embargo, a pesar de los altos valores de EAI obtenidos, las emulsiones de SC fueron, en general, inestables bajo todas las condiciones estudiadas, con valores del índice de estabilidad emulsionante ( $\Delta$ EAI) oscilando entre un 25 y un 90% (Tabla R9). Por ello, y con el objetivo de mejorar la estabilidad de las emulsiones, se consideró el uso de la emulsificación en modo pulsado bajo las condiciones óptimas de concentración de SC (0,5 mg·mL<sup>-1</sup>), amplitud de la oscilación (60%) y tiempo de sonicación (40 s). La aplicación de dos pulsos de 20 s con un intervalo de 10 s entre ellos condujo a un leve incremento en el EAI (1329,52  $\pm$  0,98 vs. 1286,76  $\pm$  8,41 en modo continuo) y a un menor  $\Delta$ EAI% (6,65  $\pm$  0,15 vs. 89,94  $\pm$  0,87 en modo continuo), sugiriendo que la menor intensidad de energía del modo pulsado favorece el proceso de emulsificación. Una posible explicación para esto podría ser que la aplicación de una onda con un 60% de amplitud durante 40 s en modo continuo podría dar lugar a una cavitación ligeramente excesiva, con la consecuente fragmentación de las moléculas de caseína y, por tanto, pérdida de moléculas con capacidad para difundir hacia la interfase y adsorberse a ella (Abïsmail, 1999).

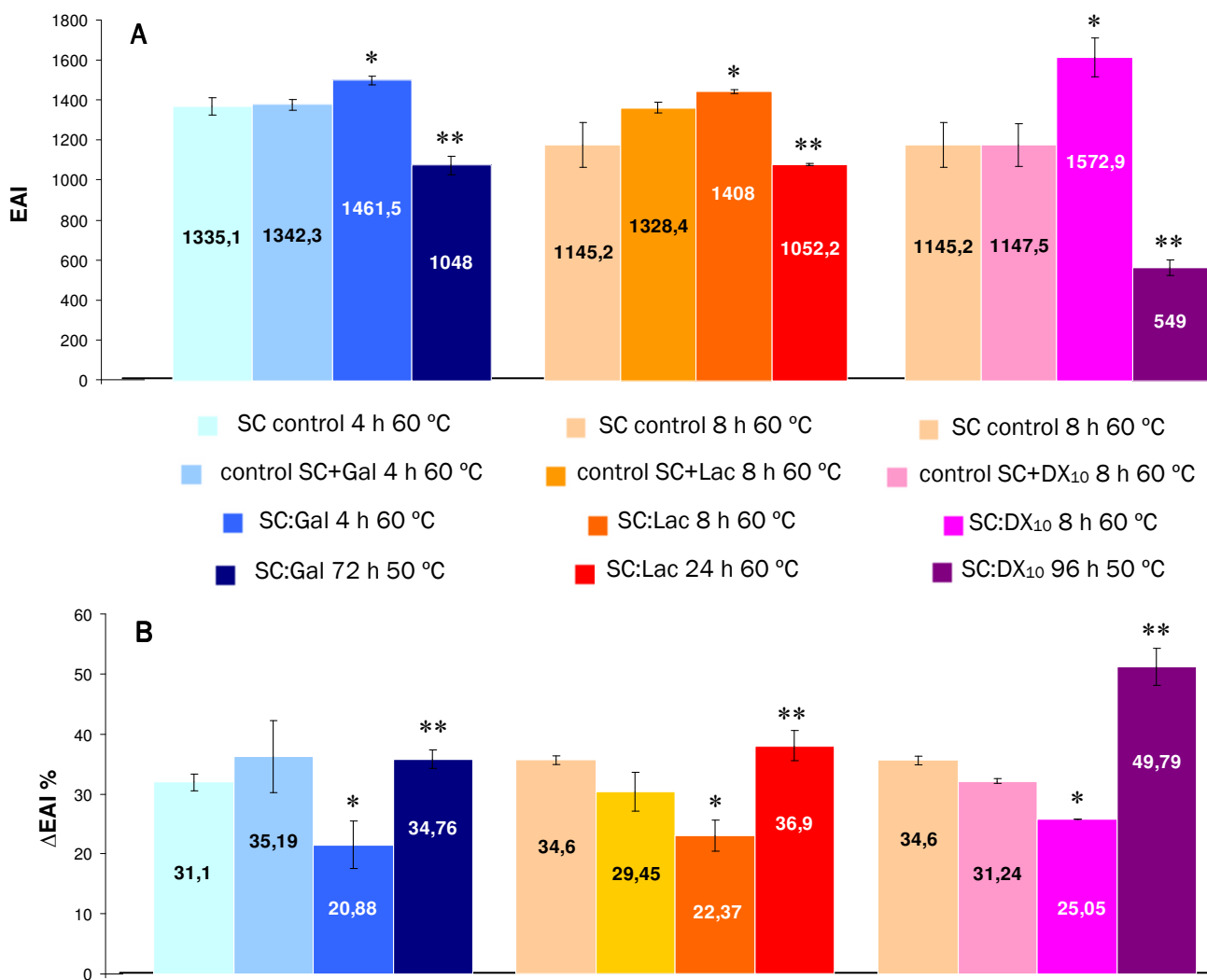
#### **4.4.3 Propiedades emulsionantes de los glicoconjugados de caseinato sódico**

Una vez puesto a punto el equipo de ultrasonidos y optimizadas las condiciones de trabajo (una concentración de SC de 0,5 mg·mL<sup>-1</sup>, una amplitud de oscilación del 60% y un tiempo de sonicación de 40 s, aplicado en dos pulsos de 20 s cada uno con un intervalo de 10 s entre ellos), se procedió a la formación de emulsiones o/w conteniendo SC glicosilado vía RM, como agente emulsionante, bajo tales condiciones.

##### **4.4.3.1 Efecto del tratamiento térmico**

El calentamiento a 60 °C durante 4 h (Figura R32 (A)) no pareció modificar notablemente la actividad emulsionante del SC control calentado con respecto a la del SC nativo (EAI = 1329,52 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>). Sin embargo, el SC control sometido a un tratamiento térmico más intenso (8 h a 60 °C) mostró un valor de EAI y una capacidad para estabilizar

emulsiones significativamente menor (valor de  $\Delta EAI$  más alto) (Figura R32 (B)) que el SC nativo. Estos resultados podrían deberse a la formación, durante el calentamiento, de algunas formas agregadas minoritarias a través de interacciones principalmente hidrofóbicas, tal y como observamos mediante el análisis por SEC (Tabla R7, apartado 4.2.2.2). De modo que la agregación del SC podría dificultar tanto su difusión como su adsorción a la interfase, factores determinantes en la capacidad de la proteína para formar y estabilizar emulsiones (Chobert y col., 1988b; Chevalier y col., 2001c).



**Figura R32.** Efecto del tratamiento térmico, del carbohidrato libre en solución y de la glicosilación vía RM con Gal, Lac y DX<sub>10</sub>, tanto en estados iniciales como avanzados, sobre el índice de actividad (EAI) (A) y estabilidad ( $\Delta EAI$ , %) (B) emulsionante del SC. Los datos representan la media de 3 determinaciones realizadas por triplicado y las barras de error indican la desviación estándar.

\* Indica diferencias significativas entre los conjugados en estados iniciales de la RM y sus controles correspondientes (control calentado y control calentado + carbohidrato) ( $P < 0,05$ ). \*\* Indica diferencias significativas entre los glicoconjugados en estados avanzados de la RM y los mismos en estados iniciales de la reacción ( $P < 0,05$ ).

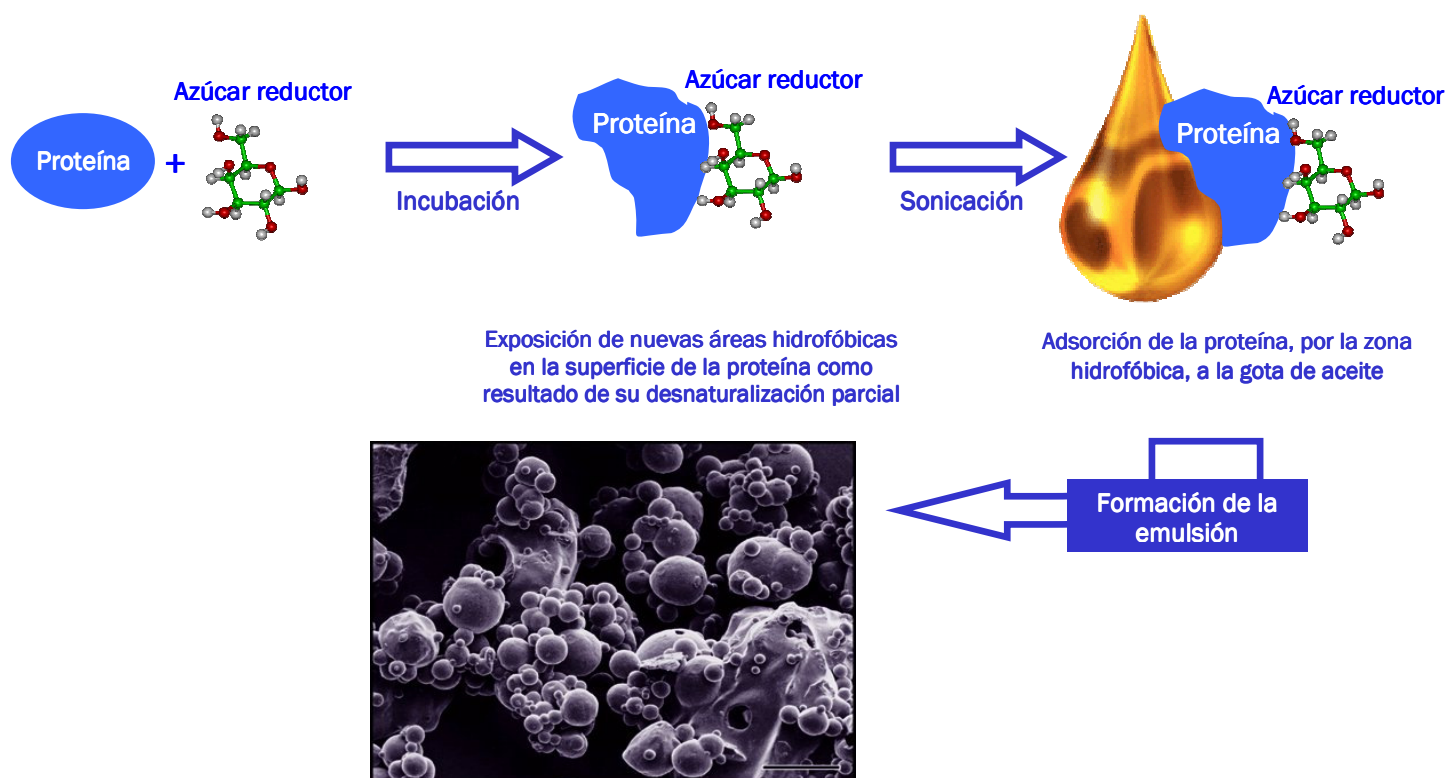
Con respecto a los controles calentados de SC + carbohidrato, la presencia de Lac en el medio mejoró el EAI del SC control calentado a 60 °C durante 8 h, no observándose ningún efecto notable de la presencia de Gal y DX<sub>10</sub> libres. Este hecho sugiere que la presencia de Lac produce un ligero incremento en la actividad superficial del SC. Antipova y col. (1999) observaron un efecto similar de la sacarosa, otro disacárido, sobre el comportamiento superficial del SC frente a la interfase aire-agua. Estos autores atribuyeron tales resultados al incremento en la hidrofobicidad superficial de la proteína, debido a la ligera disociación del SC como resultado de su interacción con la sacarosa en el medio acuoso durante la formación de la espuma.

#### **4.4.3.2 Efecto de la glicosilación vía reacción de Maillard**

##### ***4.4.3.2.1 Etapas iniciales***

La glicosilación durante las etapas iniciales de la RM resultó mejorar significativamente el EAI del SC, independientemente del carbohidrato empleado. Así, los conjugados SC:Gal (4 h, 60 °C), SC:Lac (8 h, 60 °C) y SC:DX<sub>10</sub> (8 h, 60 °C) presentaron unos valores de EAI mayores que los de sus correspondientes controles de SC calentado y SC calentado + carbohidrato (**Figura R32 (A)**), indicando que la mejora observada en la funcionalidad se debía a la conjugación covalente del SC con los carbohidratos y no al tratamiento térmico o a la presencia de carbohidrato libre en el medio.

La mejor actividad emulsionante del SC glicado bajo estas condiciones de incubación se podría atribuir a su mayor flexibilidad y mayor carácter anfifílico, como resultado de la exposición en la superficie de la proteína de nuevas áreas hidrofóbicas, así como de la hidrofiliidad aportada por los carbohidratos covalentemente unidos tras la glicación, lo cual favorece una adsorción más rápida y fuerte de la proteína a la interfase aceite/agua (Hattori y col., 1997; Darewicz y Dziuba, 2001) (**Figura R33**). En este sentido, a pesar de la limitada extensión de la RM entre el SC y el DX<sub>10</sub>, observada anteriormente (Figura R19, apartado 4.2.1), la glicación con este polisacárido a 60 °C durante 8 h condujo a un mayor incremento en el EAI del SC que la Gal y que la Lac (**Figura R32 (A)**), probablemente debido al mayor carácter hidrofílico del polisacárido (Dickinson, 2008).



**Figura R33.** Adsorción de la proteína glicada a la interfase aceite/agua durante la formación de la emulsión.

Asimismo, los glicoconjugados en estados iniciales de la RM también mostraron una mejora significativa en su capacidad estabilizadora de la emulsión ( $\Delta EAI\%$ ) con respecto a la del correspondiente SC control calentado y control calentado SC + carbohidrato (**Figura R32 (B)**).

En el caso de los sistemas SC:Gal y SC:Lac, la mejora observada en la estabilidad de las emulsiones podría atribuirse a (i) la reducción de las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de SC adsorbidas a la interfase de distintas gotas de aceite, debido a la pérdida de residuos de lisina disponibles (O'Connell y Foz, 1999), y (ii) a la mayor intensidad de las fuerzas de repulsión electrostáticas-estéricas entre las moléculas de SC glicado que entre las moléculas de SC sin glicar (Darewicz y Dziuba, 2001). Todo ello podría prevenir la coalescencia rápida y la floculación, dando lugar a emulsiones más estables con el SC glicado que sin modificar. El incremento en la estabilidad fue particularmente evidente en el caso de las emulsiones con SC galactosilado como agente emulsionante, probablemente debido a su mayor grado de glicación en comparación con el SC lactosilado (Tabla R6).

Por lo que se refiere a las emulsiones estabilizadas por el conjugado SC:DX<sub>10</sub>, la mejora en la estabilidad está probablemente relacionada con el mayor tamaño e hidrofiliidad del polisacárido, en comparación con la Gal y la Lac. Éste, orientado hacia la fase acuosa, crea una capa gruesa adicional sobre la superficie de la gota, la cual previene de la coalescencia y floculación por impedimento estérico (Shepherd y col., 2000; Fechner y col., 2007; Dickinson, 2009). Además, el DX<sub>10</sub> podría controlar la reología y estructura de la red de la fase continua, retardando la separación de fases y el cremado inducido por gravedad (Dickinson, 2008).

#### **4.4.3.2.2 Etapas avanzadas**

Los glicoconjugados en etapas avanzadas de la RM (SC:Gal 72 h a 50 °C; SC:Lac 24 h a 60 °C; y SC:DX<sub>10</sub> 96 h a 50 °C) mostraron una actividad y estabilidad emulsionantes significativamente menores que las de los conjugados en estados iniciales de la RM (**Figuras R32 (A) y (B)**), probablemente debido a la formación de agregados proteicos de elevado peso molecular durante las etapas avanzadas de la RM, especialmente en el caso del SC galactosilado (Tabla R7, apartado 4.2.2.2 y Figura R25, apartado 4.2.2.3), lo cual contribuye a disminuir la hidrofobicidad superficial del SC (Tabla R8, apartado 4.2.2.4), afectando a la velocidad de difusión de éste desde la fase continua hasta la interfase aceite/agua y ralentizando el proceso de reorientación de la proteína en la misma (Dickinson y Semenova, 1992). En el caso de la glicación con DX<sub>10</sub> bajo las condiciones más severas de incubación (96 h a 50 °C), las menores propiedades emulsionantes observadas se debieron, probablemente, a la menor hidrofobicidad superficial del SC glicado con este polisacárido (Tabla R8, apartado 4.2.2.4), como resultado del apantallamiento de las regiones hidrofóbicas del SC por el DX<sub>10</sub> covalentemente unido.

#### **Conclusiones parciales**

Estos resultados muestran que la técnica de ultrasonidos puede constituir una alternativa eficaz a la homogeneización convencional para la formación de emulsiones o/w con SC nativo como agente emulsionante. Además, el empleo, como agente emulsionante, de los glicoconjugados constituidos por SC y carbohidratos de distinto peso molecular en estados iniciales de la RM, en combinación con los HI-US como sistema de emulsificación, permite obtener emulsiones o/w más estables que las estabilizadas con el SC sin modificar.



## 4.5 PROPIEDADES INTERFACIALES Y ESPUMANTES

La utilización de la  $\beta$ -Lg y, especialmente, del SC, como agentes espumantes en ciertos alimentos se ve muy limitada, ya que la mayoría presentan un pH ácido, próximo al pI de la proteína, donde se produce una pérdida parcial de su carga neta, resultando en una reducción de su solubilidad y, por tanto, de su funcionalidad (Damodaran, 1996 y 1997b). Además, durante la mayoría de los procesos a los que se somete el alimento, las proteínas sufren tratamientos termomecánicos que pueden conducir a la desnaturalización y agregación de la proteína nativa y, consecuentemente, a la alteración de sus propiedades espumantes. En este sentido, resulta de interés el estudio sobre la relación existente entre las modificaciones estructurales que se producen durante la glicosilación de la  $\beta$ -Lg y del SC y su capacidad para formar y estabilizar espumas, especialmente a valores de pH próximos a su pI.

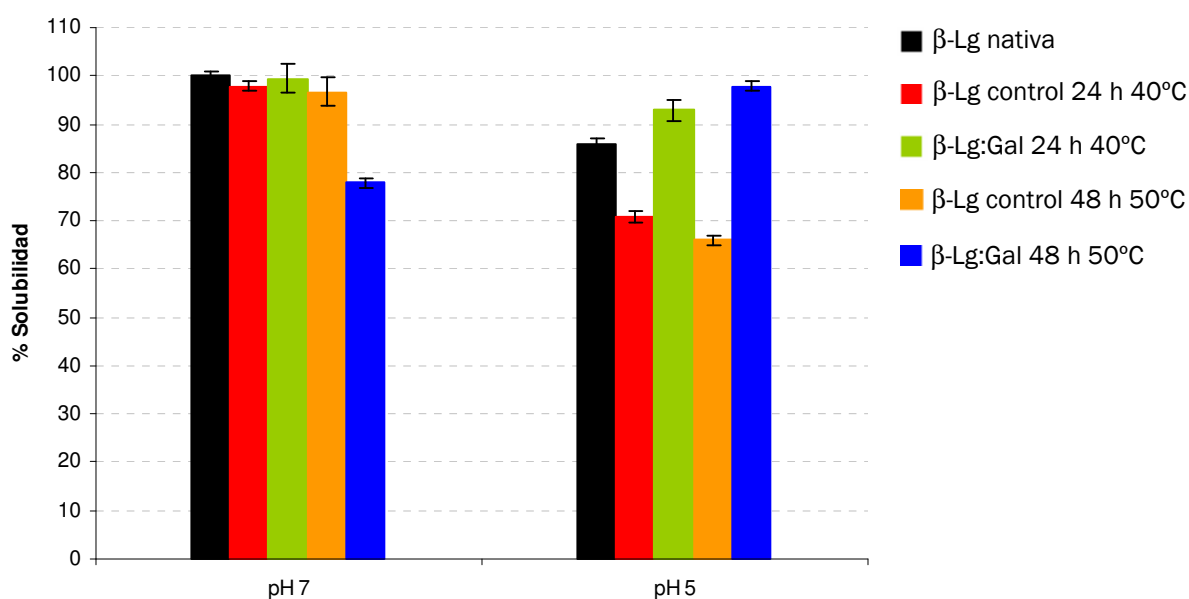
Por otra parte, varios autores han descrito una relación directa entre las propiedades interfaciales de las películas de proteína adsorbida a la interfase y la formación y estabilidad de las espumas (Murray, 2002; Baeza y col., 2005; Murray, 2007; Rodríguez Patino y col., 2008a y 2008b). Sin embargo, hasta donde nosotros sabemos, no existen estudios en la bibliografía en los que se investigue el impacto de la glicosilación vía RM sobre las propiedades espumantes de la  $\beta$ -Lg y del SC en relación a su efecto sobre las propiedades interfaciales de las películas de proteína adsorbida.

Así, en este apartado, se expondrán, en primer lugar, los resultados derivados del estudio del efecto de la glicosilación vía RM sobre las propiedades interfaciales de las películas de  $\beta$ -Lg y SC adsorbidas y, en segundo lugar, los resultados obtenidos a partir de la evaluación de las propiedades espumantes de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC, en relación a sus propiedades interfaciales. Para ello, se emplearon los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC en estados iniciales ( $\beta$ -Lg:Gal 24 h a 40 °C y SC:Gal 4 h a 60 °C) y avanzados ( $\beta$ -Lg:Gal 48 h a 50 °C y SC:Gal 72 h a 50 °C) de la RM, obtenidos bajo las condiciones indicadas en la [Tabla M8](#). Todas las determinaciones se realizaron a pH 7 y 5. Asimismo, previamente a los ensayos de funcionalidad, se determinó la solubilidad de todas las muestras estudiadas con el fin de relacionarla con las propiedades interfaciales y espumantes de las mismas.

## 4.5.1 Glicoconjugados de $\beta$ -lactoglobulina

### 4.5.1.1 Solubilidad

En la [Figura R34](#) se muestran los valores de solubilidad obtenidos para la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a pH 7 y 5.



**Figura R34.** Solubilidad a pH 7 y 5 de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, respectivamente.

La  $\beta$ -Lg nativa presentó una solubilidad máxima a pH 7 ([Figura R34](#)). Asimismo, a pH 5, próximo a su pI, permaneció altamente soluble, con una solubilidad próxima al ~86% ([Figura R34](#)). Tales resultados están de acuerdo con varios autores, entre otros Nacka y col. (1998), Chevalier y col. (2001b, 2001d) y Jiménez-Castaño y col. (2005a, 2007), quienes observaron que la  $\beta$ -Lg nativa es soluble en un amplio rango de pH. Esto ha sido atribuido a la gran estabilidad estructural de la  $\beta$ -Lg nativa frente a los cambios en el pH del medio, así como a su elevado número de grupos hidrofílicos cargados y no cargados en su superficie, cuya hidratación crea fuerzas de repulsión lo suficientemente grandes como para contrarrestar la agregación vía interacciones hidrofóbicas, promovidas en el rango de pH próximo al pI (Damodaran, 1997a). Por el contrario, a pH 5, la solubilidad de la  $\beta$ -Lg

control calentada, tanto a 40 como a 50 °C, se redujo notablemente (un 30-35%), debido a que la desnaturalización por calor altera su relación hidrofobicidad/hidrofilicidad superficial y, por tanto, el balance de interacciones proteína-proteína y proteína-solvente a favor de las primeras, haciéndola sensible a los cambios en el pH (Zhu y Damodaran, 1994).

Por otro lado, mientras que la glicación con Gal a 40 °C no alteró la solubilidad de la  $\beta$ -Lg a pH 7, la glicación bajo condiciones más severas de tiempo y temperatura (48 h a 50 °C) redujo substancialmente la solubilidad de la misma. De acuerdo con varios estudios, esto podría ser debido a la desnaturalización y agregación de la proteína glicada durante las etapas avanzadas de la RM (Dills, 1993; Sakai y col., 1990; Suárez y col., 1991; Groubet y col., 1999; Yeboah y col., 1999; Chevalier y col., 2001b; Aoki y col., 2001; Katayama y col., 2002; Sato y col., 2000; Tanabe y Saeki, 2001), lo cual da lugar a la formación de agregados insolubles de elevado peso molecular, como se indicó en el apartado de caracterización de los glicoconjugados (Figura R9 y Tabla R2, apartado 4.1.2.5). A pH 5, sin embargo, la  $\beta$ -Lg galactosilada a ambas temperaturas, particularmente a 50 °C, presentó una solubilidad mayor que la de la  $\beta$ -Lg nativa y control calentada. De acuerdo con los resultados derivados del análisis de los glicoconjugados por IEF (Figura R6, apartado 4.1.2.2), la modificación observada en la solubilidad de la  $\beta$ -Lg tras su glicosilación vía RM podría ser debida al desplazamiento del mínimo de solubilidad (pI) hacia un pH más ácido, como resultado de la reducción del número de cargas positivas de la proteína y del incremento moderado de su carga neta negativa (Bunn y col., 1979; Nacka y col., 1998; Chevalier y col., 2001b; Fenaille y col., 2003; Jiménez-Castaño y col., 2005a y 2007).

#### **4.5.1.2 Propiedades interfaciales**

##### **4.5.1.2.1 *Cinética de adsorción***

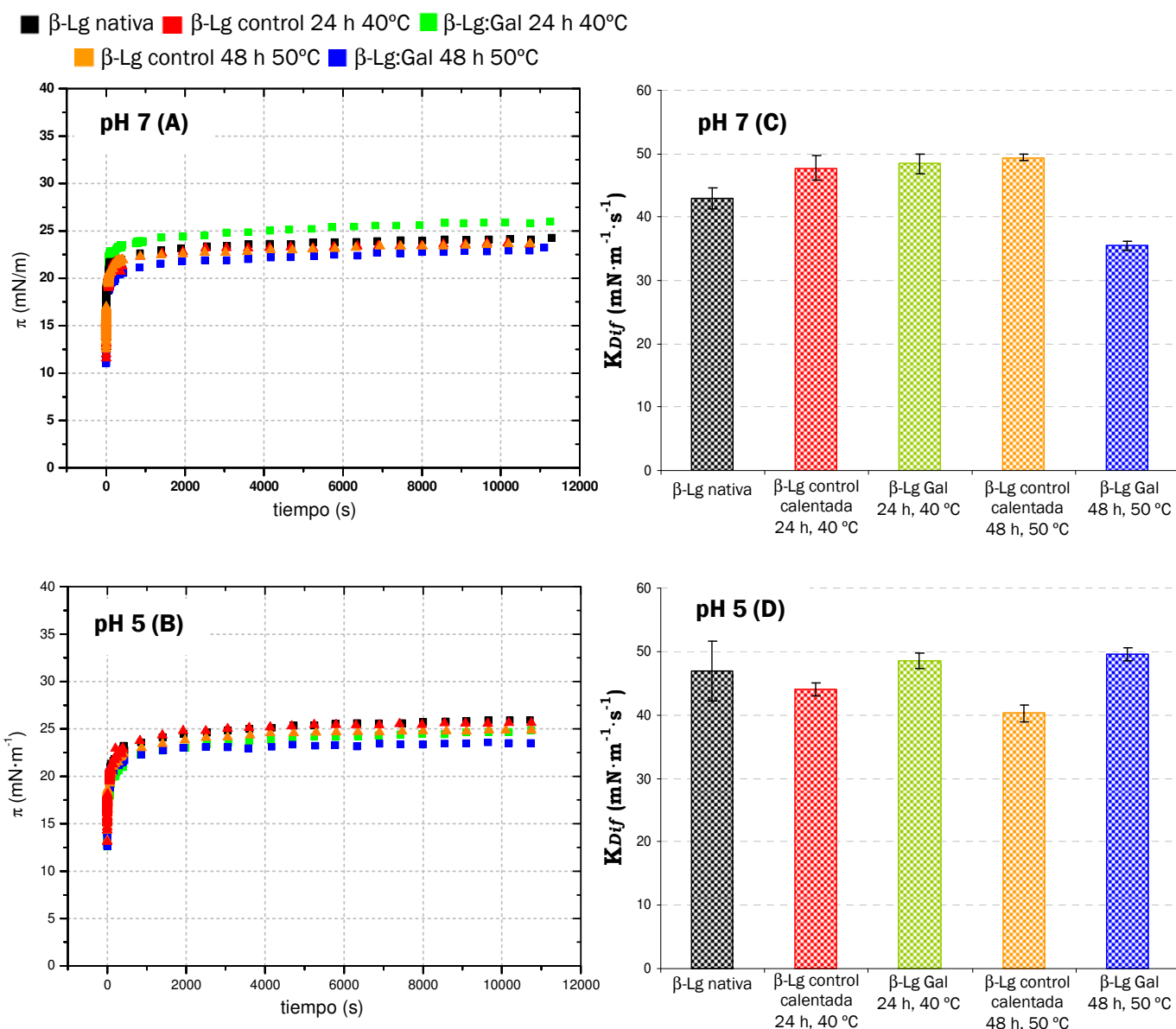
Para que una proteína sea un buen agente espumante debe ser capaz de estabilizar el sistema durante su formación. Para ello, de acuerdo con Damodaran (1994), es necesario que: (i) difunda rápidamente desde el seno de la disolución acuosa hacia la interfase aire/agua y se adsorba fuertemente a ella, lo cual depende principalmente de su hidrofobicidad superficial y solubilidad; y (ii) experimente un rápido cambio conformacional y reordenamiento en la interfase, reduciendo rápidamente la tensión superficial (o

umentando la presión superficial). Esto último está directamente relacionado con la hidrofobicidad molecular de la proteína y con su flexibilidad molecular o habilidad para exponer todos sus residuos hidrofóbicos a la interfase.

Así, en las muestras ensayadas en la presenta memoria (**Tabla M8**) fue preciso estudiar su cinética de adsorción en relación a los dos criterios anteriormente comentados, centrándonos principalmente en la primera etapa de difusión, dependiente de la hidrofobicidad superficial y solubilidad proteica.

En la **Figura R35 (A)** se muestra la variación a pH 7 de la actividad superficial ( $\pi$ ) en función del tiempo ( $\theta$ ) para la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, respectivamente. La actividad superficial de la  $\beta$ -Lg galactosilada, tanto a 40 como a 50 °C, fue muy similar a la de la  $\beta$ -Lg nativa y control calentada, no observándose diferencias notables entre la cantidad de proteína glicada y sin modificar adsorbida a la interfase aire/agua (es decir, entre los valores de presión superficial ( $\pi$ ) “de equilibrio” alcanzados a tiempos prolongados de adsorción ( $\pi$  a los 10800 s,  $\pi_{10800}$ )).

Sin embargo, al estudiar la cinética durante la primera etapa de difusión a pH 7 (**Figura R35 (C)**), apreciamos diferencias entre los sistemas estudiados. En concreto, la  $\beta$ -Lg control calentada, a 40 y 50 °C, y glicada bajo condiciones suaves de tiempo y temperatura (24 h a 40°C) presentaron un valor para la constante aparente de difusión ( $K_{Dif}$ ) moderadamente superior que la  $\beta$ -Lg nativa. De acuerdo con la relación positiva observada por varios autores entre la velocidad de difusión de las proteínas y su hidrofobicidad superficial (Wagner y col., 2000; Moro y col., 2001; Kristinsson y Hultin, 2003; Kim y col., 2005; Tsutsui y col., 2006; Perez y col., 2009), tales resultados podrían ser atribuidos a la mayor hidrofobicidad superficial y, por tanto, mayor afinidad por la interfase aire/agua de la  $\beta$ -Lg tratada térmicamente y glicada a 40 °C durante 24 h, en comparación con la  $\beta$ -Lg nativa (ver Tabla R3, apartado 4.1.2.7), como consecuencia de su desnaturalización parcial por calor. Asimismo, la menor hidrofobicidad superficial y solubilidad del conjugado  $\beta$ -Lg:Gal (48 h a 50 °C) (ver Tablas R3, apartado 4.1.2.7, y R13) podrían explicar la difusión más lenta de este conjugado (menor valor de  $K_{Dif}$ ) hacia la interfase aire/agua, en comparación con el resto de los sistemas estudiados.



**Figura R35.** Variación de la presión superficial ( $\pi$ ) con el tiempo de las películas de proteína adsorbida (A y B) y comportamiento cinético durante la etapa de difusión (C y D) de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, respectivamente, a pH 7 (A y C) y pH 5 (B y D).

A continuación, se estudió la cinética de adsorción de los sistemas preparados a pH 5. Como se observa en las Figuras R35 (B) y (D), la cinética de adsorción tanto a tiempos cortos como prolongados de la  $\beta$ -Lg nativa no se vio apenas alterada por la reducción de pH, observándose unos valores de  $K_{Dif}$  y de  $\pi_{10800}$  muy similares a los obtenidos a pH 7. Esto podría estar relacionado con la elevada solubilidad mostrada por la  $\beta$ -Lg nativa a pH 5 (Figura R34), como resultado de su gran estabilidad estructural frente a los cambios en el pH del medio. En cambio, la  $\beta$ -Lg control calentada a 40 y 50 °C (parcialmente desnaturada y, por tanto, más sensible a los cambios en el pH) mostró una  $K_{Dif}$

notablemente menor que a pH 7, probablemente debido a la pérdida notable de solubilidad (Figura R34), como consecuencia de la formación de agregados a través de interacciones hidrofóbicas, los cuales dificultan o retardan la difusión de la proteína hacia la interfase aire/agua.

A diferencia de la  $\beta$ -Lg control calentada a 40 °C, la cinética de adsorción tanto a tiempos cortos como prolongados de la  $\beta$ -Lg galactosilada a 40 °C (Figura R35 (B) y (D)) no resultó alterada como consecuencia de la reducción de pH, siendo la velocidad de difusión hacia la interfase de este conjugado superior a la de la  $\beta$ -Lg tratada térmicamente (Figura R35 (D)). Tales resultados podrían ser atribuidos a la elevada solubilidad presentada por este conjugado a pH 5, en comparación con la  $\beta$ -Lg control calentada (Figura R34). Esta estabilidad frente a los cambios en el pH del medio ha sido previamente observada por varios autores con otros productos iniciales de la RM (Dickinson y Euston, 1991; Schmitt y col., 1998).

Los resultados más significativos se obtuvieron, sin embargo, con la  $\beta$ -Lg galactosilada a 50 °C, con la cual se observó un claro aumento de su velocidad de difusión a pH 5, con respecto a pH 7 (Figura R35 (D)). Tales resultados podrían estar también relacionados con la elevada solubilidad de este conjugado a pH 5 (Figura R34), debido al desplazamiento de su pI hacia valores de pH más ácidos como consecuencia de su elevado grado de glicación (Figura R6, apartado 4.1.2.2).

#### **4.5.1.2.2 Propiedades superficiales dilatacionales**

Tras la adsorción a la interfase aire/agua y reordenamiento estructural en la misma, la proteína debe ser capaz de interactuar con las moléculas de proteína vecinas para formar una red interfacial resistente de naturaleza viscoelástica (Martin y col., 2002) que promueva la estabilidad del sistema tanto a tiempos cortos (durante su formación) como a tiempo prolongados. De modo que cuanto mayor sea la rigidez, viscosidad y cohesión de la película interfacial, mayor será la estabilidad de la espuma frente a la desestabilización por drenaje de líquido (migración del líquido contenido en la espuma hacia el seno de la fase acuosa), difusión (paso del gas contenido en las burbujas pequeñas hacia las grandes) o colapso (fusión de dos burbujas causada por la rotura de sus películas adsorbidas).

Con el fin de estudiar las propiedades reológicas de las películas adsorbidas formadas por la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada, se representaron los valores del

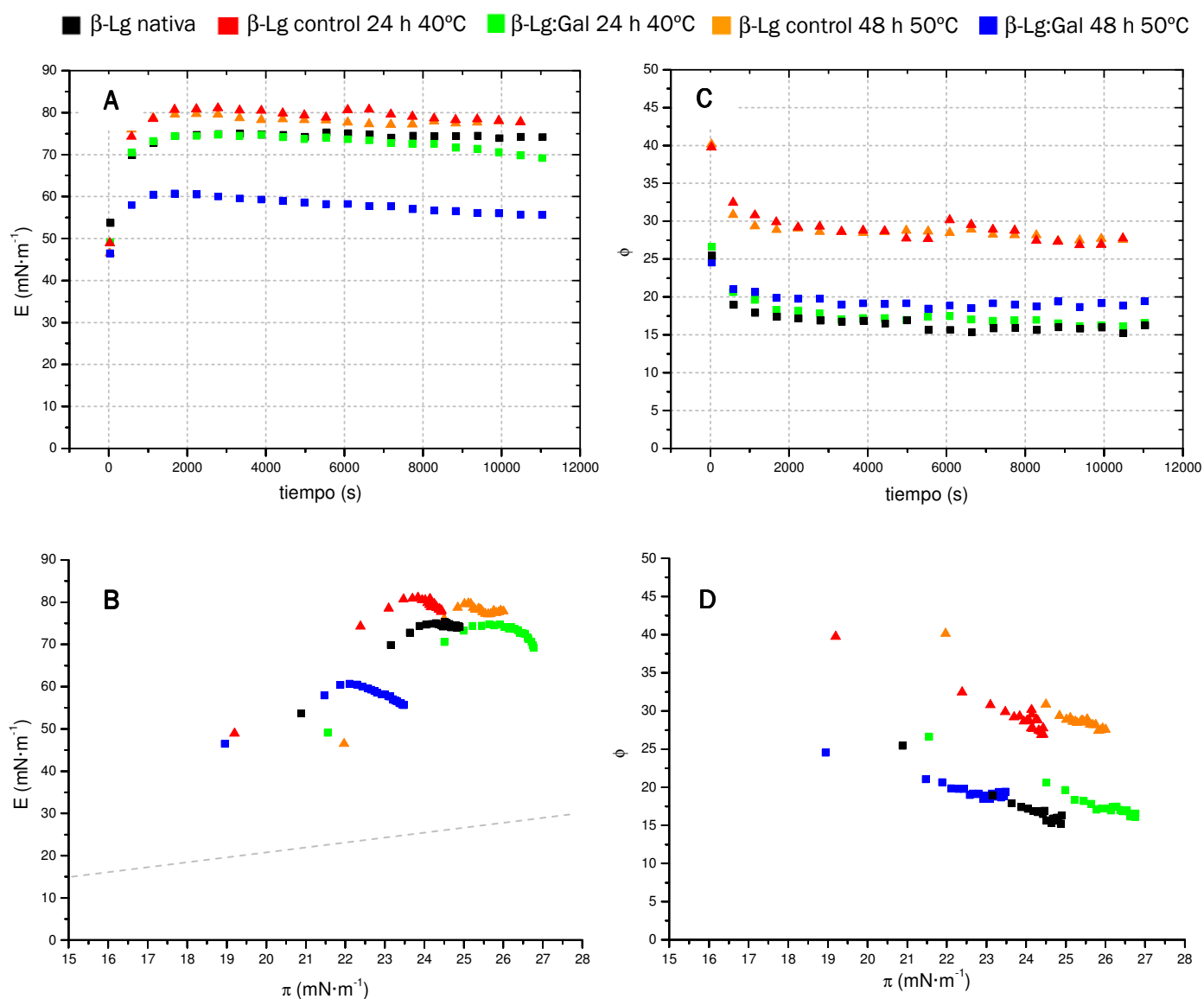
módulo dilatacional ( $E$ ) de las mismas frente al tiempo ( $\theta$ ) y frente a la presión superficial ( $\pi$ ), proporcionando este segundo tipo de representación una información adicional acerca de la magnitud de las interacciones existentes entre los componentes de la película adsorbida.

En general, a pH 7, las representaciones  $E$ - $\pi$  (**Figura R36 (B)**) de todos los sistemas estudiados se encontraron por encima del comportamiento ideal (línea discontinua), sugiriendo la existencia de interacciones relativamente grandes entre los componentes de la película adsorbida (Lucassen-Reynders y col., 1975). De acuerdo con varios autores, esto podría ser debido a que la  $\beta$ -Lg, una vez adsorbida a la interfase aire/agua, se desnaturaliza parcialmente, rompiéndose los puentes disulfuro, lo que permite la interacción intermolecular vía reacciones de intercambio tiol-disulfuro, que aumentan la rigidez de la película interfacial.

En particular, la  $\beta$ -Lg tratada térmicamente, tanto a 40 como a 50 °C, dio lugar a la formación de una película con mayores valores de  $E$  que la  $\beta$ -Lg nativa y glicada (**Figura R36 (A)**), probablemente debido a su mayor velocidad de difusión hacia la interfase aire/agua (Figura R35 (C)). De modo que la mayor eficiencia de adsorción de la  $\beta$ -Lg control calentada, con respecto a la  $\beta$ -Lg nativa y glicada, conlleva un aumento del módulo dilatacional (Bos y van Vliet, 2001; Rodríguez-Patino y col., 2008).

Por otro lado, la glicación a 40 °C apenas alteró las características reológicas de la película adsorbida de  $\beta$ -Lg, observándose únicamente un ligero descenso del módulo dilatacional, con respecto a la  $\beta$ -Lg nativa, tanto a tiempos prolongados ( $E$  a 10800 s,  $E_{10800}$ ) (**Figura R36 (A)**) como a valores de  $\pi$  elevados (**Figura R36 (B)**). Sin embargo, la  $\beta$ -Lg glicada bajo condiciones más severas de tiempo y temperatura (48 h a 50 °C) dio lugar a la formación de la película con los menores valores de módulo dilatacional ( $E$ ) para un tiempo (**Figura R36 (A)**) y una presión superficial (**Figura R36 (B)**) dados, en comparación con las películas de  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 °C. Wooster y Augustin (2007) obtuvieron resultados similares en un estudio sobre las propiedades reológicas de la película adsorbida formada por WPI glicado con dextranos de diferentes pesos moleculares. De acuerdo con estos autores y con los resultados derivados de la determinación de la fluorescencia intrínseca (Figura R10, apartado 4.1.2.6), según los cuales la glicación a 50 °C alteró notablemente la conformación de la proteína, el descenso observado en las propiedades reológicas de la película adsorbida constituida por el conjugado  $\beta$ -Lg:Gal (48 h a 50 °C) podría ser debido a los cambios estructurales sufridos

por la proteína (desnaturalización y agregación) durante las etapas avanzadas de la RM, ya que la alteración del estado conformacional de la proteína es responsable de la pérdida de rigidez estructural de la misma y, consecuentemente, de la pérdida de firmeza de la película adsorbida.



**Figura R36.** Variación del módulo dilatacional superficial ( $E$ ) y del ángulo de fase ( $\phi$ ) con el tiempo (**A** y **C**) y con la presión superficial ( $\pi$ ) (**B** y **D**) de las películas de proteína adsorbida de  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, respectivamente, a pH 7.



Además, como se observa en la **Figura R36 (B)**, el conjugado  $\beta$ -Lg:Gal (48 h a 50 °C) presentó los valores de  $E$ - $\pi$  más bajos y próximos al comportamiento ideal, indicando la existencia de interacciones débiles entre los componentes que conforman la película adsorbida, probablemente debido a la existencia de interacciones de repulsión electrostática entre las moléculas de carbohidrato covalentemente unidas a las proteínas ancladas a la interfase.

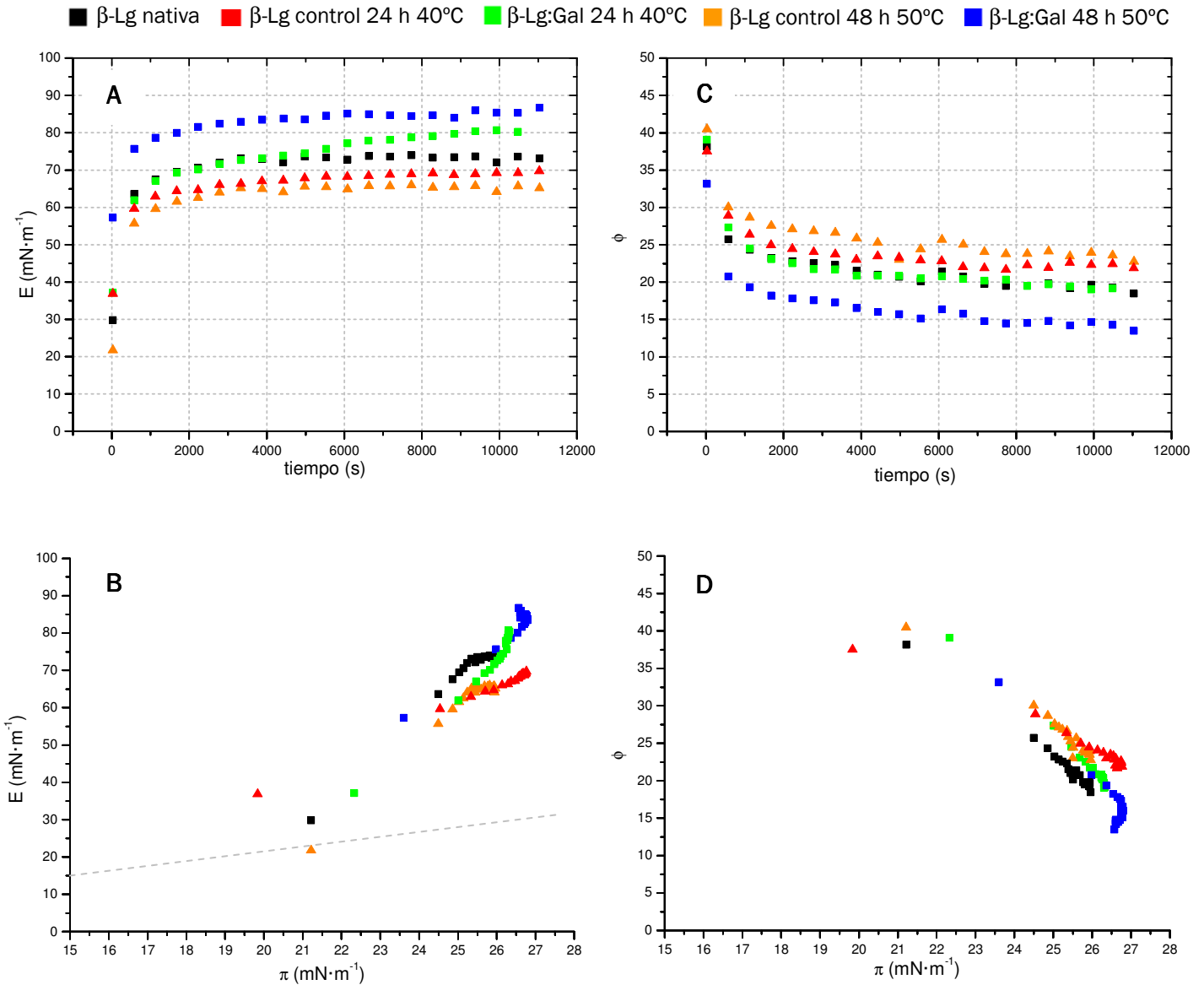
Por otro lado, el ángulo de fase ( $\phi$ ) puede ser considerado como una medida de la viscoelasticidad relativa de las películas de proteína adsorbidas. De modo que cuanto más acusada sea la disminución de los valores del ángulo de fase con el tiempo de adsorción ( $\theta$ ) o con la presión superficial ( $\pi$ ), mayor será la elasticidad de la película de proteína adsorbida, y viceversa.

En general, para todos los sistemas estudiados,  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada, el ángulo de fase disminuyó con el incremento del tiempo de adsorción (**Figura R36 (C)**) y de la presión superficial (**Figura R36 (D)**), indicando la formación de películas viscoelásticas. Sin embargo, los valores más elevados del ángulo de fase para un tiempo y una presión determinados, se observaron con la  $\beta$ -Lg control calentada, indicando la formación de una película con un carácter más fluido. Este hecho hace pensar que los mayores valores de  $E$  observados con la  $\beta$ -Lg control calentada podrían deberse a un empaquetamiento molecular en la interfase, como consecuencia de la rápida adsorción de la proteína en la interfase, y no a un aumento de las interacciones entre las moléculas adsorbidas (Rodríguez-Patino y col., 1999, 2003).

Asimismo, la  $\beta$ -Lg galactosilada durante 48 h a 50 °C presentó unos valores del ángulo de fase mayores que los de las películas formadas por  $\beta$ -Lg nativa y glicada a 40 °C, indicativo de un menor grado de interacción entre los componentes que forman dicha película adsorbida, lo que estaría relacionado con la reducción en los valores de  $E$  observados (Horne y Rodríguez-Patino, 2003; Rodríguez-Patino y col., 2008).

A pH 5, la variación del módulo dilatacional ( $E$ ) con el tiempo para la  $\beta$ -Lg nativa apenas sufrió modificaciones, alcanzándose valores de  $E$  a tiempos prolongados muy parecidos a los obtenidos a pH 7 **Figura R37 (A)**. Este hecho ha sido observado previamente por varios autores en estudios estructurales realizados con películas de  $\beta$ -Lg, en los que se demostró que el efecto del pH sobre el módulo dilatacional superficial y la estructura de las películas de  $\beta$ -Lg es prácticamente insignificante, comparado con el

observado para otras proteínas como la  $\beta$ -caseína (Qin y col., 1998; Rodríguez-Patino y col., 1999; Tolstoguzov, 2000; Rodríguez-Patino y col., 2001; Rawel y col., 2002; Zhang y col., 2004; Medrano y col., 2008). Estos autores relacionaron los resultados obtenidos con el carácter globular de la  $\beta$ -Lg, ya que las proteínas globulares en general mantienen parte de su estructura nativa al adsorberse inicialmente en la interfase.



**Figura R37.** Variación del módulo dilatacional superficial ( $E$ ) y del ángulo de fase ( $\phi$ ) con el tiempo (**A** y **C**) y con la presión superficial ( $\pi$ ) (**B** y **D**) de las películas de proteína adsorbida de  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, respectivamente, a pH 5.

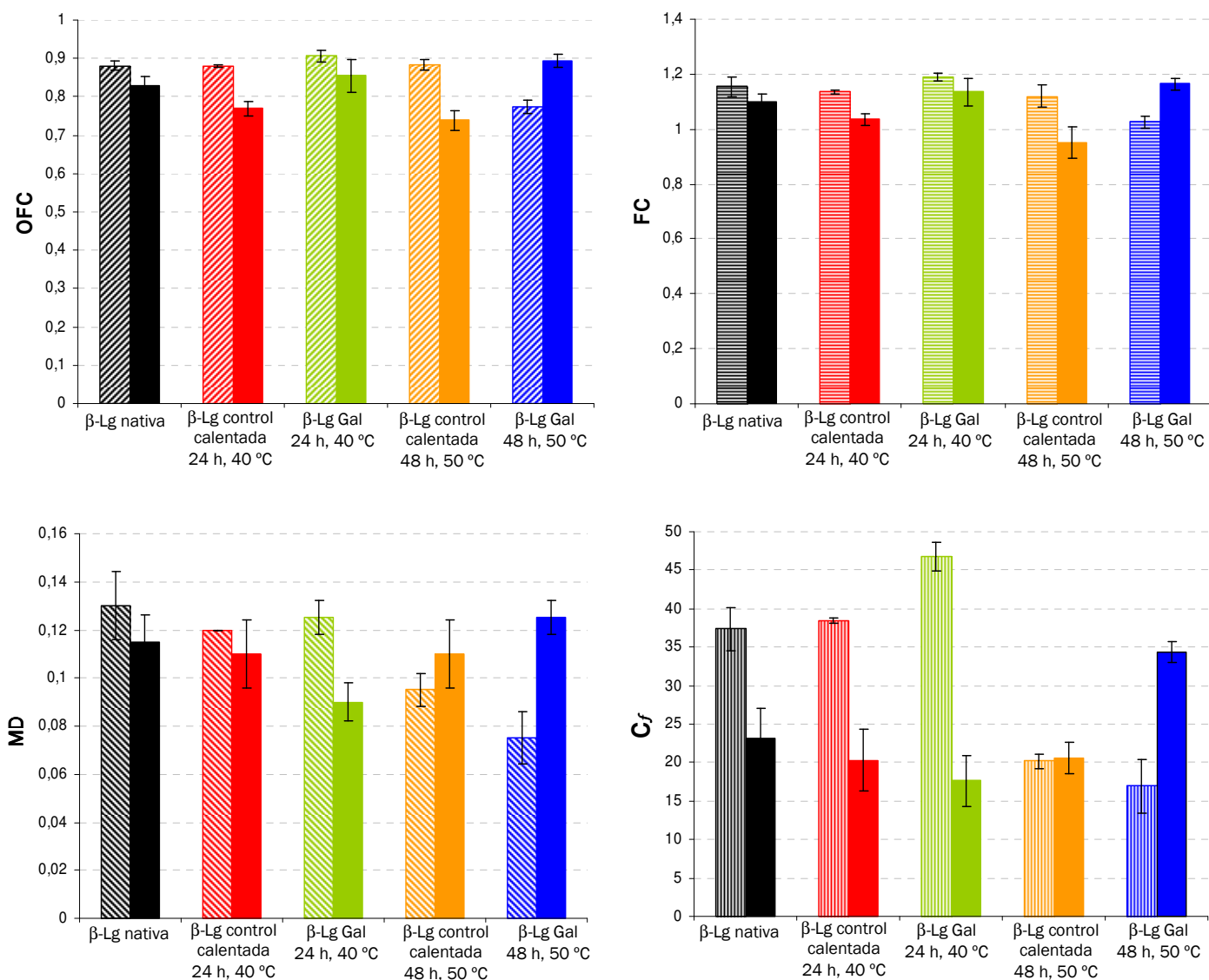
La película formada por la  $\beta$ -Lg control calentada mostró unos valores de  $E - \theta$  (**Figura R37 (A)**) y  $E - \pi$  (**Figura R37 (B)**) inferiores a los de la  $\beta$ -Lg nativa a pH 5 y a los alcanzados a pH 7, de acuerdo con la menor eficiencia de adsorción de la proteína calentada a pH 5, como consecuencia de la pérdida de solubilidad a este pH.

La  $\beta$ -Lg galactosilada a 40 °C durante 24 h dio lugar a la formación de una película con unos valores de  $E$  a tiempos cortos similares a los de la película formada por la  $\beta$ -Lg nativa y a tiempos prolongados ligeramente superiores, sugiriendo la formación de interacciones moleculares de elevada intensidad. Sin embargo, las diferencias más notables se observaron con el conjugado  $\beta$ -Lg:Gal (48 h, 50 °C), ya que, a diferencia de lo que ocurría a pH 7, con este sistema se alcanzaron los valores de  $E$  más elevados para un tiempo (**Figura R37 (A)**) y una presión superficial (**Figura R37 (B)**) dados, sugiriendo la existencia de un elevado grado de interacción entre los componentes de la película adsorbida. Tales resultados están relacionados con la mejora observada en las propiedades cinéticas de este conjugado a pH 5, de modo que su mayor eficiencia de adsorción a este pH conlleva un aumento del módulo dilatacional de la película adsorbida. Además, la  $\beta$ -Lg galactosilada a 50 °C durante 48 h presentó los valores más bajos del ángulo de fase con el tiempo (**Figura R37 (C)**) y la presión superficial (**Figura R37 (D)**), lo cual es indicativo de la formación de una película más elástica y resistente que la formada por la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 °C, de acuerdo con los elevados valores de  $E$  observados para este sistema.

#### **4.5.1.3 Propiedades espumantes**

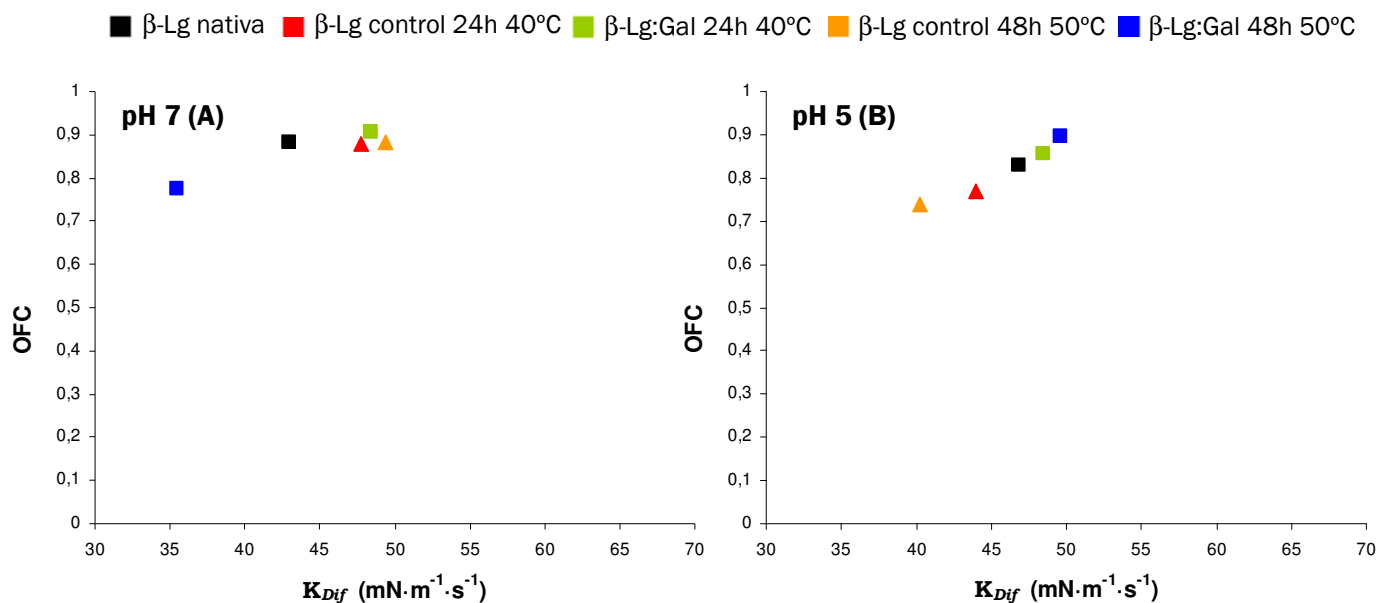
##### **4.5.1.3.1 *Capacidad para formar espumas***

La capacidad para formar espumas de los sistemas  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C se evaluó a partir de los parámetros OFC (capacidad total de espumeo, mLs<sup>-1</sup>), FC (capacidad espumante), MD (densidad máxima de la espuma) y  $C_f$  (conductividad relativa de la espuma, %), todos ellos previamente descritos en la sección de Materiales y Métodos (apartado 3.7.2.1). En la **Figura R38** se muestran los valores de estos cuatro parámetros obtenidos con cada uno de los sistemas estudiados, preparados a pH 7 y pH 5.



**Figura 38.** Valores obtenidos para los parámetros de formación de espumas OFC, FC, MD y  $C_f$  con la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h a pH 7 (barras rayadas) y pH 5 (barras sólidas).

A pH 7, la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y galactosilada a 40 °C durante 24 h presentaron las mismas propiedades espumantes de formación (mismos valores de OFC, FC y MD), difiriendo únicamente en el valor de  $C_f$ . Tales resultados indican que el aumento producido en la velocidad de difusión ( $K_{Dif}$ ) de la  $\beta$ -Lg como resultado del tratamiento térmico o de la glicación a 40 °C (Figura R35 (C)), no influye de forma significativa sobre su capacidad espumante, probablemente debido a que la velocidad de difusión de la proteína nativa ya es lo suficientemente buena como para que el sistema espumee. Este mismo comportamiento puede apreciarse mejor en la [Figura R39 \(A\)](#), donde se observa que un aumento del valor de la  $K_{Dif}$  no da lugar a un aumento significativo del valor de OFC.



**Figura R39.** Relación entre la velocidad de difusión ( $K_{Dif}$ ) hacia la interfase aire/agua y la capacidad total de espumeo (OFC) de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 ho, respectivamente, a pH 7 (A) y pH 5 (B).

La glicación a 50 °C, sin embargo, tuvo un efecto negativo sobre la capacidad espumante de la  $\beta$ -Lg, obteniéndose unos valores para los parámetros de formación OFC y FC notablemente más bajos con el conjugado  $\beta$ -Lg:Gal (48 h, 50 °C) que con la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 °C (Figura R38). Tales resultados están relacionados con las malas propiedades interfaciales a tiempos cortos de adsorción ( $K_{Dif}$  y E), observadas anteriormente para este conjugado (Figuras R35 (C) y R36 (A)). Es decir, que la baja capacidad espumante mostrada por el conjugado  $\beta$ -Lg:Gal [48 h, 50 °C] a pH 7 se debe, probablemente, a que tanto su velocidad de difusión como las características reológicas dilatacionales de la película adsorbida no son lo suficientemente buenas como para estabilizar el sistema durante su formación.

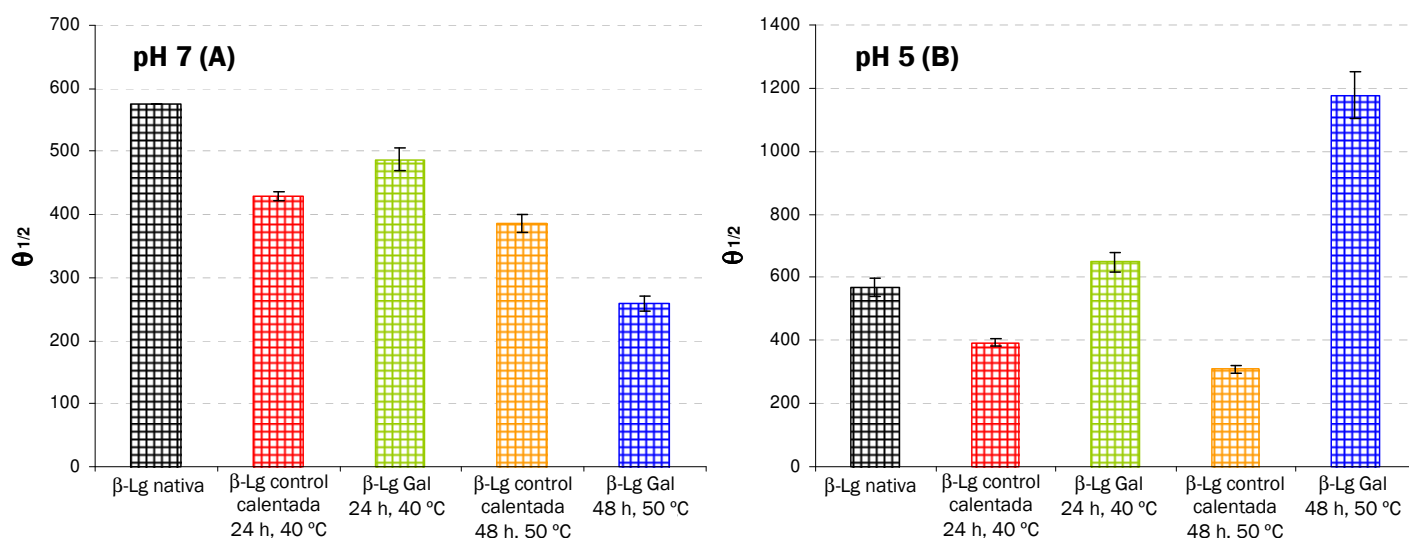
A pH 5, la  $\beta$ -Lg control calentada presentó los valores de OFC y FC más bajos (Figura R38), probablemente debido a su peor eficiencia de adsorción a la interfase con respecto a la  $\beta$ -Lg nativa y glicada, como vimos en el apartado anterior (Figura R35 (D)). La  $\beta$ -Lg galactosilada a 40 y 50 °C, sin embargo, presentó una capacidad espumante similar a la de la  $\beta$ -Lg nativa a pH 5, no observándose diferencias significativas entre los valores de OFC y FC. Tales resultados están de acuerdo con las propiedades cinéticas a pH 5 observadas anteriormente para estos sistemas, los cuales independientemente de estar

glicosados o no, presentaron una velocidad de difusión y una actividad superficial muy similar (Figura R35 (B) y (D)).

Asimismo, comparando los resultados obtenidos a pH 5 con los obtenidos a pH 7, no observamos diferencias importantes entre los valores de OFC y FC presentados por la  $\beta$ -Lg nativa y glicada a 40 °C, pero sí un aumento notable de los mismos en el caso de la  $\beta$ -Lg galactosilada a 50 °C durante 48 h, aumento probablemente debido a la mayor velocidad de difusión hacia la interfase aire/agua presentada por este conjugado a pH 5 (Figura R35 (D)) que a pH 7. Este comportamiento queda mejor reflejado en la [Figura R39 \(B\)](#), donde se puede observar cómo el incremento en el valor de la  $K_{Dif}$  da lugar a un mayor valor de OFC.

#### 4.5.1.3.2 Capacidad para estabilizar espumas

Para evaluar el efecto de la glicación sobre la capacidad para estabilizar espumas de la  $\beta$ -Lg, se determinó el tiempo de vida media ( $\theta_{1/2}$ ) de las espumas formadas con  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y galactosilada a 40 y 50 °C, como agentes espumantes ([Figura R40](#)).



**Figura R40.** Estabilidad (tiempo de vida media,  $\theta_{1/2}$ ) a pH 7 (A) y pH 5 (B) de las espumas con  $\beta$ -Lg nativa, control calentada o glicada a 40 y 50 °C durante 24 y 48 h, como agente estabilizante.

Como se observa en la **Figura R40 (A)**, a pH 7, la estabilidad del sistema con  $\beta$ -Lg nativa en disolución fue mayor que la de los sistemas con la  $\beta$ -Lg control calentada y glicada, particularmente a 50 °C. Esta menor capacidad para estabilizar espumas de la proteína calentada y de los conjugados, particularmente del conjugado  $\beta$ -Lg:Gal [48 h, 50 °C], concuerda con las peores propiedades reológicas de las películas formadas por estos sistemas [carácter más fluido (mayores valores  $\phi - \theta$  y  $\phi - \pi$ ) y menor grado de interacción (menores valores  $E - \theta$  y  $E - \pi$ )] (Figura R36).

A pH 5 (**Figura R40 (B)**), el tiempo de vida media de la espuma con  $\beta$ -Lg nativa apenas varió con respecto al obtenido a pH 7, hecho que está relacionado con la estabilidad del módulo dilatacional (E) de la película formada por esta proteína frente a los cambios en el pH. Asimismo, las peores propiedades cinéticas e interfaciales a pH 5 de las películas de  $\beta$ -Lg control calentada a 40 y 50 °C, en comparación con las de  $\beta$ -Lg nativa y glicada, se tradujeron en una menor estabilidad de la espuma.

Por otro lado, a diferencia de lo que ocurría a pH 7, a pH 5 los glicoconjugados fueron los que presentaron la mayor capacidad para estabilizar espumas. Así, el tiempo de vida media de la espuma con  $\beta$ -Lg galactosilada a 40 °C fue superior que el de las espumas con  $\beta$ -Lg nativa y control calentada, lo que podría ser atribuido al incremento observado en los valores del módulo dilatacional con el tiempo (Figura R37 (A)) y con la presión superficial (Figura R37 (B)) para este conjugado, sugiriendo la formación de una película con un elevado grado de interacción entre sus componentes y, por tanto, con una mayor estabilidad frente a los mecanismos de desestabilización de la espuma, tales como el drenaje de líquido, la difusión o el colapso. Los valores más elevados de  $\theta_{1/2}$  se obtuvieron, sin embargo, con el conjugado  $\beta$ -Lg:Gal [48 h, 50 °C], de acuerdo con la mayor elasticidad observada anteriormente para la película formada por este conjugado y el mayor grado de interacción entre sus componentes, en comparación con las películas de  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada a 40 °C (Figura R37).

### ***Conclusiones parciales***

Aunque a pH 7 apenas se observaron cambios, a pH 5, ambos glicoconjugados de  $\beta$ -Lg presentaron una cinética de adsorción mejor que la de sus correspondientes controles calentados y, consecuentemente, una mejor capacidad espumante. Asimismo, la mayor rigidez, cohesión (grado de interacción) y viscoelasticidad de las películas adsorbidas

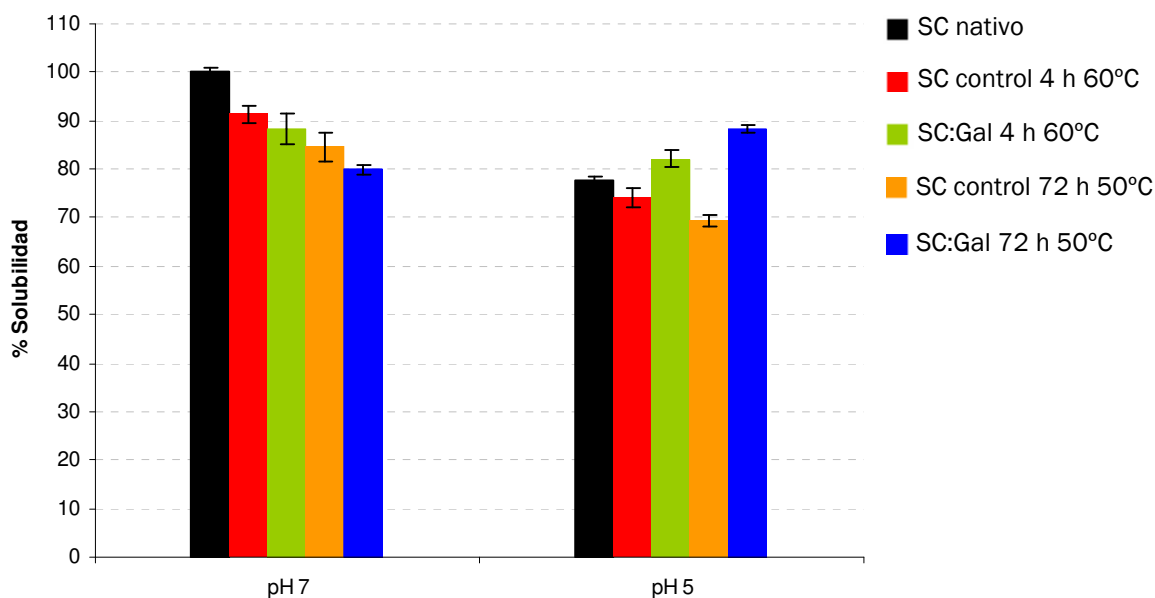
formadas por la  $\beta$ -Lg galactosilada, especialmente a 50 °C, promovió la mayor estabilidad de las espumas conteniendo estos sistemas como agentes estabilizantes, en comparación con la espumas con  $\beta$ -Lg nativa y control calentada.

Tales resultados tienen una gran importancia desde el punto de vista de la aplicación industrial de estos glicoconjugados, ya que amplían el rango de aplicabilidad de la  $\beta$ -Lg, permitiendo su uso como agente espumante en alimentos ácidos que requieren ser sometidos a un tratamiento térmico.

## 4.5.2 Glicoconjugados de SC

### 4.5.2.1 Solubilidad

En la [Figura R41](#) se indican los valores de solubilidad obtenidos para el SC nativo, control calentado y glicado a pH 7 y 5.



**Figura R41.** Solubilidad a pH 7 y 5 del SC nativo, control calentado y glicado con Gal a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente.



A pH 7, la solubilidad de todas las muestras fue menor a la de la proteína nativa, disminuyendo en función de la intensidad del tratamiento térmico y del avance de la RM, debido a una menor hidrofobicidad superficial (ver Tabla R8, apartado 4.2.2.4) y/o a la formación de agregados insolubles de elevado peso (ver Tabla R7, apartado 4.2.2.2).

A pH 5, la solubilidad del SC nativo y control calentado se redujo notablemente, como consecuencia de su agregación vía interacciones hidrofóbicas, inducidas por la proximidad al pI de la proteína, y posterior precipitación. Sin embargo, al igual que en el caso de la  $\beta$ -Lg, la glicación del SC, particularmente a 50 °C, condujo a una mayor solubilidad, debido al desplazamiento del mínimo de solubilidad hacia valores de pH más ácidos.

#### **4.5.2.2 Propiedades interfaciales**

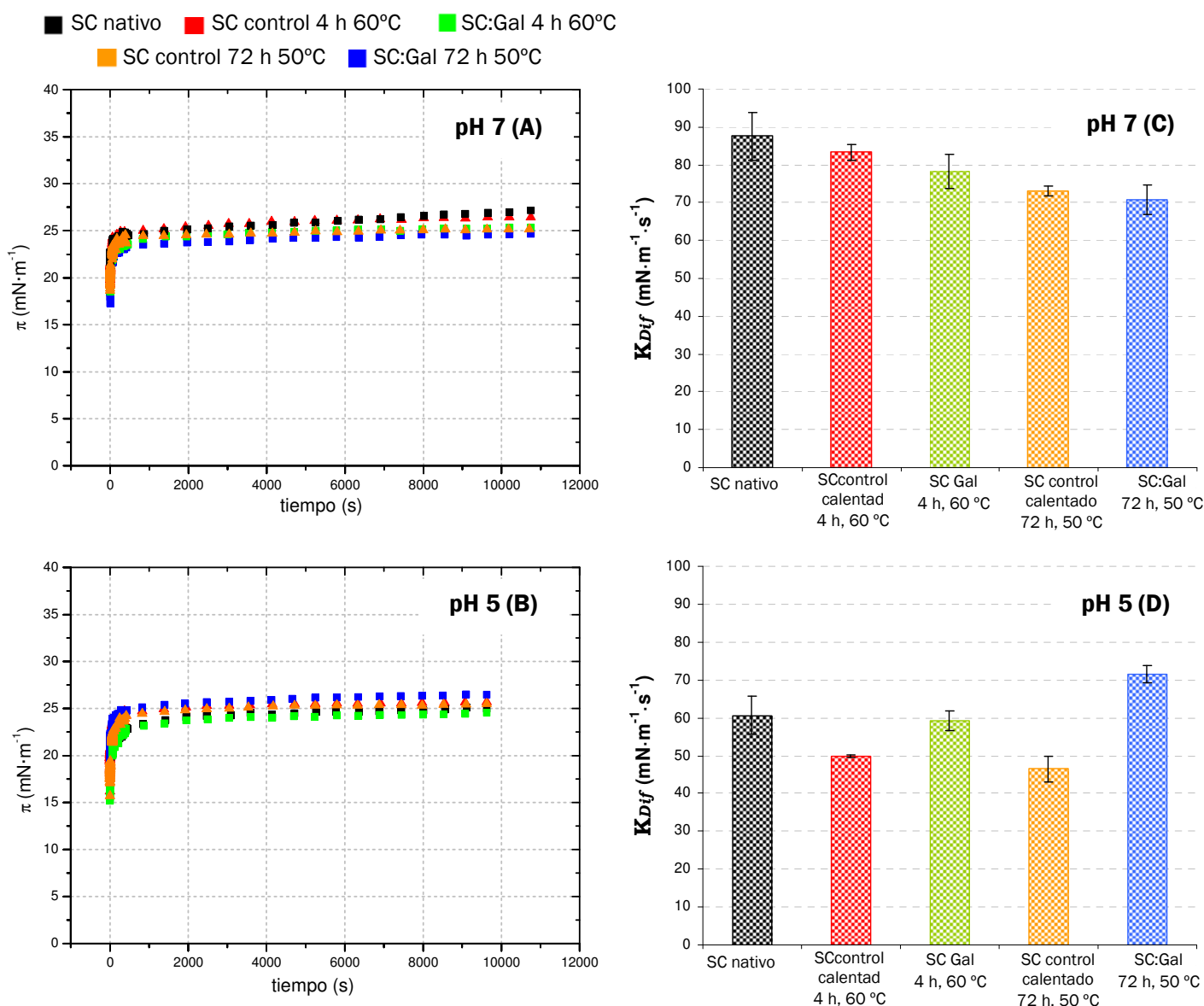
##### **4.5.2.2.1 Cinética de adsorción**

Como se observa en la [Figura R42 \(A\)](#), a pH 7, la actividad superficial del SC nativo, control calentado y glicado, tanto a 60 como a 50 °C, fue muy similar, no observándose diferencias importantes entre la cantidad de proteína glicada y sin modificar adsorbida a la interfase aire/agua (es decir, entre los valores de  $\pi_{10800}$  a tiempos prolongados de adsorción). A pesar de esto, se puede apreciar que la actividad superficial de los glicoconjugados es ligeramente menor que la del SC nativo y control calentado correspondiente. Este mismo comportamiento se observó de forma más acusada en los valores de las constantes cinéticas de difusión,  $K_{Dif}$ , ([Figura R42 \(C\)](#)), según los cuales, la velocidad de difusión de los sistemas estudiados, en orden decreciente, fue: SC nativo > S control calentado 4h 60°C > SC:Gal 4h 60 °C > SC control calentado 72h 50 °C > SC:Gal 72h 50 °C, en concordancia con los valores de hidrofobicidad superficial (Tabla R8) y solubilidad (Figura R41), anteriormente obtenidos para estos sistemas.

Asimismo, comparadas con las muestras de  $\beta$ -Lg, las muestras de SC difundieron más rápidamente hacia la interfase aire/agua, probablemente debido a la mayor flexibilidad estructural del SC, en comparación con la  $\beta$ -Lg, con una estructura globular, más compacta (Martin y col., 2002).

A pH 5, la pérdida de solubilidad experimentada por el SC nativo y control calentado, especialmente a 50 °C durante 72 h, se tradujo en una peor cinética de adsorción a la

interfase. Esto fue particularmente notable durante la primera etapa de difusión, ya que, como se observa en la **Figura R42 (D)**, los valores de  $K_{Dif}$  obtenidos para el SC nativo y control calentado fueron substancialmente menores que a pH 7. Aunque en menor medida que la velocidad de difusión, la actividad superficial a tiempos prolongados del SC nativo y control calentado también se vio afectada por la reducción del pH, observándose unos valores de  $\pi_{10800}$  ligeramente menores que a pH 7 (**Figura R42 (B)**).



**Figura R42.** Variación de la presión superficial ( $\pi$ ) con el tiempo de las películas de proteína adsorbida (**A** y **B**) y comportamiento cinético durante la etapa de difusión (**C** y **D**) del SC nativo, control calentado y glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente, a pH 7 (**A** y **C**) y pH 5 (**B** y **D**).

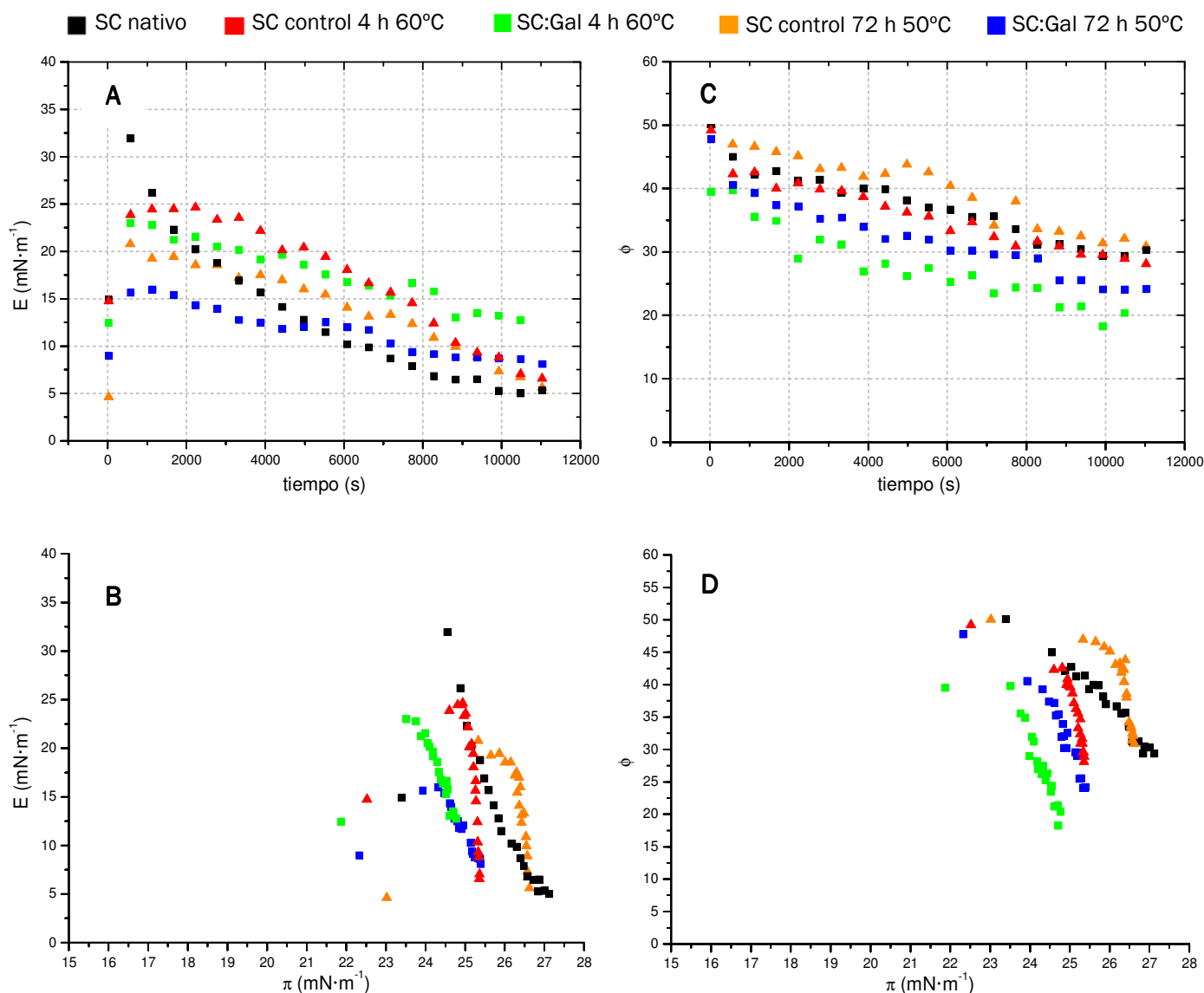
Por otro lado, la ligera mejora observada, con respecto al SC nativo, en la solubilidad a pH 5 del SC tras su glicación a 60 °C durante 4 h (Figura R41) no supuso una mejora de su cinética de adsorción, no observándose diferencias significativas entre los valores de  $\pi_{10800}$  y  $K_{Dif}$  del SC nativo y galactosilado a 60 °C durante 4 h. Sin embargo, la velocidad de difusión de este conjugado fue notablemente mayor que la del SC control calentado a 60 °C durante 4 h, sugiriendo que la glicación moderada mejora la cinética de adsorción a pH 5 del SC tratado térmicamente.

Finalmente, los resultados más significativos se observaron con el conjugado SC:Gal [72 h, 50 °C], el cual, a diferencia de a pH 7, presentó la mayor velocidad de difusión hacia la interfase (Figura R42 (D)) e incrementó en mayor medida la presión superficial de la misma (Figura R42 (B)), estabilizando el sistema durante su formación. Tales resultados sugieren que la glicación del SC con Gal a 50 °C durante 72 h mejora notablemente la cinética de adsorción a pH 5 de la proteína, tanto en estado nativo como tratada térmicamente, lo cual podría ser atribuido a la elevada solubilidad a pH 5 de este conjugado con respecto al SC nativo y control calentado (Figura R41).

#### **4.5.2.2 Propiedades superficiales dilatacionales**

En las Figuras R43 (A) y (B) se representan los valores del módulo dilatacional (E) a pH 7 de las películas formadas por el SC nativo, control calentado y glicado frente al tiempo de adsorción ( $\theta$ ) y frente a la presión superficial ( $\pi$ ), respectivamente.

En general, la variación del módulo dilatacional (E) con el tiempo ( $\theta$ ) de las películas formadas por las muestras de SC describió un perfil muy distinto al obtenido con las muestras de  $\beta$ -Lg, alcanzándose valores de E significativamente menores con el SC (Figura R43 (A)). Esto podría estar relacionado con el tipo de interacciones intermoleculares que tienen lugar en la interfase, de carácter hidrofóbico (débiles) en el SC y puentes disulfuro (fuertes) en la  $\beta$ -Lg. Además, dado que el SC se adsorbe a la interfase a través de sus dominios hidrofóbicos, estos no están disponibles para formar uniones intermoleculares hidrofóbicas en la interfase, dando lugar a películas con un bajo grado de interacción entre sus componentes (Graham y Phillips, 1979b; Dalgleish, 1997). Esto está de acuerdo con la drástica reducción observada en los valores del módulo dilatacional (E) con la presión superficial ( $\pi$ ) de las películas formadas por SC nativo, control calentado y glicado, tal y como se muestra en la Figura R43 (B).



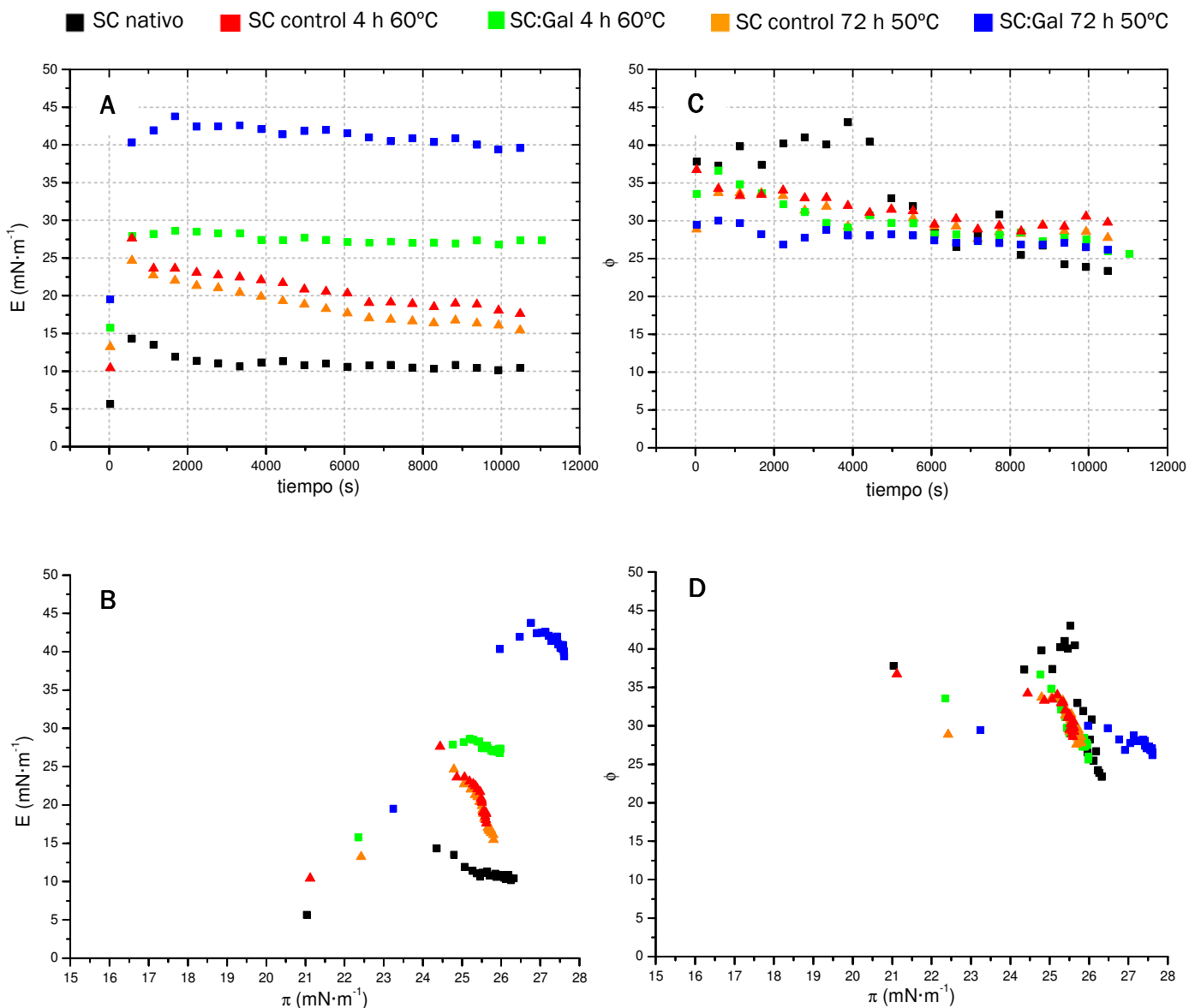
**Figura R43.** Variación del módulo dilatacional superficial ( $E$ ) y del ángulo de fase ( $\phi$ ) con el tiempo (**A** y **C**) y con la presión superficial ( $\pi$ ) (**B** y **D**) de las películas de proteína adsorbida del SC nativo, control calentado y glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente, a pH 7.

En particular, la reducción más drástica del módulo dilatacional con el tiempo de adsorción (**Figura R43 (A)**) y la presión superficial (**Figura R43 (B)**) se observó con el SC nativo. De forma que, a tiempos iniciales de adsorción y valores bajos de presión superficial, la película formada por SC nativo presentó los valores de  $E$  más elevados, en concordancia con su mayor velocidad de difusión (mayor valor de  $K_{Dif}$ ) hacia la interfase, en comparación con el resto de los sistemas estudiados (**Figura R42 (C)**). Mientras que, a tiempos prolongados y elevada presión superficial, se alcanzaron los valores de  $E$  más bajos, próximos a cero, sugiriendo un grado de interacción entre los componentes de la película adsorbida muy bajo, prácticamente nulo. El módulo dilatacional de los controles de

SC tratado térmicamente también disminuyó notablemente con el tiempo y la presión superficial (**Figuras R43 (A) y (B)**). Ambos controles calentados presentaron valores de E inferiores a los del SC nativo a tiempos prolongados y elevada presión superficial, indicando la escasez de interacciones interfaciales entre las moléculas de SC control calentado. Tales resultados están de acuerdo con los mayores valores del ángulo de fase ( $\phi$ ) observados para las películas formadas por el SC nativo y control calentado a 50 y 60 °C durante 72 y 4 h, respectivamente, indicativos de la formación de una película fluida, poco resistente (**Figuras R43 (C) y (D)**).

Los valores más elevados de E a tiempos de adsorción prolongados y elevada presión superficial se observaron con la película formada por el conjugado SC:Gal [4 h, 60 °C] (**Figuras R43 (A) y (B)**), sugiriendo la creación de interacciones intermoleculares en la interfase y la formación de una película con un carácter relativamente elástico, de acuerdo con los menores valores del ángulo de fase observados (**Figuras R43 (C) y (D)**). Finalmente, los menores valores de E a tiempos iniciales de adsorción (**Figura R43 (A)**) y valores bajos de presión superficial (**Figura R43 (B)**) se observaron para la película formada por el conjugado SC:Gal [72 h, 50 °C], de acuerdo con la menor velocidad de difusión y actividad superficial observadas anteriormente para este sistema, con respecto al SC nativo, control calentado y glicado a 60 °C durante 4 h (**Figuras R42 (A) y (C)**). Sin embargo, a tiempos prolongados de adsorción (**Figura R43 (A)**) y valores elevados de presión superficial (**Figura R43 (B)**), los valores de E no fueron tan bajos como los de las películas formadas por SC nativo y control calentado, sugiriendo un mayor grado de interacción y un carácter menos fluido de la película formada por este conjugado, de acuerdo con el mayor ángulo de fase de la misma (**Figura R43 (C) y (D)**), en comparación con el de las películas formadas por el SC nativo y control calentado. Tales resultados sugieren que la glicación induce la creación de interacciones interfaciales entre las moléculas de SC, dando lugar a la formación de películas más elásticas y resistentes frente a la desestabilización de la espuma.

A pH 5 (**Figura R44**), las películas con las mejores propiedades reológicas (elevado grado de interacción entre sus componentes y elevado carácter viscoelástico) fueron las formadas por los glicoconjugados de SC, especialmente por el SC:Gal [72 h, 50 °C], de acuerdo con los elevados valores de E -  $\theta$  y E -  $\pi$  y los menores valores de  $\phi$  -  $\theta$  y  $\phi$  -  $\pi$  de las mismas, en comparación con las películas constituidas por el SC nativo y control calentado (**Figura R43**). Tales resultados están de acuerdo con la mayor solubilidad (**Figura R41**) y mayor eficiencia de adsorción (**Figura R42 (D)**) a pH 5 del SC glicado, especialmente a 50 °C durante 72 h, con respecto al SC nativo y control calentado, lo cual conlleva un aumento del módulo dilatacional de la película adsorbida.

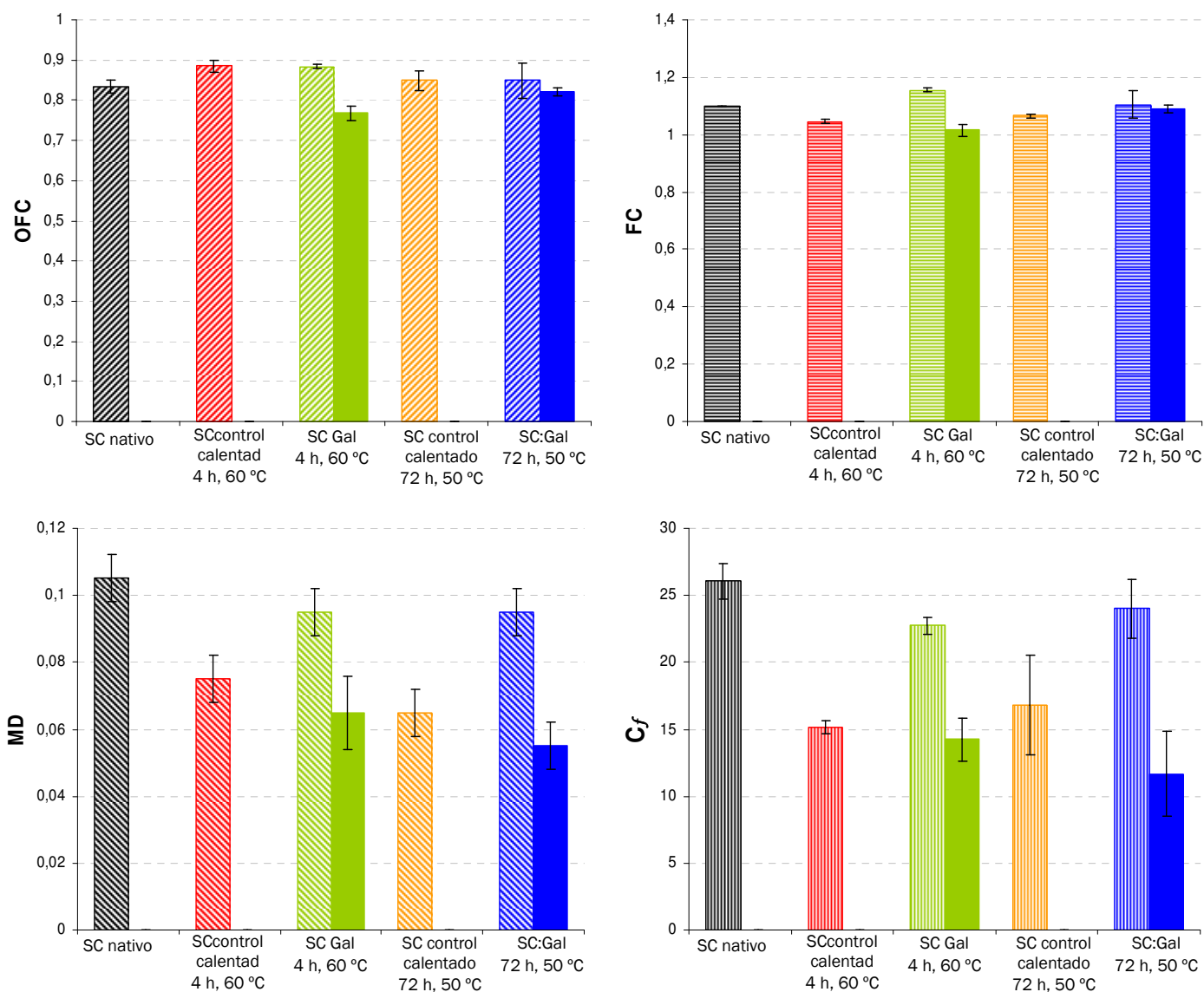


**Figura R44.** Variación del módulo dilatacional superficial ( $E$ ) y del ángulo de fase ( $\phi$ ) con el tiempo (**A** y **C**) y con la presión superficial ( $\pi$ ) (**B** y **D**) de las películas de proteína adsorbida del SC nativo, control calentado y glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente, a pH 5.

#### 4.5.2.3 Determinación de las propiedades espumantes

##### 4.5.2.3.1 *Capacidad para formar espumas*

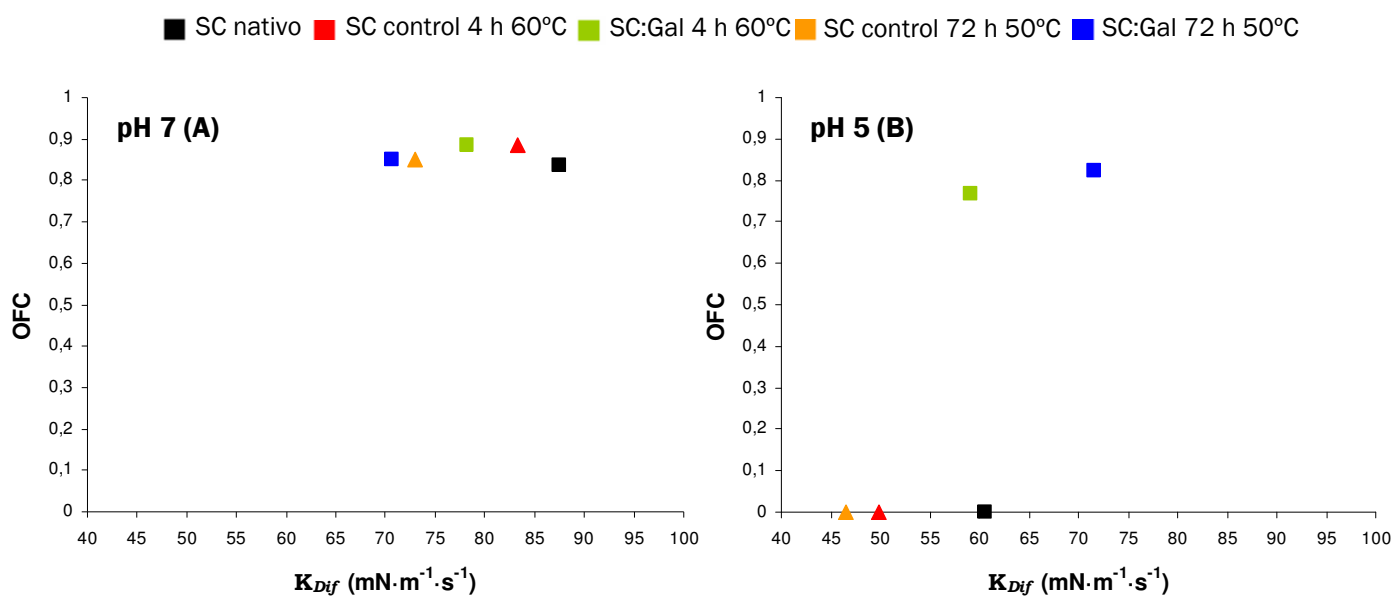
En la **Figura R45** se muestran los valores de OFC, FC, MD y  $C_f$  de las espumas formadas con los sistemas SC nativo, control calentado y glicado, preparados a pH 7 y 5.



**Figura R45.** Valores obtenidos para los parámetros de formación de espumas OFC, FC, MD y  $C_f$  con el SC nativo, control calentado y glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h a pH 7 (barras rayadas) y pH 5 (barras sólidas).

En general, a pH 7, no se observaron diferencias significativas entre los valores de OFC y FC de los sistemas estudiados, siendo, quizá, el hecho más significativo la menor densidad (menores valores de MD y  $C_f$ ) de las espumas con SC control calentado. Tales resultados sugieren que la menor eficiencia de adsorción (menores valores de  $K_{Dif}$ ) del SC control calentado y galactosilado, particularmente a 50 °C durante 72 h, (Figura R42 (C)) no influyó de forma significativa sobre su capacidad espumante, probablemente debido a que su velocidad de difusión seguía siendo lo suficientemente buena como para estabilizar el sistema durante su formación. Este mismo comportamiento puede apreciarse mejor en

la **Figura R46 (A)**, donde se observa que un menor valor de la  $K_{Dif}$  no da lugar a una reducción significativa del valor de OFC.



**Figura R46.** Relación entre la velocidad de difusión ( $K_{Dif}$ ) hacia la interfase aire/agua y la capacidad total de espumeo (OFC) del SC nativo, control calentado y glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente, a pH 7 (A) y pH 5 (B).

A pH 5, sin embargo, la pérdida notable de solubilidad experimentada tanto por el SC nativo como control calentado (Figura R41) y la subsiguiente reducción en su velocidad de difusión hacia la interfase (Figura R42 (D)), afectaron drásticamente a su capacidad espumante, presentando valores nulos para los parámetros de formación de espuma (Figura R45). Sin embargo, es preciso puntualizar que realmente estos sistemas sí espumearon, pero dichas espumas no consiguieron alcanzar el volumen prefijado (120 mL) en el método experimental empleado (ver apartado 3.7.2).

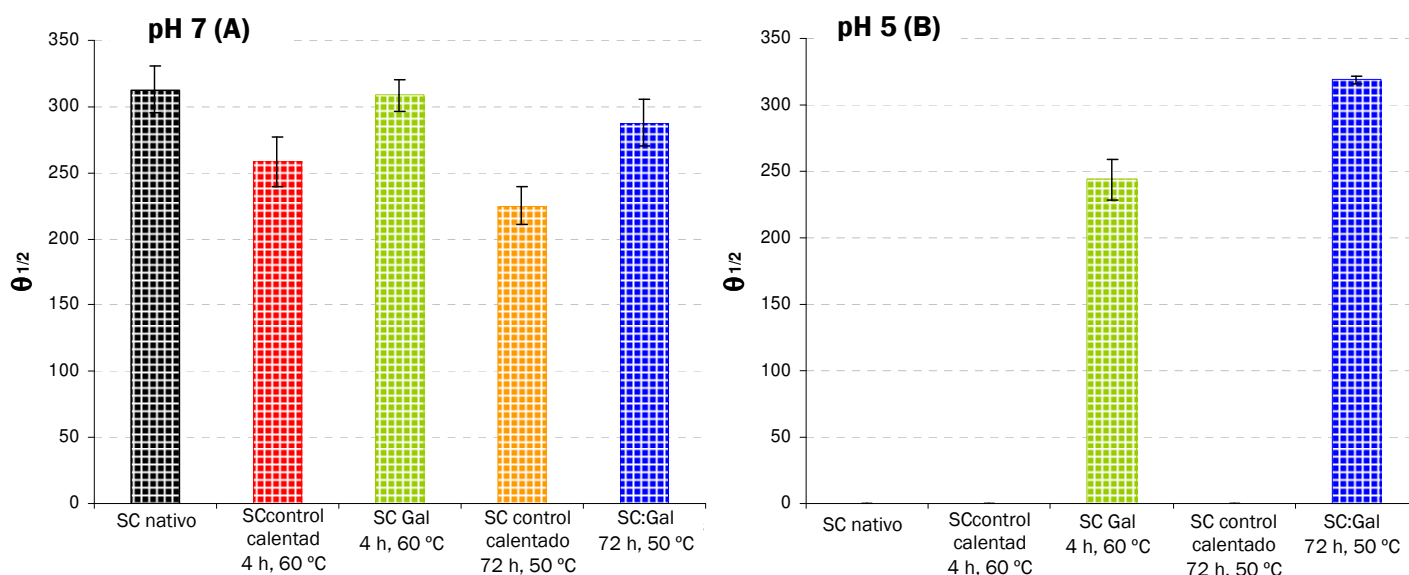
Sólo los conjugados SC:Gal [4 h, 60 °C] y [72 h, 50 °C] fueron capaces de estabilizar el sistema durante su formación, dando lugar a espumas con unos valores de OFC y FC elevados (Figura R45), probablemente debido a la mayor solubilidad (Figura R41) y, consecuentemente, mayor eficiencia de adsorción a pH 5 (Figura R42 (D)) de ambos glicoconjugados con respecto al SC nativo y control calentado. Esto se puede apreciar mejor en la **Figura R46 (B)**, donde se observa cómo el mayor valor de la  $K_{Dif}$  del SC glicado,



especialmente a 50 °C durante 72 h, está relacionado con su mayor capacidad espumante (valor de OFC más elevado), en comparación con el SC nativo y el tratado térmicamente.

#### 4.5.2.3.2 Capacidad para estabilizar espumas

En la [Figura R47](#) se muestra el tiempo de vida media ( $\theta_{1/2}$ ) de la espumas, conteniendo, como agentes espumantes, los sistemas SC nativo, control calentado y galactosilado preparados a pH 7 y 5.



**Figura R47.** Estabilidad (tiempo de vida media,  $\theta_{1/2}$ ) a pH 7 (A) y pH 5(B) de las espumas con SC nativo, control calentado o glicado a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, como agente estabilizante.

En general, a pH 7, las espumas estabilizadas con SC nativo, control calentado o glicado ([Figura R47 \(A\)](#)) presentaron unos valores de  $\theta_{1/2}$  más bajos que las espumas conteniendo  $\beta$ -Lg nativa, control calentada o glicada ([Figura R40 \(A\)](#)). La peor capacidad estabilizante de las muestras de SC, con respecto a las muestras de  $\beta$ -Lg, está relacionada con las peores propiedades reológicas, es decir, el menor grado de interacción entre sus componentes y el carácter más fluido, de las películas formadas por estos sistemas, como se indicó en el apartado anterior.

En particular, la capacidad del SC control calentado para estabilizar espumas fue menor que la del SC nativo y glicado a ambas temperaturas. Esto está de acuerdo con el carácter altamente fluido y bajo grado de interacción molecular tanto a tiempos iniciales como prolongados de adsorción de las películas constituidas por el SC control calentado (Figura R43).

Asimismo, las espumas estabilizadas con SC nativo y glicado a 60 °C durante 4 h presentaron valores de  $\theta_{1/2}$  similares (Figura R47 (A)), a pesar de las peores propiedades reológicas a tiempos prolongados de la película formada por SC nativo (bajos valores de  $E - \theta$  y  $E - \pi$  y elevados valores de  $\phi - \theta$  y  $\phi - \pi$ ). Esto podría ser atribuido a la mayor eficiencia de adsorción (Figura R42 (C)) y valores más elevados de  $E$  (Figura R43 (A)) presentados por el SC nativo a tiempos iniciales de adsorción.

Por otro lado, a pesar de los menores valores de  $E$  observados a tiempos iniciales de adsorción para la película formada por el conjugado SC:Gal [72 h, 50 °C] (Figura R43 (A)), la espuma conteniendo este sistema mostró una estabilidad muy similar o ligeramente inferior a la de las espumas con SC nativo y glicado a 60 °C durante 4 h (Figura R47 (A)). Esto podría estar relacionado con el incremento observado, con respecto al SC nativo, en el grado de interacción interfacial entre los componentes de la película formada por este conjugado a mayores tiempos de adsorción (mayores valores de  $E - \theta$  y menores valores de  $\phi - \theta$ ) (Figura R43 (A) y (C)), así como con los valores elevados de presión superficial (mayores valores de  $E - \pi$  y menores valores de  $\phi - \pi$ ) (Figuras R43 (B) y (D)), dando lugar a la formación de una película con un carácter más viscoelástico y resistente que la formada por el SC nativo.

A pH 5 (Figura R47 (B)), ambos glicoconjugados de SC estudiados dieron lugar a espumas con una estabilidad relativamente elevada. En particular, la capacidad estabilizante del conjugado SC:Gal [72 h, 50 °C] fue mayor que la del sistema SC:Gal [4 h, 60 °C], probablemente debido a su mayor eficiencia de adsorción a pH 5 (Figura R42 (D)) y al mayor grado de interacción intermolecular en la interfase, dando lugar a una película con un mayor carácter viscoelástico (Figura R44 (B) y (D)) y, por tanto, más resistente frente a los mecanismos de desestabilización de la espuma, tales como el drenaje de líquido, el colapso de la espuma o la difusión.

### ***Conclusiones parciales***

A pH 7, el resultado más significativo fue la mayor capacidad estabilizante de los glicoconjugados de SC con respecto al SC tratado térmicamente, como resultado del mayor carácter viscoelástico y cohesión de la película interfacial formada por el SC glicado. Sin embargo, los resultados más importantes se observaron a pH 5, ya que, a este pH, sólo los glicoconjugados presentaron unas propiedades interfaciales (eficiencia de adsorción y propiedades reológicas) adecuadas para estabilizar el sistema durante su formación, así como frente a los distintos mecanismos de desestabilización del sistema (drenaje de líquido, difusión y colapso), dando lugar a espumas con una estabilidad relativamente elevada.

De acuerdo con estos resultados, podemos decir que la glicosilación vía RM del SC con Gal es un método eficaz para mejorar las propiedades espumantes de esta proteína, ampliando su rango de aplicación como agente espumante a los alimentos ácidos y/o que requieran ser tratados térmicamente.

## **PARTE III: DIGESTIBILIDAD, INMUNORREACTIVIDAD Y FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DE LOS GLICOCONJUGADOS**

### **4.6 DIGESTIBILIDAD GASTROINTESTINAL *IN VITRO***

El efecto de la glicosilación no enzimática sobre la digestibilidad proteica aún no está totalmente dilucidado, existiendo resultados contradictorios al respecto (Bouhallab y col., 1999; Lapolla y col., 2001 y 2004; Yeboah y col., 2004, Finot, 2005; Sanz y col., 2007; Moreno y col., 2008). Así, con el fin de profundizar en este tema, se procedió a estudiar el efecto del avance de la RM sobre la digestibilidad *in vitro* de la  $\beta$ -Lg y del SC, para lo cual se analizaron glicoconjugados en estados iniciales y avanzados de la reacción, obtenidos bajo las condiciones indicadas en la Tabla M10.

#### **4.6.1 Efecto de la glicosilación vía reacción de Maillard sobre la digestibilidad de la $\beta$ -lactoglobulina**

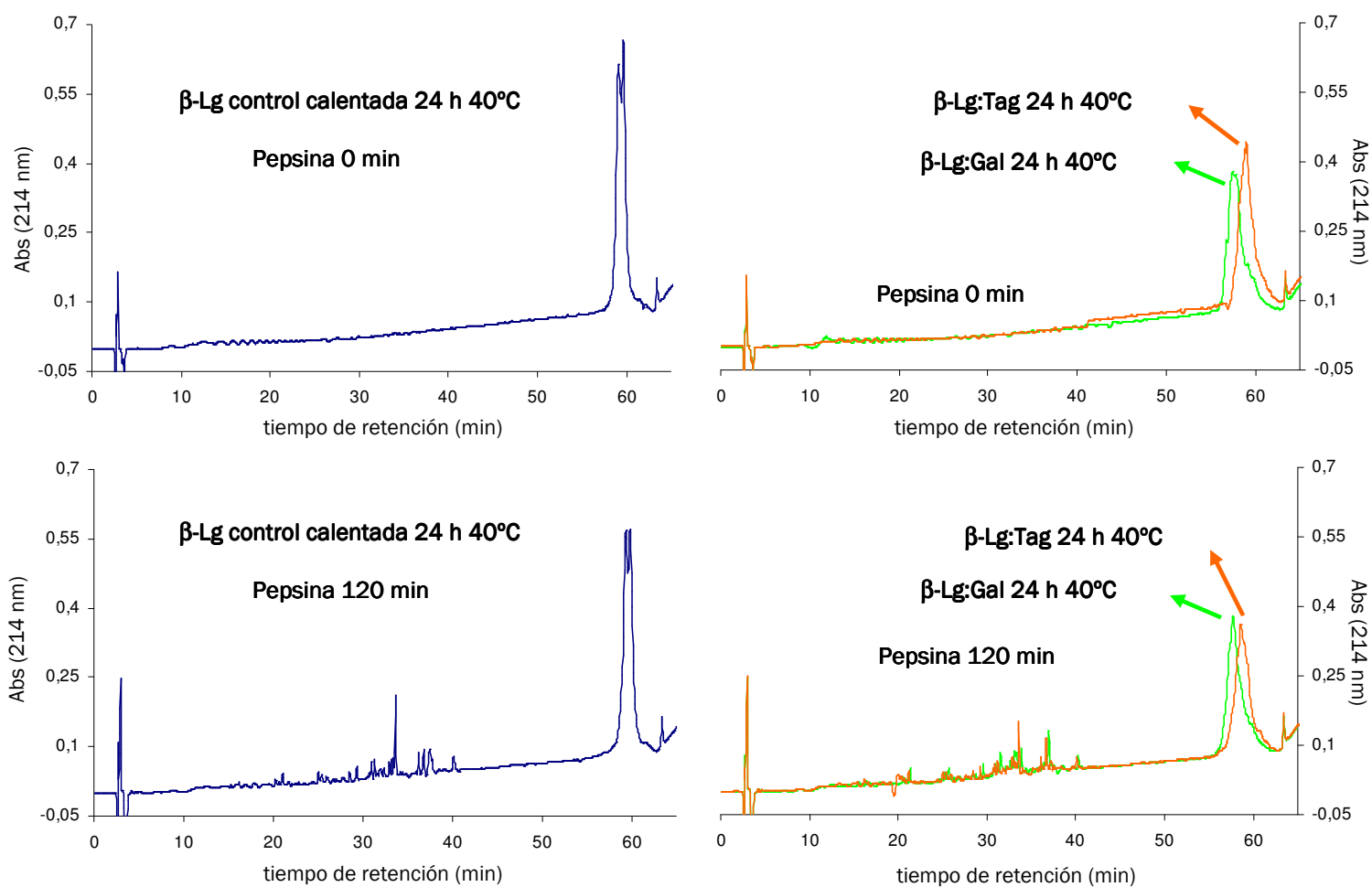
##### **4.6.1.1. Efecto del grado de glicación**

Con el fin de estudiar el efecto del grado de glicación sobre la digestibilidad de la  $\beta$ -Lg, las muestras estudiadas fueron los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal (con 14 moléculas de Gal) y  $\beta$ -Lg:Tag (con 3 moléculas de Tag), obtenidos tras la incubación a 40 °C durante 24 h, así como los complejos  $\beta$ -Lg:DX<sub>10</sub> (con 4 moléculas de DX<sub>10</sub>) y  $\beta$ -Lg:DX<sub>20</sub> (con 1,5 moléculas de DX<sub>20</sub>), obtenidos tras el almacenamiento a 60 °C durante 36 y 60 h, respectivamente (Jiménez-Castaño y col, 2007), los cuales diferían notablemente en el número de aductos de carbohidrato unidos a la  $\beta$ -Lg (ver Tabla R1, apartado 4.1.2.3).

Los glicoconjugados y la  $\beta$ -Lg control calentada se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro* en dos fases consecutivas con el fin de simular la digestión gástrica y duodenal que tienen lugar en condiciones fisiológicas (Esquema M1).

Los cromatogramas obtenidos tras el análisis por RP-LC-UV de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag y controles correspondientes, sometidos a digestión gastrointestinal simulada, (Figura R48) mostraron una actividad muy limitada de la pepsina sobre la  $\beta$ -Lg control

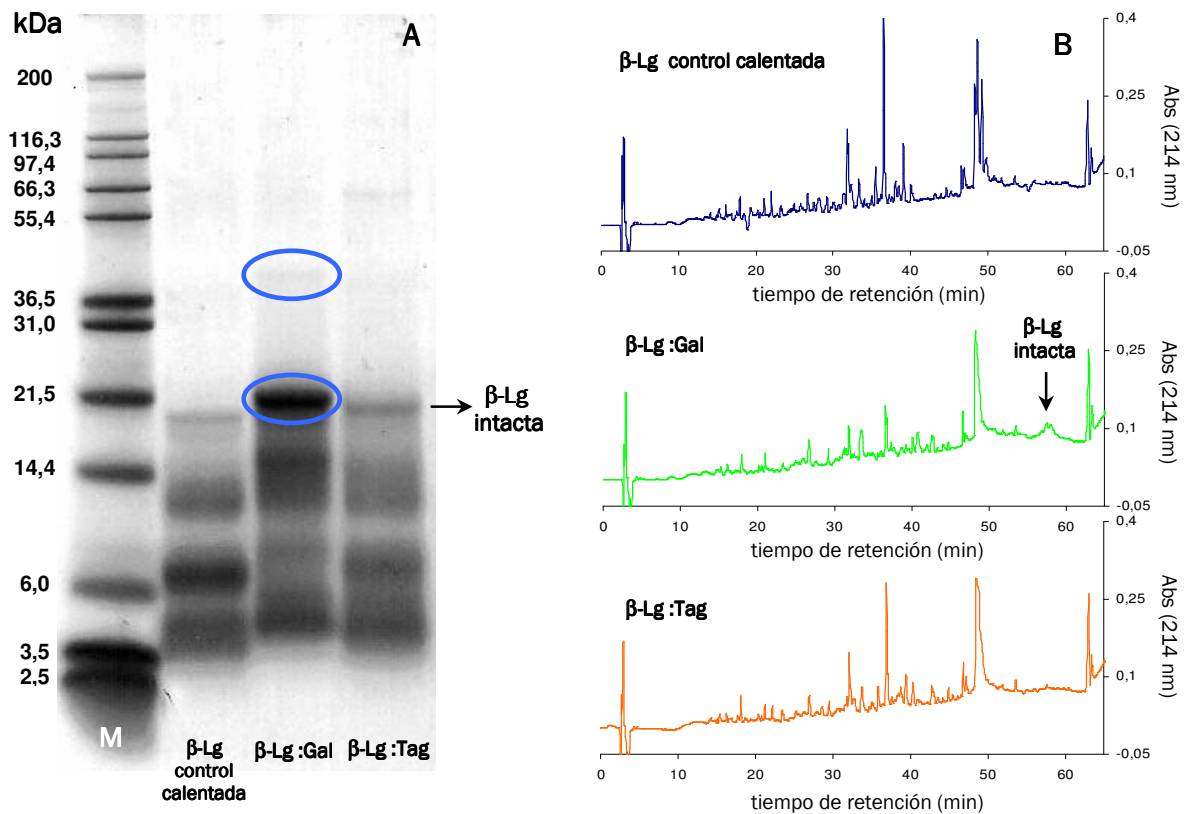
calentada y glicada a 40°C, dando lugar a patrones similares de péptidos minoritarios, con tiempos de retención entre 20 y 40 min, tras 120 min de digestión. Del mismo modo, Morgan y col. (1999a, 1999b) no encontraron diferencias entre la  $\beta$ -Lg nativa y la glicada en cuanto a su susceptibilidad a la pepsina. La resistencia de la  $\beta$ -Lg a la pepsinólisis ha sido atribuida a su estabilidad a pH ácido, lo cual implica que los sitios de reconocimiento de la pepsina (cadenas laterales de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos) se encuentran ocultos en el interior del barril  $\beta$ , formando un fuerte núcleo hidrofóbico protegido de la hidrólisis (Reddy y col., 1988; Dalgallarrondo y col., 1995). Por tanto, estos resultados sugieren que el estado conformacional de la  $\beta$ -Lg no se vio significativamente afectado por el proceso de glicosilación no enzimática a 40°C, de acuerdo con los resultados de fluorescencia intrínseca e hidrofobicidad superficial obtenidos anteriormente (apartados 4.1.2.6 y 4.1.2.7).



**Figura R48.** Cromatogramas de RP-LC-UV de la  $\beta$ -Lg control calentada y glicada digeridas con pepsina durante 0 y 120 min.

Después de la digestión gástrica con pepsina durante 2 h, el pH se incrementó hasta 6,5, inactivando irreversiblemente la pepsina y mimetizando la transferencia del contenido gástrico al duodeno. A continuación, se adicionaron los enzimas tripsina y quimotripsina junto con una mezcla de sales biliares, para simular el medio duodenal.

De acuerdo con los resultados obtenidos por SDS-PAGE (**Figura R49 (A)**), la  $\beta$ -Lg control calentada (24 h a 40 °C), prácticamente intacta tras la pepsinólisis, fue rápidamente proteolizada durante la digestión duodenal simulada, quedando sólo trazas de proteína intacta a los 15 min.



**Figura R49.** Análisis por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (A) y perfiles cromatográficos obtenidos por RP-LC-UV (B) de la  $\beta$ -Lg control calentada y glicada con Gal o Tag incubadas a 40°C durante 24 h, sometidas a digestión pepsinolítica durante 2 h seguida de digestión con tripsina/quimotripsina durante 15 min. M: marcadores de peso molecular.

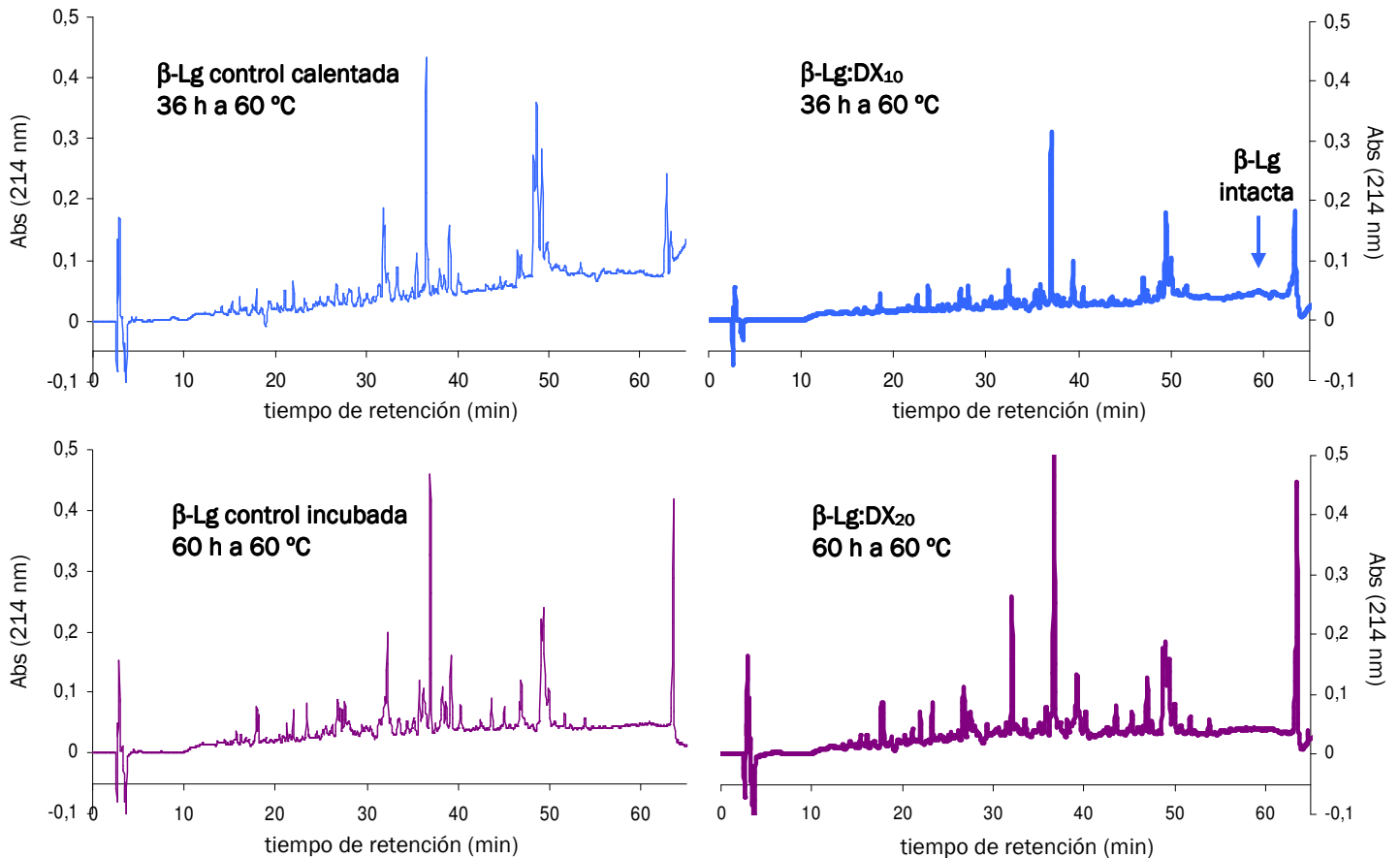
A diferencia de la  $\beta$ -Lg sin glicar, una banda difusa correspondiente a la forma monomérica intacta de la  $\beta$ -Lg glicada podía ser visualizada claramente tras 15 min (**Figura**

**R49 (A)**, calles b y c), e incluso tras 1 h (resultados no mostrados), de digestión con tripsina/quimotripsina, siendo ésta particularmente evidente en el caso de la  $\beta$ -Lg glicada con Gal, que presentó un mayor grado de glicación que la modificada con Tag. Asimismo, ésta mostró una banda tenue correspondiente a la forma dimérica de la  $\beta$ -Lg intacta, no detectada en el caso de la  $\beta$ -Lg tagatosilada, indicando que un mayor grado de glicación puede prevenir la proteólisis enzimática en mayor medida.

Los perfiles cromatográficos obtenidos por RP-LC (**Figura R49 (B)**) revelaron la presencia de una mezcla compleja de péptidos que eluyeron entre los 15 y 50 min, tanto en la  $\beta$ -Lg glicada con Gal o Tag como sin glicar. Aunque la intensidad de los picos cromatográficos fue menor en el caso de la  $\beta$ -Lg glicada, especialmente con Gal, que en la  $\beta$ -Lg sin glicar, confirmando la menor actividad proteásica debida a la glicación, observada por SDS-PAGE (**Figura R49 (A)**).

Del mismo modo que con la glicación con los monosacáridos Gal y Tag, la glicación con dextrano de 10 y 20 kDa tampoco alteró la susceptibilidad a la pepsina de la  $\beta$ -Lg, observándose una gran resistencia a la pepsinólisis tanto de la  $\beta$ -Lg control calentada como glicada con DX<sub>10</sub> y DX<sub>20</sub> (cromatogramas no mostrados). Esto indicó que la glicación en estado sólido a 60 °C con los polisacáridos bajo las condiciones estudiadas no modificó significativamente el estado conformacional de la  $\beta$ -Lg, de acuerdo con Jimenez-Castaño y col. (2007).

Tras la digestión duodenal con tripsina/quimotripsina, los perfiles cromatográficos de la  $\beta$ -Lg control calentada y de la  $\beta$ -Lg glicada con DX<sub>20</sub>, obtenidos por RP-LC-UV, fueron muy similares, no observándose diferencias sustanciales, probablemente debido al pobre grado de glicación de la  $\beta$ -Lg (1,5 moléculas de DX<sub>20</sub> por molécula de  $\beta$ -Lg) (Jiménez-Castaño y col., 2007) como consecuencia de la baja reactividad de este polisacárido (**Figura R50**). Por el contrario, debido al mayor grado de glicación de la  $\beta$ -Lg incubada con el DX<sub>10</sub> (4 moléculas de DX<sub>10</sub> por molécula de  $\beta$ -Lg) (Jiménez-Castaño y col., 2007) y, consecuentemente, al mayor apantallamiento de los residuos de unión de la tripsina y de la quimotripsina, la producción de péptidos tras la digestión gastrointestinal de ésta fue menor que la derivada de la digestión de la  $\beta$ -Lg sin glicar, observándose trazas de proteína glicada intacta tras los 15 min de incubación con tripsina/quimotripsina (**Figura R50**).



**Figura R50.** Perfiles cromatográficos obtenidos por RP-LC-UV de la  $\beta$ -Lg control calentada 36 h a 60 °C;  $\beta$ -Lg control calentada 60 h a 60 °C;  $\beta$ -Lg:DX<sub>10</sub> 36 h a 60 °C;  $\beta$ -Lg:DX<sub>20</sub> 60 h a 60 °C, sometidas a digestión con pepsina durante 2 h seguida de digestión con tripsina/quimotripsina durante 15 min.

De los resultados anteriores se deduce que la glicación, tanto con Gal y Tag como con DX<sub>10</sub>, protege a la  $\beta$ -Lg frente a la proteólisis por tripsina/quimotripsina, lo cual podría ser atribuido a una menor reactividad de la tripsina frente a los residuos de Lys y Arg glicosilados (Henle y Klostermeyer, 1993; Morgan y col., 1997). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lapolla y col. (2001 y 2004) en estudios con seroalbúmina humana y bovina glucosiladas y sin glucosilar, y por Sanz y col. (2007) y Moreno y col. (2008), en sendos estudios llevados a cabo con la  $\beta$ -Lg glicada vía RM con galactooligosacáridos (GOS).

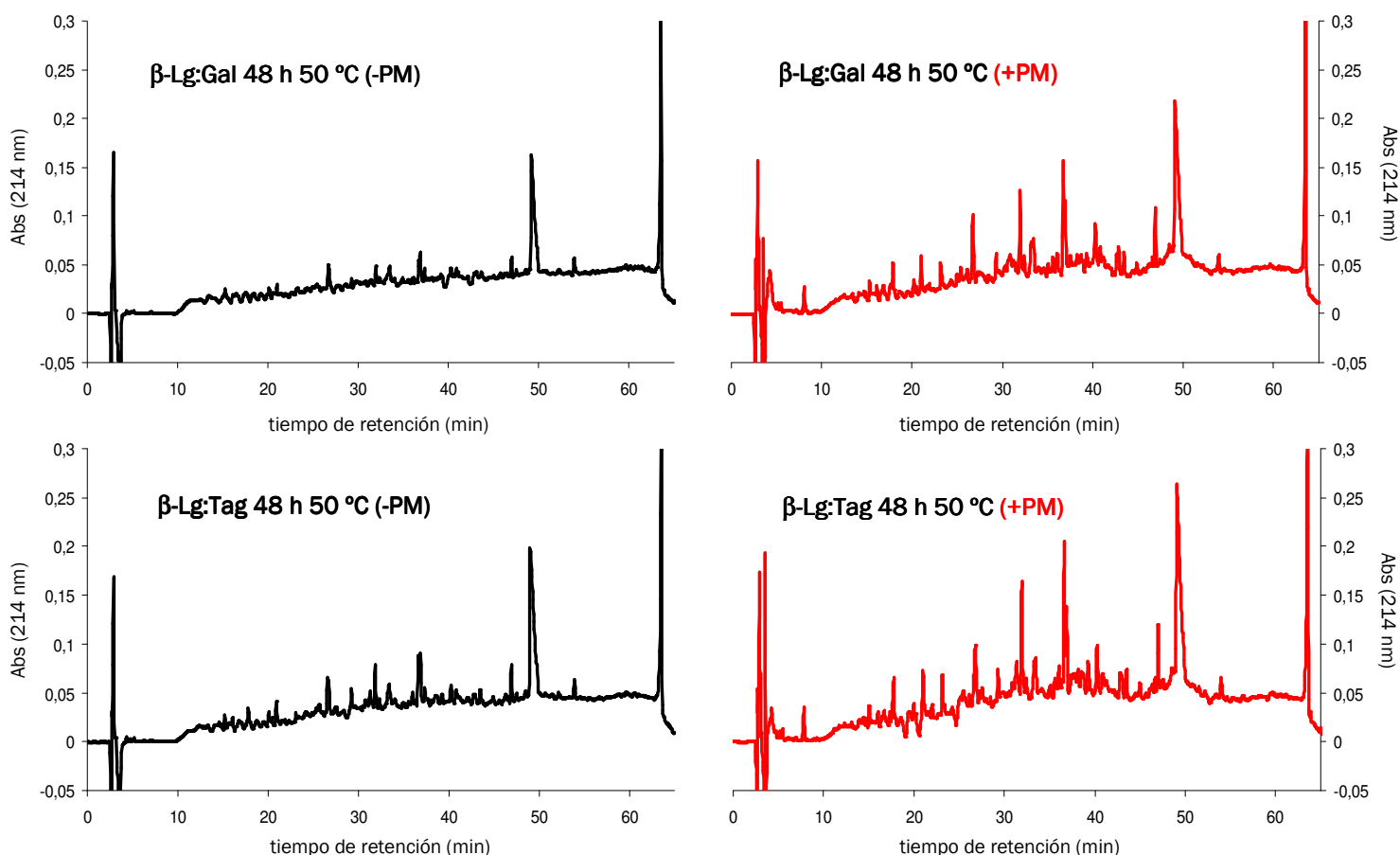
#### **4.6.1.2 Efecto del grado de agregación proteica**

Para estudiar el efecto de la agregación proteica producida durante las etapas avanzadas de la RM sobre la digestibilidad, se analizaron los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag,



obtenidos tras el almacenamiento a 50 °C durante 48 h en presencia y en ausencia de PM, los cuales, a pesar de presentar un grado de glicación similar, diferían notablemente en su grado de polimerización, siendo éste notablemente menor en el caso de las muestras con PM, gracias al efecto inhibitor de este compuesto sobre el avance de la RM (apartado 4.1.3.2).

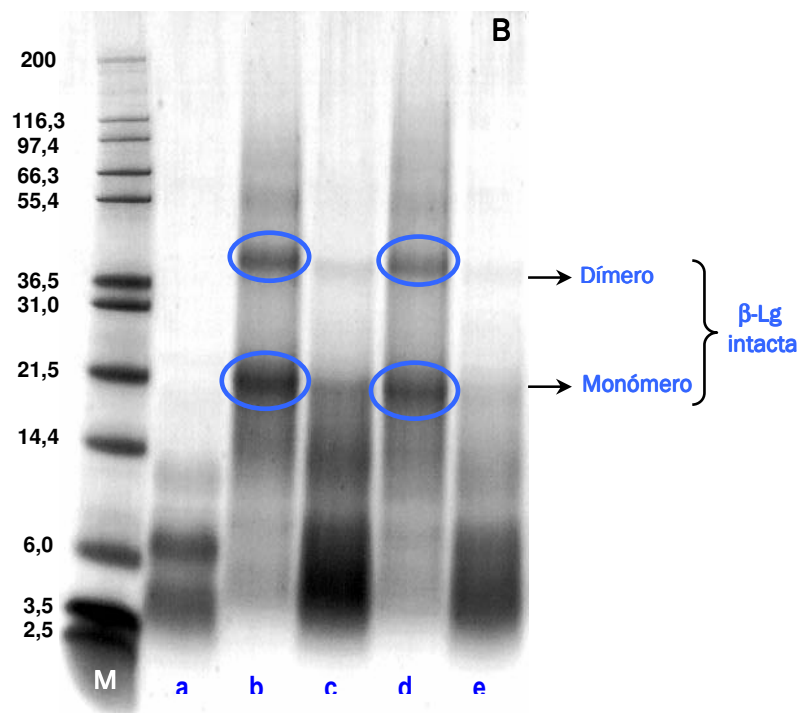
Al igual que en el apartado anterior, todas las muestras estudiadas resultaron prácticamente intactas tras la pepsinólisis (datos no mostrados). Asimismo, los perfiles cromatográficos obtenidos por RP-LC-UV mostraron la formación de péptidos con unos tiempos de retención similares a los anteriores, entre 15 y 50 min. La [Figura R51](#) muestra los cromatogramas obtenidos por RP-LC-UV para los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag, obtenidos tras el almacenamiento a 50 °C durante 48 h en presencia y ausencia de PM, sometidos a digestión con pepsina durante 2 h y con tripsina/quimotripsina durante 15 min.



**Figura R51.** Perfiles cromatográficos obtenidos por RP-LC-UV de la  $\beta$ -Lg glicada con Gal o Tag incubadas 48 h a 50 °C con y sin PM, sometidas a digestión con pepsina durante 2 h seguida de digestión con tripsina/quimotripsina durante 15 min.

Cuando la  $\beta$ -Lg glicada, tanto con Gal como con Tag, se incubó en presencia de PM, se obtuvieron picos cromatográficos de mayor intensidad que en ausencia de PM, sugiriendo un mayor grado de proteólisis. Puesto que la PM inhibe la formación de agregados proteicos, tales resultados sugieren que la agregación proteica inducida por la RM puede también proteger a la  $\beta$ -Lg durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Los resultados de SDS-PAGE confirmaron estos resultados. Así, en ausencia de PM se distinguen claramente 2 bandas de proteína intacta, correspondientes a la  $\beta$ -Lg glicada con Gal o Tag en formas monomérica y dimérica (Figura R52, calles b y d). Mientras que en presencia de PM apenas se detectó proteína intacta, pero sí una gran cantidad de bandas electroforéticas correspondientes a fragmentos peptídicos (Figura R52, calles c y e).



**Figura R52.** Análisis por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras de la  $\beta$ -Lg control calentada sin PM (a),  $\beta$ -Lg:Gal sin (b) y con (c) PM y  $\beta$ -Lg:Tag sin (d) y con (e) PM incubadas 48 h a 50°C, sometidas a digestión con pepsina durante 2 h seguida de digestión con tripsina/quimotripsina durante 15 min. M: marcadores de peso molecular.

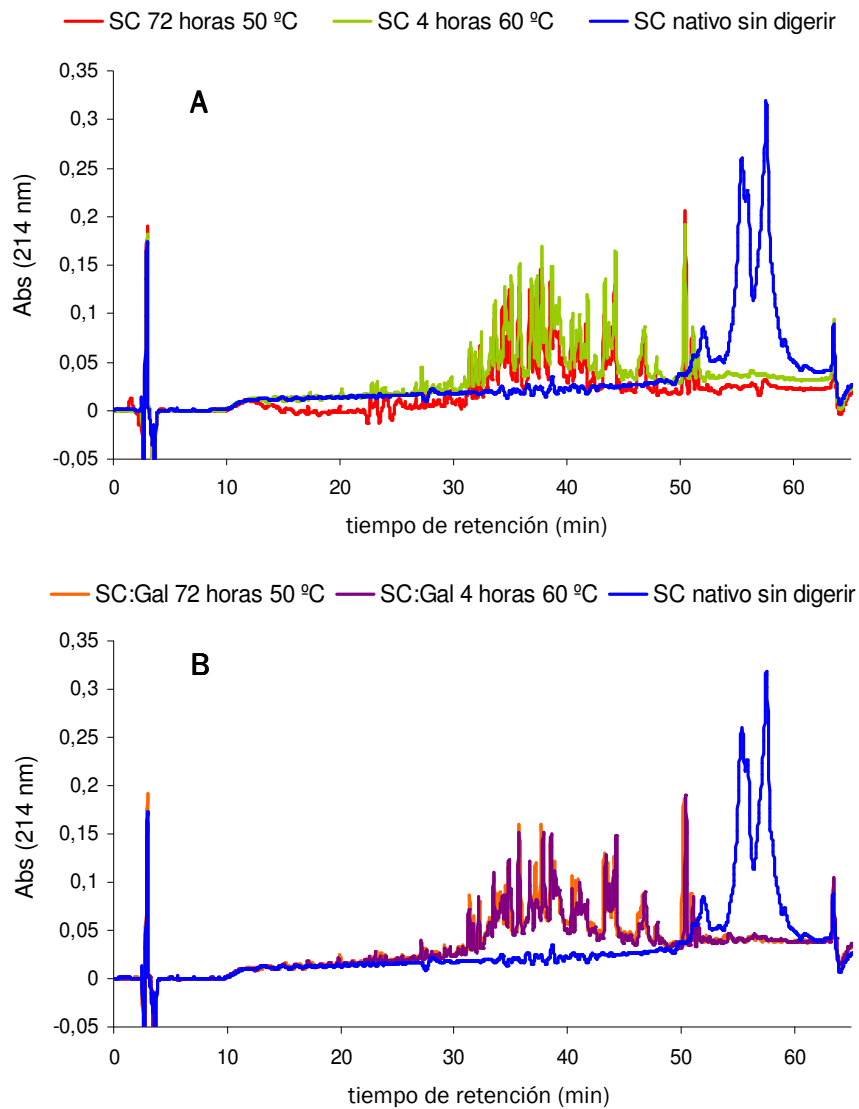
La reducción de la digestibilidad proteica observada en los conjugados sin PM, podría ser atribuida al enmascaramiento de los sitios activos o residuos de unión de la tripsina

(Lys y Arg) y de la quimotripsina (Phe, Tyr, Trp, Leu y Met), como consecuencia del entrecruzamiento y agregación de la  $\beta$ -Lg, inducidos por la conjugación con Gal o Tag durante las etapas avanzadas y finales de la RM. De acuerdo con estos resultados, se ha observado que, durante el avance de la RM, las proteínas Ara h 1 y Ara h 2, alérgenos mayoritarios del cacahuete, forman entrecruzamientos intermoleculares que proporcionan a la proteína cierta protección frente a la digestión con proteasas, debido a la inaccesibilidad de los sitios potenciales de ruptura (Shin y col., 1998; Maleki y col., 2000).

#### **4.6.2 Efecto de la glicación sobre la digestibilidad del caseinato sódico**

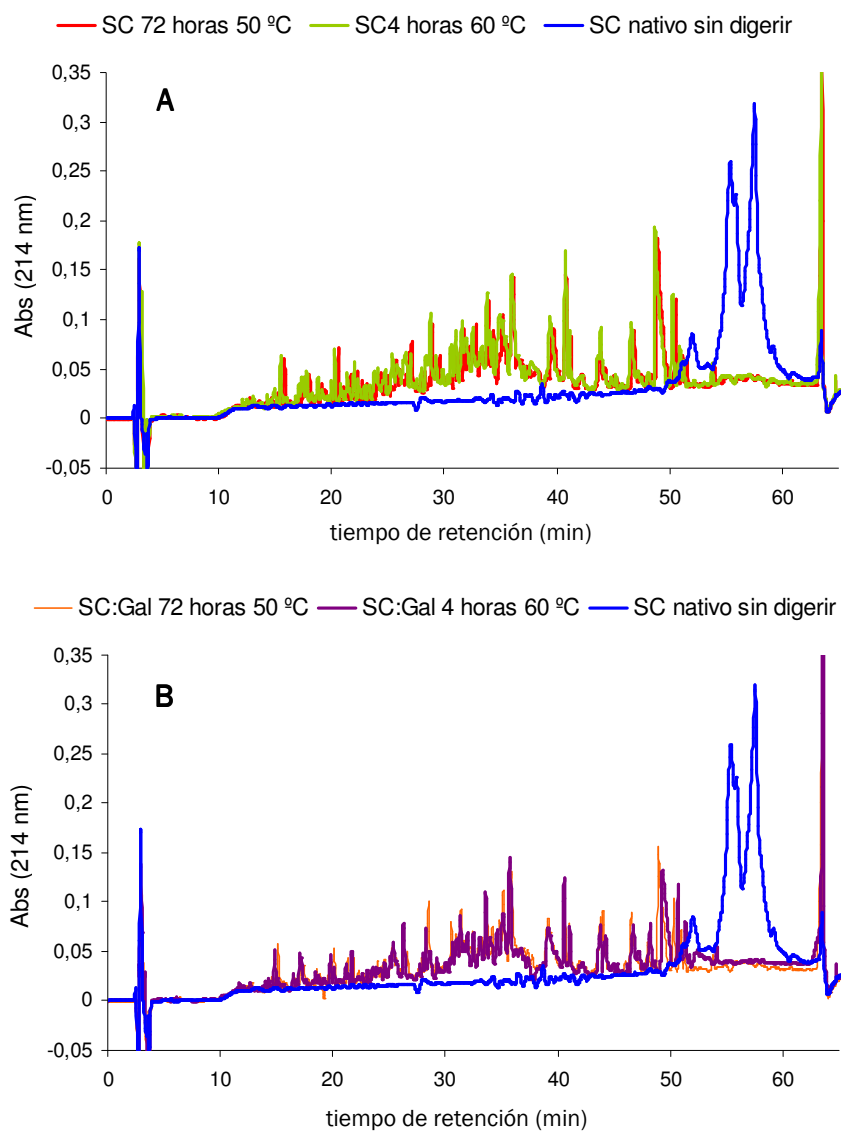
Con el fin de estudiar el efecto de la glicación sobre la digestibilidad del SC, las muestras estudiadas fueron los conjugados SC:Gal obtenidos tras la incubación a 60 °C durante 4 h, condiciones de máxima formación del compuesto de Amadori (Figura R19) y escasa agregación proteica (Tabla R7), y a 50 °C durante 72 h, condiciones que condujeron a un elevado grado de polimerización (Tabla R7).

A diferencia de la  $\beta$ -Lg, tanto el SC nativo y control calentado como glicado con Gal fue rápidamente proteolizado durante la digestión gástrica, dando lugar a patrones similares de péptidos minoritarios, con tiempos de retención entre los 30 y 50 min, y quedando únicamente trazas de proteína intacta a los 30 min de incubación con pepsina (Figura R53). Esto podría ser atribuido a la diferente estructura de ambas proteínas lácteas. Así, en contraste con la estructura rígida y compacta de la  $\beta$ -Lg, que es altamente resistente al medio ácido del estómago y a la acción de la pepsina, las caseínas presentan una conformación abierta y flexible, la cual facilita el acceso de la pepsina hasta sus sitios potenciales de reconocimiento (residuos aromáticos e hidrofóbicos) (Kaminogawa, S. (2000).



**Figura R53.** Cromatogramas de RP-LC-UV de: **(A)** el SC nativo sin digerir y control calentado digerido con pepsina durante 30 min, y **(B)** SC nativo sin digerir y glicosilado con Gal digerido con pepsina durante 30 min.

Asimismo, como se observa en la [Figura R54](#), la digestión con tripsina/quimotripsina durante 15 min (tras 2 h de digestión gástrica) tanto del SC control calentado como glicado dio lugar a unos perfiles peptídicos muy similares, con tiempos de elución entre los 15 y 50 min, no observándose proteína intacta en ninguno de los casos, como era de esperar. Tales resultados indican que, a diferencia de lo observado con la  $\beta$ -Lg, la glicosilación vía RM del SC no tiene ningún efecto relevante sobre su digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, incluso en el caso del SC incubado con Gal a 50 °C durante 72 h ([Figura R54](#)), condiciones que promovieron el avance de la RM y, por tanto, un elevado grado de glicación y de agregación proteica.



**Figura R54.** Perfiles cromatográficos obtenidos por RP-LC-UV de: **(A)** el SC nativo sin digerir y control calentado digerido con pepsina durante 2 h y con tripsina/quimotripsina durante 15 min, y **(B)** el SC nativo sin digerir y glicosilado con Gal digerido con pepsina durante 2 h y con tripsina/quimotripsina durante 15 min.

### **Conclusiones parciales**

Los resultados derivados del estudio del efecto de la glicación con Gal y Tag sobre la digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de la  $\beta$ -Lg indican que la glicosilación vía RM protege a la  $\beta$ -Lg frente a la proteólisis con tripsina/quimotripsina, debido principalmente a la menor reactividad de la tripsina hacia los residuos de Lys y Arg glicosilados. La glicación con DX<sub>10</sub> también aumentó ligeramente la resistencia de la  $\beta$ -Lg a la proteólisis enzimática, como resultado, en este caso, del apantallamiento de los residuos potenciales de corte de los enzimas digestivos, debido al gran tamaño del polisacárido en comparación con el de la

Gal y la Tag. Asimismo, en cuanto al efecto de la agregación proteica, se observó que las reacciones de entrecruzamiento producidas durante las etapas avanzadas de la RM, también dieron lugar a una disminución de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de la  $\beta$ -Lg, probablemente debido al enmascaramiento de los residuos potenciales de corte de la tripsina y de la quimotripsina.

Contrariamente a lo sucedido con la  $\beta$ -Lg, la glicosilación vía RM del SC no tuvo ningún efecto importante sobre su digestibilidad. Tanto el SC glicado como sin modificar fueron rápidamente proteolizados, no quedando proteína intacta tras la digestión gastrointestinal, lo cual podría ser atribuido a la estructura más abierta y flexible del SC y, por tanto, más accesible a la acción proteolítica de los enzimas digestivos, que la de la  $\beta$ -Lg (más globular y compacta).

#### **4.6.3 Caracterización del perfil peptídico por LC-ESI-MS<sup>n</sup>**

Varios estudios han mostrado que el efecto de la glicación sobre la estructura y funcionalidad de las proteínas puede depender, entre otros factores, del sitio de glicación. Por esta razón, es de suma importancia el desarrollo de métodos analíticos que permitan caracterizar las proteínas glicadas e identificar los sitios específicos de glicación.

Por otro lado, dado que el SC está constituido por 4 proteínas distintas, la caracterización del perfil peptídico de los digeridos obtenidos tras su digestión gastrointestinal simulada resultaría enormemente más complicada que la de los digeridos derivados de la  $\beta$ -Lg. Así, este apartado se llevará a cabo una caracterización detallada por LC-ESI-MS<sup>n</sup> de los digeridos obtenidos tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de la  $\beta$ -Lg glicada con Gal y Tag, usando para ello un analizador de trampa iónica tridimensional, con el fin de obtener más información sobre la secuencia de los péptidos sin glicar y, especialmente, de los péptidos glicados, así como de desarrollar un método preciso que nos permita conocer los sitios específicos de glicación.

##### **4.6.3.1 Análisis por LC-ESI(+)-MS<sup>2</sup>**

Debido a la complejidad del perfil cromatográfico obtenido por RP-LC-UV para los digeridos de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal [24 h a 40 °C] y Tag [24 y 48 h a 40 y 50 °C, respectivamente] (Figuras R49 (B) y R51), fue necesario llevar a cabo un

análisis por ESI(+)-MS<sup>2</sup> para conseguir una caracterización exhaustiva de los péptidos glicosados y sin glicar generados.

#### **4.6.3.1.1 Caracterización de los péptidos no glicosados**

Tras el análisis por LC-ESI(+)-MS<sup>2</sup> del hidrolizado de  $\beta$ -Lg nativa se identificaron 56 péptidos, mientras que en los digeridos de la  $\beta$ -Lg glicosada con Gal [24 h a 40 °C], Tag [24 h a 40 °C] y Tag [48 h a 50 °C] se pudieron identificar 31, 37 y 30 péptidos sin glicar, respectivamente (**Tabla R10**). Los péptidos identificados en los digeridos de la  $\beta$ -Lg nativa y glicosada cubrieron, respectivamente, alrededor del 88% y del 77% de la secuencia primaria de la  $\beta$ -Lg. Como era de esperar, los péptidos no glicosados produjeron espectros de colisión en los que predominaban los iones típicos de las series *b* e *y* (datos no mostrados), según la nomenclatura propuesta por Roepstorff y Fohlman (1984).

#### **4.6.3.1.2 Caracterización de los péptidos glicosados**

##### ➤ *Péptidos galactosilados*

Los espectros de MS<sup>2</sup> de los péptidos glicosados con Gal se caracterizaron por dos pérdidas neutras de 54 y 84 u, correspondientes a la formación, a partir del ión oxonio del azúcar, de los iones pirilio y furilio, respectivamente (**Figura R55 (A)**). Esta ruta de disociación ya había sido anteriormente descrita para los compuestos de Amadori derivados de aldohexosas (Yaylayan y Sporns, 1987; Jeric y col., 2002; Horvat y Jakas, 2004).

**Tabla R10.** Péptidos no glicosados identificados por LC-ESI-MS<sup>2</sup> en los digeridos de la  $\beta$ -Lg control calentada y glicosada con Gal y Tag.

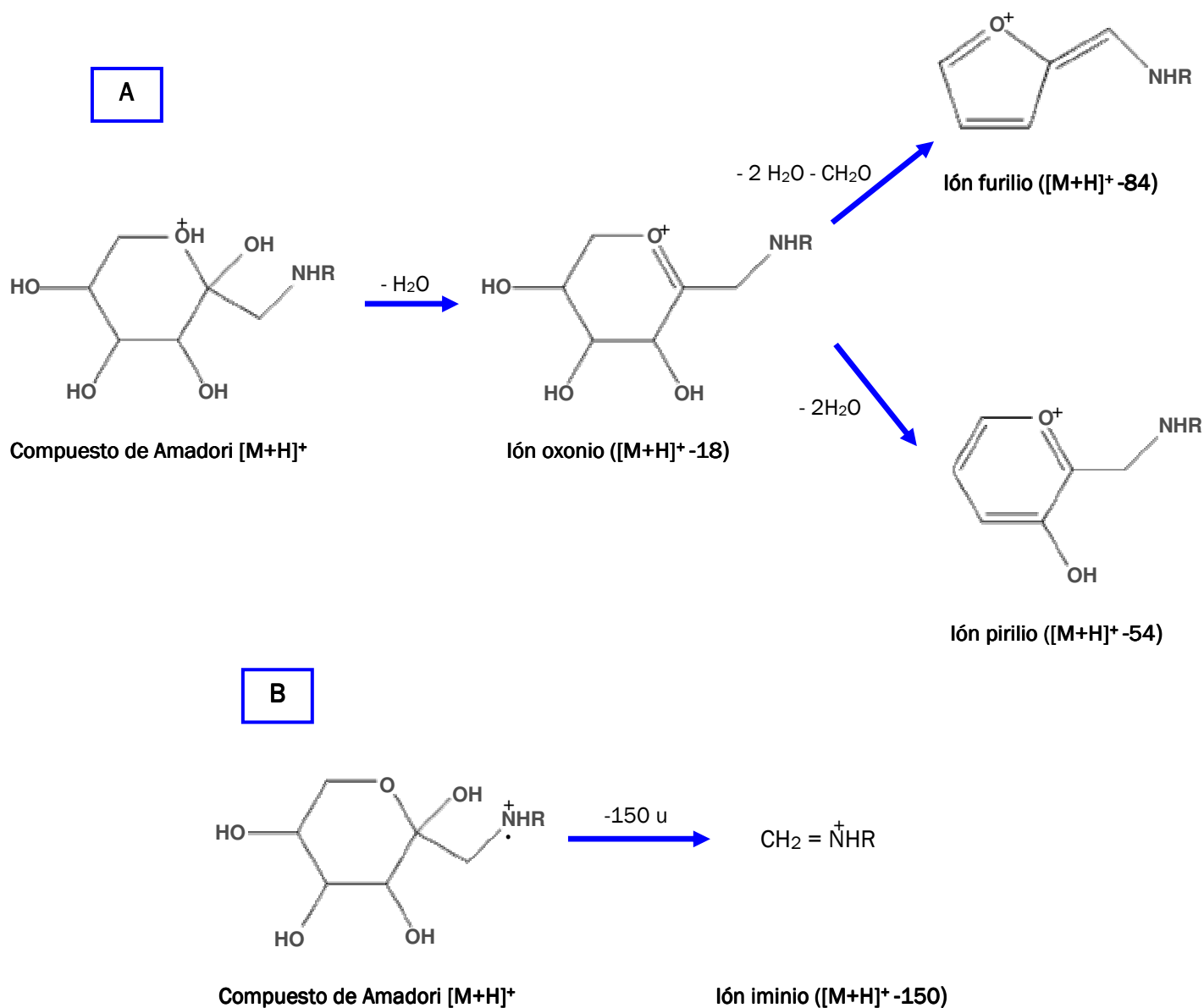
Tiempo de retención (min)	Secuencia peptídica	Posición	Masa Exp. [M+H] <sup>a</sup>	Masa teórica [M+H] <sup>a</sup>	Estado de carga principal	$\beta$ -Lg control calentada	$\beta$ -Lg+Gal 24 h a 40°C	$\beta$ -Lg+Tag 24 h a 40°C	$\beta$ -Lg+Tag 48 h a 50°C
2,7	KVAGT	14-18	475,0	475,2	+1	X*	X	X	
3,9	IIAEK	71-75	573,3	573,4	+1	X	X	X	X
3,9	KIDALNENK	83-91	1044,6	1044,6	+1	X	X	X	X
3,9	VRTPEVDD	123-130	930,4	930,5	+1	X	X	X	X
4,4	VLDTDYK	94-100	853,4	853,5	+1	X	X	X	X
4,6	KIDALN	83-88	673,3	673,4	+1	X	X	X	X
5,1	KIDALNE	83-89	802,4	802,4	+1	X	X	X	X
5,7	VFKIDA	81-86	692,2	692,4	+1	X	X	X	X
5,9	DAQSAPL	33-39	701,2	701,5	+1	X	X	X	X
7,0	QSAPLRV	35-41	770,4	770,5	+1	X			
7,0	ELKPTPEGDLE	45-55	1227,5	1227,6	+1	X			
7,0	LKPTPEGDL	46-54	969,4	969,5	+1	X	X	X	X
7,8	YSLA	20-23	453,0	453,2	+1	X	X	X	X
8,2	LIVTQTMK	1-8	933,4	933,5	+1	X	X	X	X
8,5	VTQTMK	3-8	707,2	707,4	+1	X			
10,5	ELKPTPEGDL	45-54	1098,5	1098,6	+1	X	X	X	X
10,5	DAQSAPLRV	33-41	956,4	956,5	+1	X			
11,1	VLVLDTDYK	92-100	1065,5	1065,6	+1	X	X	X	X
11,8	LDAQSAPL	32-40	814,1	814,4	+1	X	X	X	X
13,3	VLVLDTDYKK	92-101	1193,6	1193,7	+2	X			
13,3	DTDYKK	96-101	769,3	769,4	+1	X			
13,3	LDTDYKK	95-101	882,3	882,5	+1	X			
13,3	VLDTDYKK	94-101	981,5	981,5	+1	X			
14,5	TPEVDDEALEK	125-135	1245,5	1245,6	+2	X	X	X	X
15,2	VEELKPTPEGDL	43-54	1326,5	1326,7	+2	X	X	X	X
15,6	DKALKALPMHIRL	137-149	1505,8	1505,9	+2	X			
16,2	VLDTDYKKYL	94-103	1257,5	1257,7	+2	X			
17,1	WENGECAQKK	61-70	1192,4	1192,5	+1	X	X	X	X



17,5	LIVTQTM	1-7	805,2	805,4	+1	X	X	X	X
19,2	VAGTWY	15-20	696,2	696,3	+1	X	X	X	X
19,7	FNPTQL	151-156	719,2	719,4	+1	X		X	
20,9	SFNPTQL	150-156	806,2	806,4	+1	X	X	X	X
21,2	IPAVFKIDALNENKVL	78-93	1784,4	1784,0	+2	X	X	X	X
21,2	LPMHIR	143-148	766,3	766,4	+1	X	X	X	
21,6	ALPMHIR	142-148	837,4	837,5	+1	X		X	
22,8	PEGDLEIL	50-57	885,1	885,5	+1	X	X	X	X
23,3	TPEVDDEALEKFDK	125-138	1635,6	1635,8	+2	X	X	X	X
23,9	KIDALNENKVL	83-93	1256,6	1256,7	+1	X			
23,9	TKIPAVFK	76-83	903,5	903,6	+1	X			
24,3	VRTPEVDDEALEKFDK	123-138	1891,0	1890,9	+3	X			
24,3	AASDISLL	25-32	789,2	789,4	+1	X	X	X	X
24,5	KYLLFCME	101-108	1046,5	1046,5	+1	X			
24,5	APLRVYVE	37-44	946,7	946,5	+1	X			
26,6	TKIPAVF	76-82	775,3	775,5	+1	X	X	X	X
28,0	QKKIIAEKTKI	68-78	1299,4	1299,8	+1	X		X	
28,6	AASDISLLDAQSAPL	25-39	1471,4	1471,8	+1	X		X	
28,8	VEELKPTPEGDLEIL	43-57	1681,9	1681,9	+2	X			
28,9	GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	9-40	3361,6	3361,8	+2	X			X
29,2	AMAASDISLL	23-32	991,3	991,5	+1	X	X	X	X
30,5	SLAMAASDISLLDAQSAPLR	21-40	2030,2	2030,1	+2	X	X		
30,5	VEELKPTPEGDLEILLQK	43-60	2051,0	2051,1	+2	X		X	X
30,5	VRTPEVDDEALEKF	123-136	1647,5	1647,8	+2	X		X	
30,8	RVYVEELKPTPEGDLEILLQK	40-60	2469,4	2469,4	+3	X		X	
31,5	VYVEELKPTPEGDLEILLQK	41-60	2313,2	2313,3	+2	X	X	X	X
32,3	RVYVEELKPTPEGDLEILLQ	40-59	2341,0	2341,3	+2	X			
33,0	SLAMAASDISLL	21-32	1191,4	1191,6	+1	X	X	X	X

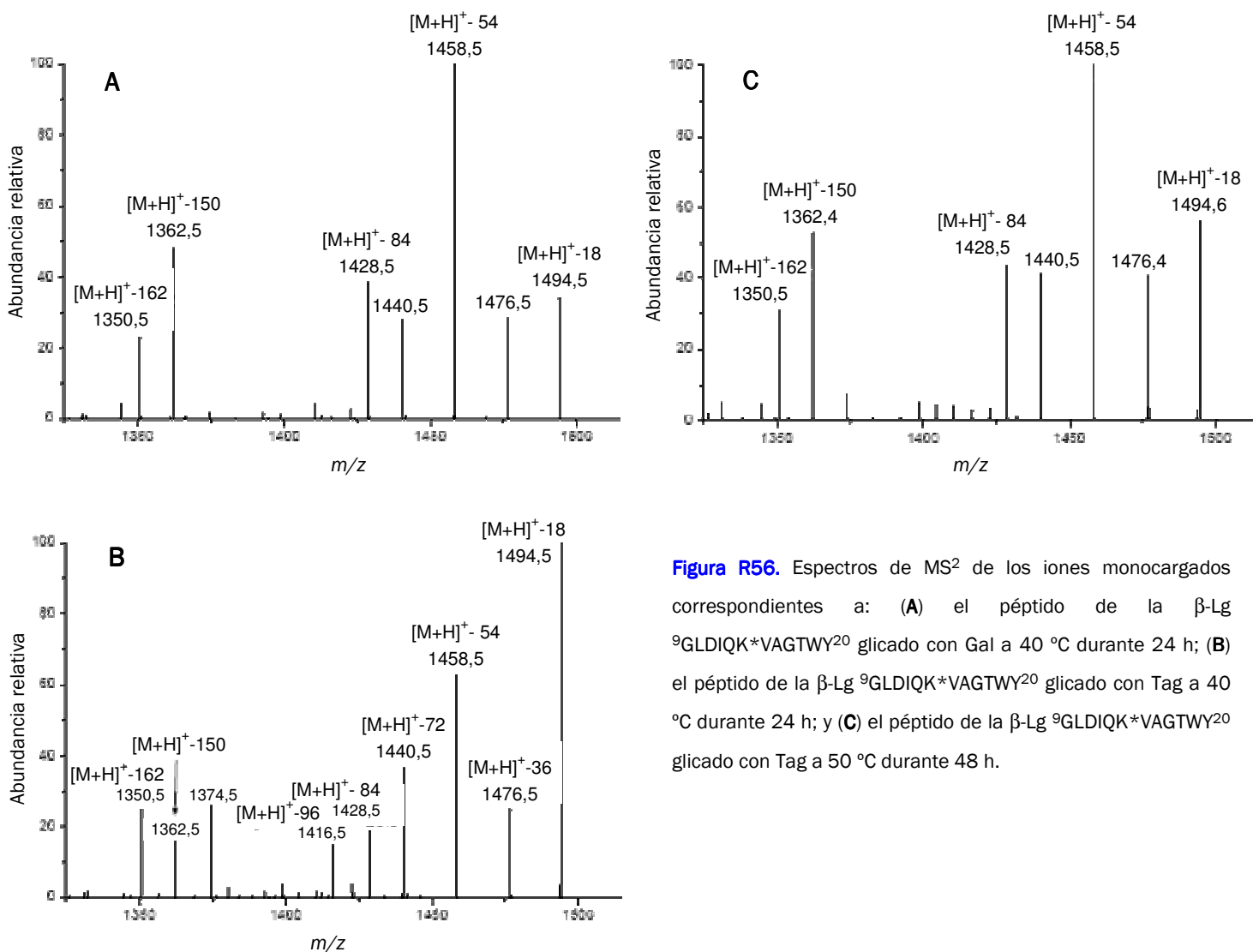
<sup>a</sup> Valores de masa monoisotópicos.

\* La X indica la detección del péptido en la muestra.



**Figura R55.** Rutas de disociación propuestas para los péptidos glicosilados con aldo- y ceto-hexosas tras el análisis por ESI(+)-MS<sup>2</sup>.

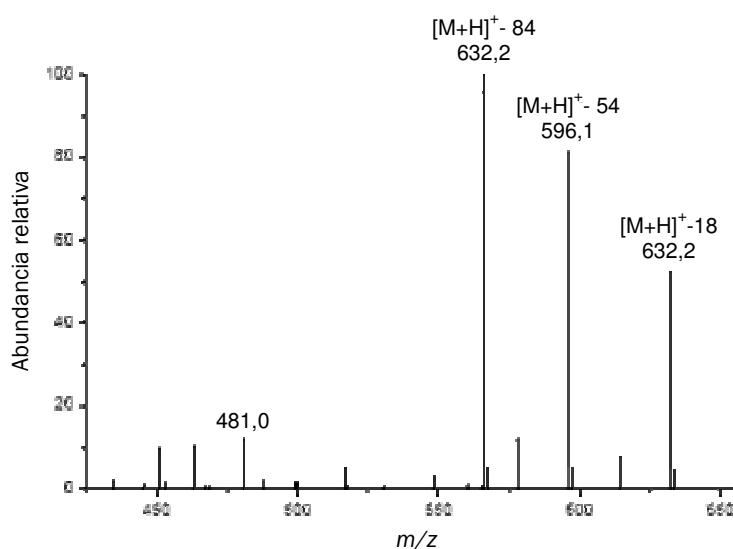
Además, en nuestro caso, los espectros de MS<sup>2</sup> de 5 péptidos galactosilados, <sup>83</sup>K-E<sup>89</sup>, <sup>45</sup>E-L<sup>54</sup>, <sup>43</sup>V-L<sup>54</sup>, <sup>9</sup>G-W<sup>19</sup> y <sup>9</sup>G-Y<sup>20</sup>, mostraron un pico a  $[M+H]^+ -150$  de una intensidad mayor del 50% del pico base. En la **Figura R56 (A)** se muestra, a modo de ejemplo, el espectro de MS<sup>2</sup> obtenido para el péptido <sup>9</sup>G-Y<sup>20</sup>. Esta pérdida neutra podría ser atribuida a la formación del ión iminio producido por la  $\alpha$ -fragmentación del enlace unido al nitrógeno del aminoácido (**Figura R55 (B)**).



**Figura R56.** Espectros de MS<sup>2</sup> de los iones monocargados correspondientes a: **(A)** el péptido de la  $\beta$ -Lg <sup>9</sup>GLDIQK\*VAGTWY<sup>20</sup> glicado con Gal a 40 °C durante 24 h; **(B)** el péptido de la  $\beta$ -Lg <sup>9</sup>GLDIQK\*VAGTWY<sup>20</sup> glicado con Tag a 40 °C durante 24 h; y **(C)** el péptido de la  $\beta$ -Lg <sup>9</sup>GLDIQK\*VAGTWY<sup>20</sup> glicado con Tag a 50 °C durante 48 h.

Yaylayan y Sporns (1989) describieron al ión iminio como un importante ión diagnóstico para la identificación de los compuestos de Amadori por técnicas de espectrometría de masas basadas en la ionización por impacto electrónico. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, esta es la primera evidencia de la presencia de este ión en los espectros de péptidos glicosilados obtenidos mediante el análisis por espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray en modo positivo y un analizador de trampa iónica. De acuerdo con los resultados mostrados en la [Tabla R11](#), el ión iminio estuvo presente en 26 de los 27 péptidos galactosilados identificados en este estudio, siendo en todos los casos mucho más abundante que el ión correspondiente al péptido no glicado ( $[M+H]^+-162$ ), el cual, en muchos de los espectros de MS<sup>2</sup> no se pudo detectar. Además, observando los espectros de MS<sup>2</sup> de estos 26 péptidos galactosilados fue posible encontrar una relación entre la formación del ión iminio y la longitud de la cadena

peptídica. De modo que la fragmentación por MS<sup>2</sup> de los péptidos glicosados más pequeños, constituidos por 6 o menos residuos de aminoácidos, no condujeron a la formación del ión iminio (<sup>13</sup>Q-A<sup>16</sup>) o ésta fue muy débil (<sup>71</sup>I-K<sup>75</sup>, <sup>99</sup>Y-Y<sup>102</sup>, <sup>141</sup>K-M<sup>145</sup>, <sup>136</sup>F-L<sup>140</sup> y <sup>90</sup>N-L<sup>95</sup>). Con el fin de confirmar esta observación, se analizó por ESI(+)-MS<sup>2</sup> el tetrapéptido sintético acetil-SDKP glicosado previamente en nuestro laboratorio con Gal. Como se observa en la **Figura R57**, el correspondiente espectro se caracterizó por los iones furilio, pirilio y oxonio, pero el ión iminio no se detectó. En este sentido, Pallante y Cassady (2002) observaron que los iones peptídicos experimentan más rápidamente la transferencia de protones cuanto menor es la longitud de la cadena peptídica. Es importante mencionar que la localización de estos protones añadidos puede afectar a la disociación del péptido bajo condiciones de MS<sup>2</sup>, pudiendo alterar la información de la secuencia obtenida (Pallante y Cassady, 2002).



**Figura R57.** Espectro de MS<sup>2</sup> del ión monocargado correspondiente al péptido sintético acetil- SDK\*P glicosado con Gal a 40 °C durante 24 h.

**Tabla R11.** Péptidos glicosados identificados por LC-ESI-MS<sup>2</sup> en los digeridos de la  $\beta$ -Lg glicosada con Gal y Tag.

Tiempo de retención (min)	Secuencia peptídica	Posición	Masa Exp. [M+H] <sup>+</sup> <sup>a</sup>	Masa teórica [M+H] <sup>+</sup> <sup>a</sup>	Estado de carga	Masa de los péptidos glicosados [M+H] <sup>+</sup> <sup>a</sup>	$\beta$ -Lg:Gal 24 h 40°C	$\beta$ -Lg:Tag 24 h 40°C	$\beta$ -Lg:Tag 48 h 50°C
3,97	YK*K*Y	99-102	601,1	601,3	+1	925,4 <sup>b</sup>	X		
4,05	K*IDALNENK	83-91	1044,5	1044,6	+1; +2	1206,5	X		X
5,11	K*IDALNE	83-89	802,3	802,4	+1	964,3	X		X
5,56	K*ALPM	141-145	559,3	559,3	+1	721,3	X	X	X
5,56	IIAEK*	71-75	573,3	573,4	+1	735,3	X	X	X
7,18	LK*PTPEGDL	46-54	969,5	969,5	+1; +2	1131,5	X		X
7,92	QK*VA	13-16	445,2	445,3	+1	607,2	X	X	X
8,10	L*IVTQTMK	1-8	933,4	933,5	+1; +2	1095,4	X	X	X
10,45	ELK*PTPEGDL	45-54	1098,5	1098,6	+1; +2	1260,5	X		
10,69	FDK*AL	136-140	593,2	593,3	+1	755,2	X		X
11,09	IQK*VAGTW	12-19	902,4	902,5	+1 +2	1064,4	X		X
14,62	K*IDALNENK*VL	83-93	1256,7	1256,7	+1; +2	1580,6 <sup>b</sup>	X		X
15,14	VEELK*PTPEGDL	43-54	1326,7	1326,7	+1; +2	1488,7	X		X
16,80	L*IVTQTM	1-7	805,3	805,4	+1	967,3	X	X	X
17,99	TPEVDDEALEK*FDK	125-138	1635,7	1635,8	+1; +2; +3	1797,6	X	X	X
23,51	ALK*ALPM	139-145	743,4	743,4	+1	905,4	X	X	X
23,94	K*IDALNENKVL	83-93	1256,7	1256,7	+1; +2	1418,7	X	X	X
24,69	TPEVDDEALEK*F	125-136	1392,5	1392,7	+1; +2	1554,5	X		X
24,92	NK*VLVL	90-95	685,4	685,5	+1	847,4	X	X	X
25,30	TK*IPAVF	76-82	775,4	775,5	+1	937,4	X	X	X
26,92	IIAEK*TK*IPAVF	71-82	1329,6	1329,8	+1; +2	1653,6 <sup>b</sup>	X		X
27,81	GLDIQK*VAGTW	9-19	1187,5	1187,6	+1; +2	1349,5	X	X	X
29,58	GLDIQK*VAGTWY	9-20	1350,6	1350,7	+1; +2	1512,6	X	X	X
30,92	VEELK*PTPEGDLEILLQK	43-60	2051,2	2051,1	+2; +3	2213,2	X	X	X
31,63	VYVEELK*PTPEGDLEILLQK	41-60	2313,2	2313,3	+2	2475,2	X	X	X
32,49	RVYVEELK*PTPEGDLEILLQ	40-59	2341,4	2341,3	+2; +3	2503,4	X	X	X
32,90	VEELK*PTPEGDLEILLQ	43-59	1922,8	1923,0	+2	2084,8	X		

\* Indica el aminoácido glicosado; <sup>a</sup> Valores de masa monoisotópicos; <sup>b</sup> Glicosado con dos moléculas de monosacárido.

➤ *Péptidos tagatosilados*

Tras los análisis por LC-ESI(+)-MS<sup>2</sup> de los hidrolizados de la β-Lg incubada con Tag bajo condiciones suaves (24 h a 40 °C) y más severas (48 h a 50 °C), se identificaron 15 y 24 péptidos tagatosilados, respectivamente (**Tabla R11**). Sorprendentemente, ambos digeridos mostraron un comportamiento de fragmentación diferente. De modo que los péptidos derivados de la β-Lg incubada con Tag durante 24 h a 40 °C dieron lugar a espectros de MS<sup>2</sup> caracterizados por la presencia de iones correspondientes a los fragmentos obtenidos por las pérdidas neutras de 18, 36, 54, 72, 84 y 96 u, mientras que la formación del correspondiente ión iminio fue muy limitada o no detectada. A modo de ejemplo, la **Figura R56 (B)** muestra el espectro de MS<sup>2</sup> del péptido tagatosilado <sup>9</sup>G-Y<sup>20</sup>. Este comportamiento de fragmentación está de acuerdo con el patrón de fragmentación previamente descrito por Frolov y col. (2006) para el compuesto de Heyns derivado de la glicación del hexapéptido modelo AGGKAA con fructosa y, analizado por QqTOF-MS<sup>2</sup>. Dichos autores explicaron este patrón de fragmentación de forma análoga al de los compuestos de Amadori (**Figura 56 (A)**), por la pérdida consecutiva de 1 a 4 moléculas de agua (18, 36, 54 y 72 u), así como por las pérdidas de [3 x H<sub>2</sub>O + CH<sub>2</sub>O] (pérdida neutra de 84 u) y de [2 x H<sub>2</sub>O + H<sub>4</sub>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (pérdida neutra de 96 u) en la parte del azúcar, produciendo diferentes iones oxonio y, finalmente, los iones pirilio y furilio. Por tanto, el patrón de fragmentación descrito para la estructura del azúcar del compuesto de Heyns derivado de la glicación con fructosa propuesto por Frolov y col. (2006) es compatible con los péptidos tagatosilados bajo condiciones suaves de incubación (24 h a 40°C). Por último, es importante destacar el hecho de que la pérdida neutra de 96 u no se detectó, ni siquiera a niveles bajos de abundancia, en el patrón de fragmentación por MS<sup>2</sup> de los péptidos galactosilados, siendo, por tanto, específica de los compuestos de Heyns derivados de cetohechosas, como la Tag.

Por otro lado, los espectros de MS<sup>2</sup> de los péptidos glicosilados obtenidos tras la incubación de la β-Lg con Tag bajo condiciones más severas (48 h a 50 °C) mostraron un patrón de fragmentación similar al de los péptidos galactosilados [24 h a 40 °C], ya que se caracterizaron principalmente por la presencia de iones correspondientes a los fragmentos obtenidos por las pérdidas neutras de 18, 54, 84 y 150 u (**Figura R56 (C)**). Esta diferencia en el comportamiento de fragmentación por MS<sup>2</sup> entre los péptidos tagatosilados obtenidos bajo diferentes condiciones de incubación podría ser debida, al menos en parte, a que la velocidad de tautomerización de las cetosas es altamente dependiente de la temperatura (Naranjo y col., 1998) y, consecuentemente, el patrón de fragmentación por

MS<sup>2</sup> podría resultar afectado por la diferente composición de los tautómeros de Tag obtenidos a 40 y 50 °C. En este sentido, la pérdida consecutiva de hasta cuatro moléculas de agua (18, 36, 54, 72 u), la cual se observó en mayor medida tras la incubación de la β-Lg con Tag a 40 °C que a 50 °C, ha sido asociada a la forma furanosa (Frolov y col., 2006). Así, este hecho podría indicar un mayor porcentaje de la forma furanosa en los compuestos de Heyns derivados de la Tag obtenidos a 40 °C que en los obtenidos a 50 °C. De acuerdo con esto, se ha descrito que los anómeros de piranosa son favorecidos termodinámicamente (Yaylayan y Huyghues-Despointes, 1994). Por otro lado, las cetosas y grupos amino pueden experimentar reordenamientos irreversibles para dar no sólo compuestos de Heyns, sino también compuestos de Amadori (MacPherson y col., 1988; Mossine y col., 1996)), de modo que un cambio en la temperatura podría también favorecer el mecanismo de formación del compuesto de Amadori como resultado de la tagatosilación.

Para resumir, puede concluirse que el análisis de digeridos proteicos por LC-ESI-MS<sup>2</sup> con un analizador de trampa iónica, basado en la monitorización de las pérdidas neutras, es un método eficaz y directo para identificar péptidos glicosilados derivados tanto del reordenamiento de Amadori como del de Heyns. Sin embargo, debido a que el patrón de fragmentación predominante fue el derivado de la estructura del azúcar, la formación de los iones *b* e *y*, resultantes de la fragmentación de la cadena peptídica y, por tanto, indicativos de la secuencia aminoacídica, fue muy escasa o, incluso, inexistente, impidiendo la caracterización de la secuencia peptídica, así como de los correspondientes sitios específicos de glicosilación.

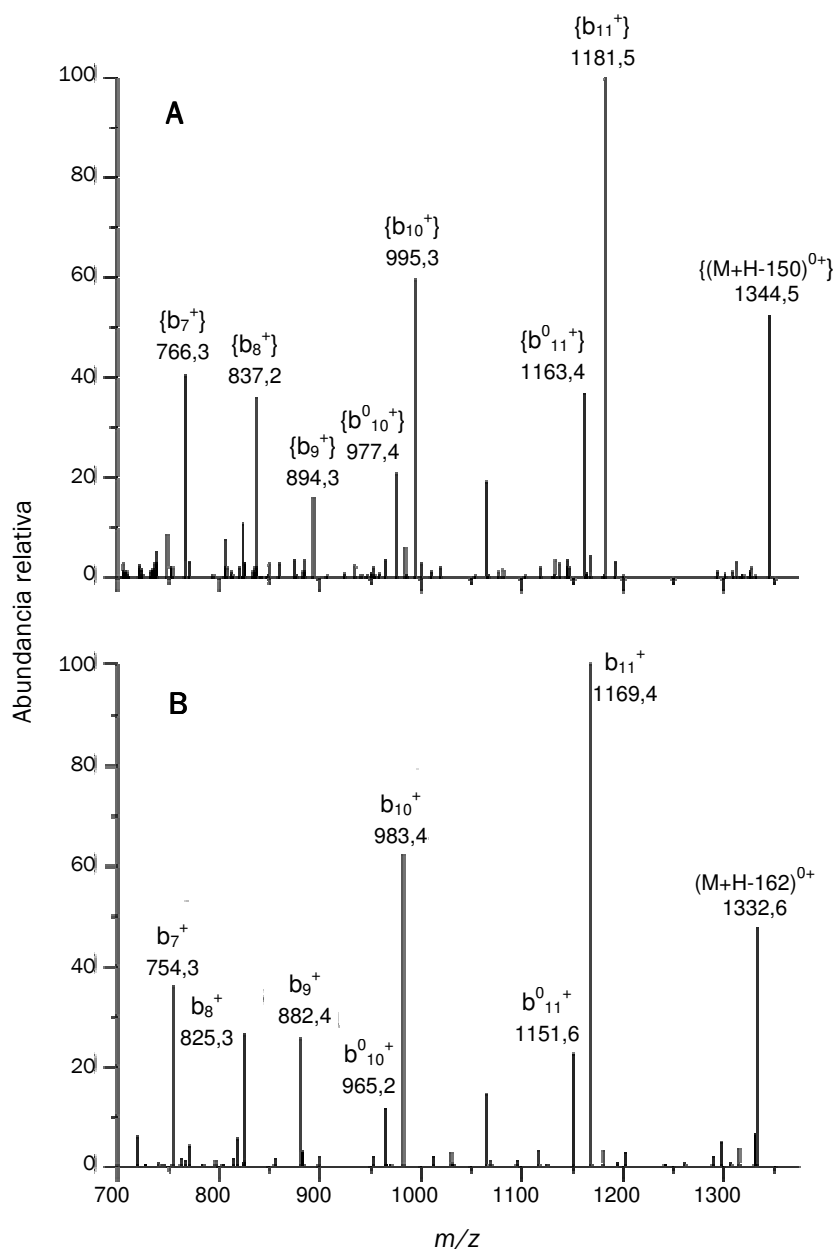
#### **4.6.3.2 Análisis de los péptidos glicosilados por LC-ESI(+)-MS<sup>3</sup> y MS<sup>4</sup>**

Con el fin de elucidar la secuencia peptídica, se llevaron a cabo, como primer intento, una serie de experimentos adicionales para obtener los espectros de MS<sup>3</sup> a partir de los iones furilio y pirilio generados por colisión, detectados en los espectros de MS<sup>2</sup> de los péptidos tagatosilados y galactosilados. Sin embargo, bajo estas condiciones, sólo se generaron unos pocos iones minoritarios que no pudieron ser relacionados con la secuencia peptídica (datos no mostrados). Lapolla y col. (2004) y Moreno y col. (2008) encontraron resultados similares tras el análisis por MS<sup>3</sup> a partir de los iones oxonio y furilio generados por colisión, derivados de los péptidos glicosilados con glucosa y galactooligosacáridos, respectivamente. Zhang y col. (2007), quienes también realizaron un análisis por MS<sup>3</sup> a partir del ión furilio derivado de péptidos glicosilados, indicaron que,

aunque este ión es abundante, el proceso CID (disociación inducida por colisión) puede romper preferentemente ciertos enlaces amida dentro de la estructura del azúcar antes que ciertos enlaces presentes en la cadena peptídica, debido a limitaciones del proceso, es decir, a la localización de la carga y al efecto del residuo. Asimismo, las condiciones suaves de colisión producidas en la trampa iónica favorecen en gran medida a que tengan lugar procesos de descomposición que requieren de una baja energía, como la pérdida de moléculas de agua, más favorecida energéticamente que la ruptura de enlaces peptídicos (Lapolla y col., 2004).

La segunda estrategia empleada para la caracterización de la secuencia peptídica se llevó a cabo considerando que, por un lado, el ión iminio estuvo normalmente presente en una abundancia relativa en los espectros de MS<sup>2</sup> de los péptidos galactosilados (24 h a 40 °C) y de los tagatosilados obtenidos bajo condiciones severas de incubación (48 h a 50 °C), y que, por otro lado, la estructura del ión iminio carece de anillo furanosa o piranosa, evitando los problemas descritos en el anterior párrafo. Por ello, se realizaron una serie de análisis de MS<sup>3</sup> a partir de los iones iminio generados por colisión, con el objetivo de obtener suficientes fragmentos iónicos relacionados con la cadena peptídica. Como resultado, el ión iminio, empleado como precursor de fragmentos adicionales, dio lugar a espectros de MS<sup>3</sup> caracterizados preferentemente por los iones de la serie *b*, obtenidos a partir del extremo N-terminal (**Figura R58 (A)**). Esto permitió una identificación exacta de la secuencia peptídica, así como la asignación del residuo de lisina glicado (**Tabla R11**). Además, es importante resaltar que gran parte de los iones *b* generados mostraron un incremento de 12 u, debido al residuo CH<sub>2</sub> unido al grupo ε-amino de la lisina modificada (**Figura R55 (B)**), mientras que los espectros de MS<sup>3</sup> obtenidos a partir del ión generado por colisión correspondiente al péptido no glicado ([M+H]<sup>+</sup>-162), en aquellos casos en los que este ión pudo detectarse con una abundancia moderada, se caracterizaron por iones *b* no modificados con sus correspondientes deshidrataciones (**Figura R58 (B)**).

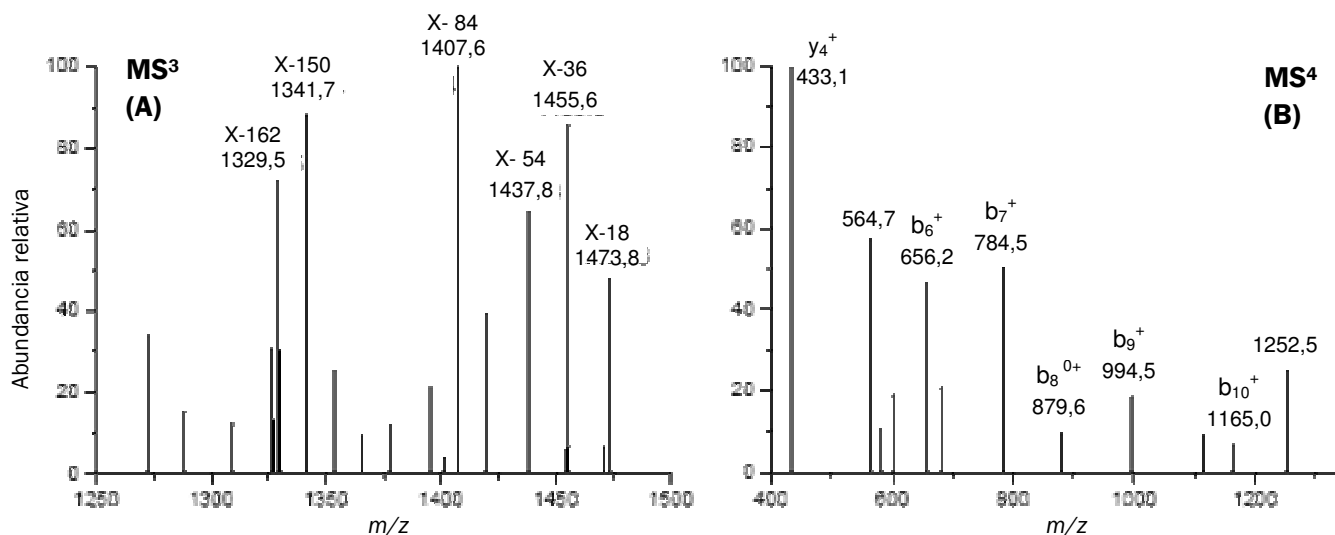




**Figura R58.** Espectros de MS<sup>3</sup> de iones monocargados correspondientes al péptido de la β-Lg <sup>9</sup>GLDIQK\*VAGTWY<sup>20</sup> glicosado con Gal a 40 °C durante 24 h obtenidos a partir **(A)** del ión iminio ([M+H]<sup>+</sup> - 150) y **(B)** del ión del péptido no glicosado ([M+H]<sup>+</sup> - 162) generados por colisión y derivados del análisis por MS<sup>2</sup>. La nomenclatura empleada para los fragmentos iónicos fue la de Roepstorff y col. (1984) y Johnson y col. (1987); <sup>0</sup> indica la pérdida neutra de una molécula de agua.

Finalmente, también se identificaron tres péptidos diglicosados que contenían dos residuos de lisina, <sup>99</sup>Y-Y<sup>102</sup>, <sup>83</sup>K-L<sup>93</sup> y <sup>71</sup>I-F<sup>82</sup>, ambos ocupados con Tag y/o Gal (**Tabla R11**). En estos casos, los espectros de MS<sup>3</sup> obtenidos a partir tanto del ión iminio generado por colisión como del ión correspondiente al péptido no glicosado, derivados del análisis por MS<sup>2</sup>, se caracterizaron por sucesivas pérdidas neutras de 54, 84, 150 u, e incluso, de 162 u,

indicando la existencia de una segunda unidad de monosacárido en la molécula. Sin embargo, los iones de secuencia informativa *b* e *y* no se detectaron de forma significativa en estos espectros de MS<sup>3</sup> (Figura R59 (A)).



**Figura R59.** Espectros de MS<sup>3</sup> (A) y MS<sup>4</sup> (B) de los iones monocargados correspondientes al péptido de la β-Lg <sup>71</sup>IIAEK\*TK\*IPAVF<sup>82</sup> diglicado con Gal a 40 °C durante 24 h obtenido a partir del ión generado por colisión correspondiente al péptido no glicado ([M+H]<sup>+</sup> - 162) (indicado como X) derivado de los análisis por MS<sup>2</sup> y MS<sup>3</sup>, respectivamente. La nomenclatura empleada para los fragmentos iónicos fue la de Roepstorff y col. (1984) y Johnson y col. (1987); <sup>0</sup> indica la pérdida neutra de una molécula de agua.

Consecuentemente, fue necesario generar espectros de MS<sup>4</sup> a partir del ión iminio o del ión del péptido no glicado, ambos derivados del análisis por MS<sup>3</sup>, para identificar la secuencia de aminoácidos de estos péptidos con dos residuos de lisina glicados (Figura R59 (B)). En este último caso, y a diferencia de los espectros de MS<sup>3</sup> indicativos de la secuencia peptídica mostrados hasta el momento, se pudo observar un fragmento de la serie *y* (obtenidos a partir del extremo C-terminal), concretamente el fragmento *y*<sub>4</sub> (<sup>79</sup>P-F<sup>82</sup>, ión m/z 433,1), que presentaba una gran abundancia relativa (Figura R59 (B)). La presencia de este ion, con una intensidad relativamente alta, se puede atribuir al llamado “efecto prolina”, que es un proceso que favorece la fragmentación por el grupo N-terminal de la prolina (Hunt y col., 1986; Schaaff y col., 2000). En este sentido, se ha descrito que los iones *y* que contienen un residuo de prolina en su extremo N-terminal pueden tener una mayor abundancia en los espectros de masas en tándem debido a su relativamente alta estabilidad (Schaaff y col., 2000).

Una vez más, ha sido demostrada la capacidad de los analizadores de trampa iónica para realizar etapas múltiples de fragmentación ( $MS^n$ ) como un método eficaz para la caracterización estructural de péptidos glicosilados con aldosas y cetosas. Este proceso sólo es posible, a un coste razonable, en analizadores de trampa iónica, ya que éstos pueden realizar espectrometría de masas en tándem en el tiempo. Sin embargo, no es posible con sistemas acoplados o híbridos como el triple cuadrupolo o el QqTOF, ya que únicamente son capaces de obtener espectros de masas/masas en el espacio.

### ***Conclusiones parciales***

En este estudio se muestra el comportamiento de fragmentación de los péptidos galactosilados (a través del reordenamiento de Amadori) y tagatosilados (a través del reordenamiento de Heyns) de la  $\beta$ -Lg mediante análisis por LC-ESI- $MS^n$  en un espectrómetro con analizador de trampa iónica tridimensional. Con respecto al análisis por LC-ESI- $MS^2$ , además de la ruta de disociación descrita previamente para los compuestos de Amadori derivados de aldohexosas, es decir, la formación de los iones pirilio ( $[M+H]^+-54$ ) y furilio ( $[M+H]^+-84$ ) via ión oxonio ( $[M+H]^+-18$ ), se ha descrito otra ruta de fragmentación más directa, la cual implica la formación del ión iminio ( $[M+H]^+-150$ ) derivado de los compuestos de Amadori y de Heyns formados tras la glicación de la  $\beta$ -Lg con Gal y Tag, respectivamente. La identificación directa de los sitios específicos de glicación por  $MS^2$  en un analizador de trampa iónica no fue posible debido a que los iones *b* e *y*, resultantes de la fragmentación de la cadena peptídica, apenas se formaron bajo las condiciones de disociación de  $MS^2$ . Sin embargo, los iones iminio derivados de los compuestos de Amadori y de Heyns, obtenidos tras el análisis por  $MS^2$ , resultaron ser de gran utilidad como precursores de los análisis de  $MS^3$  para identificar la secuencia peptídica y permitir la asignación exacta de los sitios específicos de glicación. Asimismo, los espectros de  $MS^4$  del ión correspondiente al péptido no glicado y/o del ión iminio permitieron la identificación de la secuencia de aminoácidos en el caso de los péptidos diglicosilados. La importancia del ión imino radica en su abundancia relativa y en que conserva las características del péptido original sin ninguna molécula de azúcar unida, permitiendo una fragmentación “clásica” acorde a un péptido sin modificar.

En conclusión, los resultados presentados en este apartado indican que los espectros de  $MS^3$  obtenidos a partir del ión iminio generado por colisión podrían permitir secuenciar de una forma directa los péptidos glicosilados con aldohexosas y cetohexosas.

## **4.7 INMUNORREACTIVIDAD *IN VITRO***

Como se indicó anteriormente en la sección de Introducción, los estudios publicados sobre el efecto de la glicosilación no enzimática en la actividad alérgica de las proteínas alimentarias ofrecen resultados contradictorios (Hattori y col., 1994; Maleki y col., 2000; Pastorello y col., 2002; Taheri-Kafrani y col., 2009). Además, todos esos trabajos se han llevado a cabo con los glicoconjugados intactos, sin someterlos previamente a un proceso de digestión gastrointestinal, obviando, de este modo, la influencia de la glicosilación vía RM sobre la resistencia de los alérgenos a la digestión, lo cual es un factor clave, ya que la mayoría de los alérgenos alimentarios, entre ellos las proteínas lácteas en estudio, sensibilizan al individuo a través del tracto gastrointestinal.

Por otro lado, puesto que la naturaleza y extensión de los cambios producidos por la RM en la conformación proteica y, por tanto, sobre el potencial alérgico de las proteínas, va a depender, entre otros factores, de la reactividad del azúcar reductor, es de interés el estudio del efecto de la glicación con carbohidratos de distinto peso molecular sobre la inmunorreactividad proteica. En este sentido, se ha descrito, que la glicación de una proteína con polisacáridos podría reducir su alergenidad de manera más eficaz que la conjugación de proteínas con monosacáridos, ya que los polisacáridos cubrirían mejor los epítomos de los alérgenos que los carbohidratos de menor peso molecular dificultando en mayor medida su reconocimiento por anticuerpos IgE (Sehon, 1982, Hattori y col., 1994; Hattori y col., 2000a, 2000b).

Así, en el presente trabajo se evaluó la inmunorreactividad (reactividad IgG e IgE) de la  $\beta$ -Lg y del SC, alérgenos mayoritarios de la leche, tras su conjugación vía RM con carbohidratos de distinto peso molecular, bajo las condiciones indicadas en Tabla M10.

### **4.7.1 Glicoconjugados de $\beta$ -lactoglobulina**

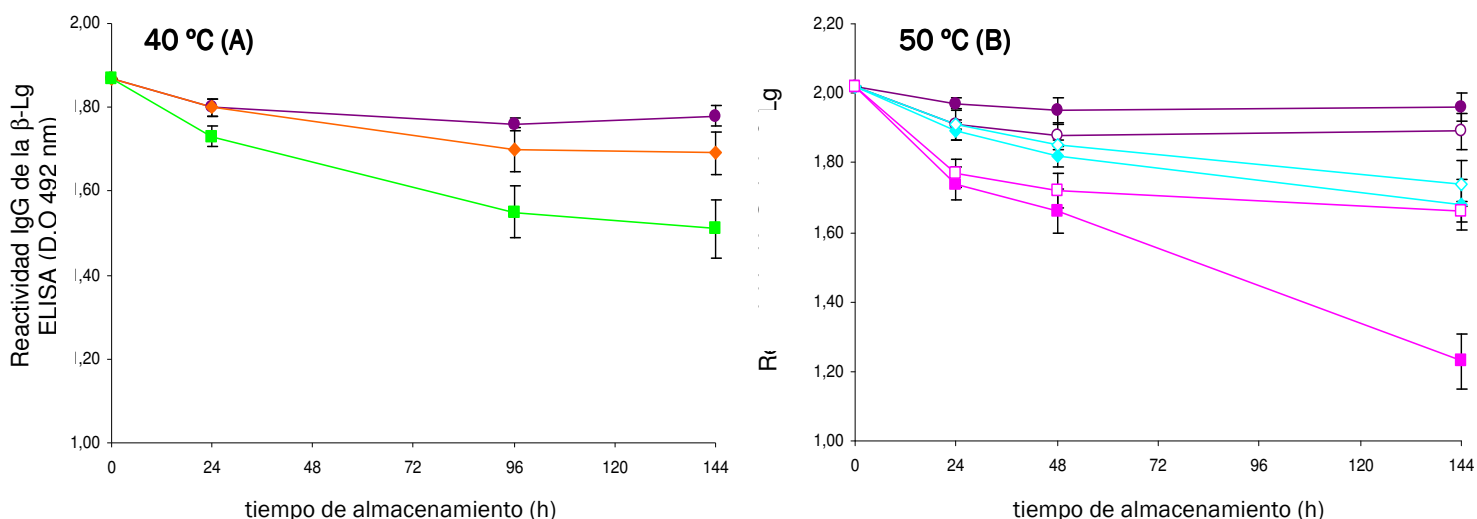
Para determinar el efecto de la glicosilación vía RM sobre la inmunorreactividad de la  $\beta$ -Lg, los complejos  $\beta$ -Lg:Gal/Tag/DX<sub>10</sub>/DX<sub>20</sub>, sometidos o no a un proceso de digestión gastrointestinal simulada, se analizaron mediante ELISA directo e indirecto empleando anticuerpos comerciales (reactividad IgG) y sueros de niños alérgicos a las proteínas de leche de vaca (reactividad IgE).

#### **4.7.1.1 Reactividad IgG de la $\beta$ -lactoglobulina glicada sin digerir**

Con el fin de estudiar el efecto del avance de la RM sobre la reactividad IgG de la  $\beta$ -Lg, se analizaron por ELISA directo los glicoconjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag sin digerir, obtenidos tras la incubación durante 144 h a 40 y 50°C, en presencia y ausencia de PM. Para estudiar el efecto del grado de glicación sobre la reactividad IgG de la  $\beta$ -Lg, nos fijamos principalmente en los conjugados obtenidos a 40 °C durante 24 h (estructura y conformación de la proteína nativa poco alterada), mientras que para estudiar el efecto de los cambios estructurales (agregación proteica) inducidos en la proteína durante su glicación, nos fijamos en los conjugados obtenidos tras largos periodos de incubación a 40 °C y, especialmente, a 50 °C. Además, el empleo de la piridoxamina (PM), como inhibidor de las etapas avanzadas de la RM, podría ser de gran utilidad para evaluar el impacto del progreso de esta reacción sobre la inmunorreactividad proteica.

##### **4.7.1.1.1 Efecto del grado de glicación**

Como se observa en la [Figura R60 \(A\)](#), la respuesta antigénica de la  $\beta$ -Lg control calentada fue ligeramente menor que la de la  $\beta$ -Lg nativa ( $t = 0$ ). Asimismo, mientras que la respuesta IgG de la  $\beta$ -Lg glicada con Tag a 40 °C durante 24 h fue similar a la de la  $\beta$ -Lg control calentada, la  $\beta$ -Lg galactosilada [24 h, 40 °C], resultó ser significativamente ( $P < 0,5$ ) menos reactiva a IgG que el control calentado. Estos resultados pueden ser debidos al mayor número de moléculas de Gal (14 moléculas) que de Tag (3 moléculas) unidas a la  $\beta$ -Lg y, por tanto, al mayor número de residuos de lisina modificados, algunos de los cuales podrían formar parte de ciertos epítomos reconocidos por anticuerpos IgG. Estos resultados concuerdan con los obtenidos recientemente por Taheri-Kafrani y col. (2009) en un estudio acerca del efecto de la glicación con distintos monosacáridos sobre la inmunorreactividad de la  $\beta$ -Lg. Estos autores describieron que, mientras que una glicación limitada apenas afecta el reconocimiento antigénico de la  $\beta$ -Lg, un elevado grado de glicación podría enmascarar las regiones antigénicas de la  $\beta$ -Lg, impidiendo su reconocimiento por los anticuerpos. Estos autores atribuyeron este comportamiento al hecho de que la modificación de los residuos de lisina presentes en epítomos alergénicos (epítomos lineales) debilita o previene la unión de anticuerpos específicos a los mismos.



**Figura R60.** Efecto de la glicación sobre la reactividad IgG de la β-Lg a 40°C (A) y 50°C (B). A 40 °C: —●— β-Lg control calentada; —■— β-Lg:Gal; —◆— β-Lg:Tag. A 50 °C: β-Lg control calentada —○— con y —●— sin PM; β-Lg:Gal —□— con y —■— sin PM; β-Lg:Tag —◇— con y —◆— sin PM. Los datos representan la media de tres determinaciones.

#### 4.7.1.1.2 Efecto de la agregación proteica

A tiempos largos de incubación (144 h), tanto a 40 (Figura R60 (A)) como a 50 °C (Figura R60 (B)), la reactividad IgG de la β-Lg glicada, especialmente con Gal a 50 °C, fue claramente inferior a la de la β-Lg nativa y control calentada, lo cual podría estar relacionado con el mayor grado de glicación de la proteína, así como con los cambios estructurales inducidos por el avance de la RM. Además, la reactividad IgG de la β-Lg glicada con Gal a 50 °C durante 144 h en ausencia de PM (condiciones que favorecen en mayor medida la formación de agregados proteicos) resultó ser significativamente ( $P < 0,5$ ) menor ( $P < 0,5$ ) que la de la β-Lg galactosilada en presencia de PM (con un menor grado de agregación) (Figura R60 (B)). Tales resultados sugieren que, a tiempos largos de incubación, la reducción observada en la respuesta a IgG de la β-Lg se debe fundamentalmente a la formación de agregados proteicos, los cuales podrían enmascarar las regiones antigénicas (epítopos lineales y conformacionales) de la β-Lg, evitando su reconocimiento por los anticuerpos IgG. De acuerdo con estos resultados, Nakamura y col. (2006) encontraron que la conjugación vía RM de la tropomiosina de calamar (TM) con un carbohidrato altamente reactivo como la ribosa redujo su inmunorreactividad, lo que se atribuyó a las modificaciones estructurales de la TM derivadas de las etapas avanzadas de la RM.

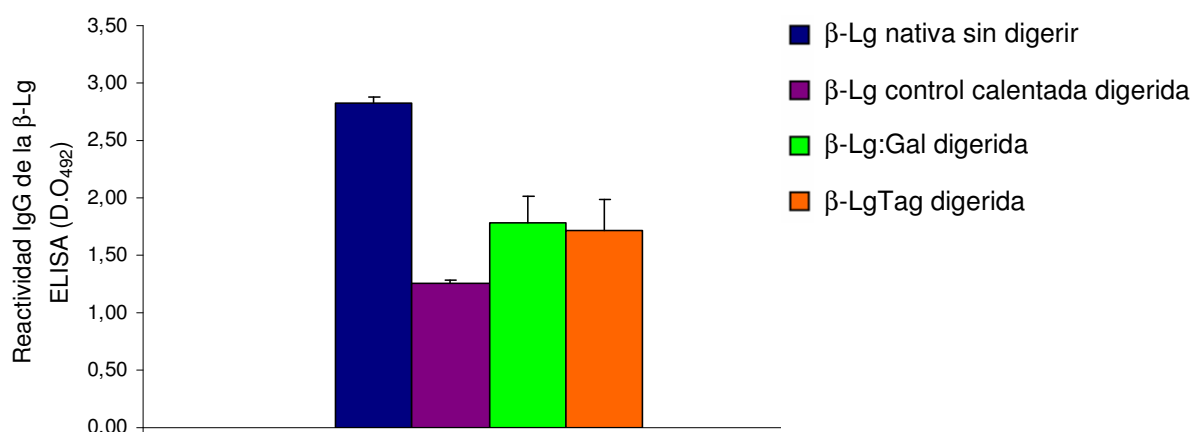
#### 4.7.1.2 Inmunorreactividad de la $\beta$ -lactoglobulina glicada y sometida a digestión gastrointestinal *in vitro*

A continuación, se determinó la reactividad IgG e IgE de los glicoconjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag/DX<sub>10</sub>/DX<sub>20</sub>, previamente sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro*, con el fin de simular las condiciones fisiológicas. A pesar de que durante la fase de digestión duodenal con tripsina/quimotripsina se recogieron alícuotas a los 15, 30, 60 y 120 min para su posterior análisis, se estudiaron solamente las de 15 min, ya que se estima que éste es el tiempo aproximado de tránsito de los antígenos por el intestino delgado hasta la primera placa de Peyer o punto de absorción en el íleon terminal (Neutra y col., 1999; Moreno y col., 2005a).

##### 4.7.1.2.1 Efecto del grado de glicación

###### ➤ Glicación con galactosa y tagatosa

En la [Figura R61](#) se muestra la reactividad IgG de la  $\beta$ -Lg nativa sin digerir y de la  $\beta$ -Lg control calentada y glicada [24 h, 40°C], previamente sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro*.



**Figura R61.** Reactividad IgG de la  $\beta$ -Lg nativa sin digerir y de los hidrolizados (pepsina 2 h + tripsina/quimotripsina 15 min) de la  $\beta$ -Lg control calentada y glicada, incubadas durante 24 h a 40°C.

A pesar de que la respuesta antigénica de la  $\beta$ -Lg control calentada digerida fue significativamente ( $P < 0,5$ ) menor que la de la  $\beta$ -Lg nativa sin digerir, la primera todavía exhibía una clara respuesta contra IgG. Aunque tras su digestión no quedó proteína intacta (ver apartado 4.6.1.1), algunos de sus fragmentos peptídicos podrían retener epítomos antigénicos, responsables de la reactividad IgG residual observada. Asimismo, los digeridos resultantes de la digestión de la  $\beta$ -Lg glicada con Gal y Tag [24 h, 40 °C], mostraron una mayor reactividad IgG con respecto a la de la  $\beta$ -Lg control calentada digerida (Figura R61). Este hecho podría ser atribuido a la menor digestibilidad mostrada por los glicoconjugados respecto a la proteína sin modificar (ver apartado 4.6.1.1). Con el fin de comprobar estos resultados, se estudió la reactividad IgE de la  $\beta$ -Lg nativa sin digerir y de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal, previamente sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro*, empleándose, para ello, tres sueros humanos (Tabla R12).

**Tabla R12.** Efecto de la glicación con Gal y posterior digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la respuesta contra anticuerpos IgE de la  $\beta$ -Lg.

Muestra		Condiciones de incubación		Reactividad IgE (D.0492)		
		Tª (°C)	t (h)	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Sin digerir	$\beta$ -Lg nativa	---		1,50 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,84 ± 0,06	3,30 ± 0,14
	$\beta$ -Lg nativa	---		0,85 ± 0,01	1,87 ± 0,02	1,90 ± 0,02
Digeridas	$\beta$ -Lg control calentada	40	24	0,83 ± 0,03	1,87 ± 0,07	1,88 ± 0,05
	$\beta$ -Lg:Gal			0,95 ± 0,05*	2,17 ± 0,12*	2,11 ± 0,02*
	$\beta$ -Lg control calentada	50	48	0,84 ± 0,04	1,89 ± 0,06	1,82 ± 0,02
$\beta$ -Lg:Gal	0,82 ± 0,04			1,94 ± 0,04	1,79 ± 0,06	

\*Indica que existen diferencias significativas entre la muestra y el control calentado correspondiente ( $P < 0,05$ ).

<sup>a</sup>Los datos son la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar de la media.

Como cabía esperar, todas las muestras digeridas presentaron una reactividad IgE menor que la de la  $\beta$ -Lg nativa sin digerir, probablemente debido a la pérdida de epítomos lineales y conformacionales durante el proceso digestivo. Sin embargo, todas ellas presentaron una respuesta residual contra IgE, lo cual podría ser atribuido a la presencia de epítomos antigénicos en algunos de sus fragmentos peptídicos. Además, la reactividad IgE de los controles calentados digeridos fue similar a la de la  $\beta$ -Lg nativa digerida, sugiriendo que el tratamiento térmico no tuvo ningún efecto sobre la inmunorreactividad de



la  $\beta$ -Lg. En relación al efecto de la glicación, sólo en el caso de la  $\beta$ -Lg galactosilada [24 h, 40 °C] digerida se observó una inmunorreactividad significativamente ( $P < 0,5$ ) mayor a la de la  $\beta$ -Lg control calentada digerida, confirmando, así, los resultados anteriores, derivados del estudio de la reactividad IgG

Por último, considerando los epítomos IgE lineales mayoritarios, descritos en la bibliografía para la  $\beta$ -Lg bovina (Tabla R13), y haciendo uso de la caracterización por LC-ESI-MS<sup>n</sup> del perfil peptídico de los digeridos de  $\beta$ -Lg control calentada y glicada con Gal y Tag (apartado 4.6.3.1, Tablas R10 y R11), se puede observar que una serie de péptidos, tales como <sup>1</sup>L-K<sup>8</sup>, <sup>21</sup>S-R<sup>40</sup>, <sup>40</sup>R-Q<sup>59</sup>, <sup>40</sup>R-K<sup>60</sup>, <sup>41</sup>V-K<sup>60</sup>, <sup>43</sup>V-K<sup>60</sup>, <sup>68</sup>Q-I<sup>78</sup>, <sup>78</sup>I-L<sup>93</sup>, <sup>90</sup>N-A<sup>111</sup>, <sup>123</sup>V-F<sup>136</sup>, <sup>128</sup>V-M<sup>145</sup> y <sup>149</sup>L-I<sup>162</sup>, contienen al menos uno de los epítomos principales de unión a IgE (Figura R62). Por tanto, estos fragmentos capaces de sobrevivir a la digestión gastrointestinal *in vitro*, tanto de la  $\beta$ -Lg glicada como sin glicar, podrían contribuir a la reactividad IgE de los digeridos.

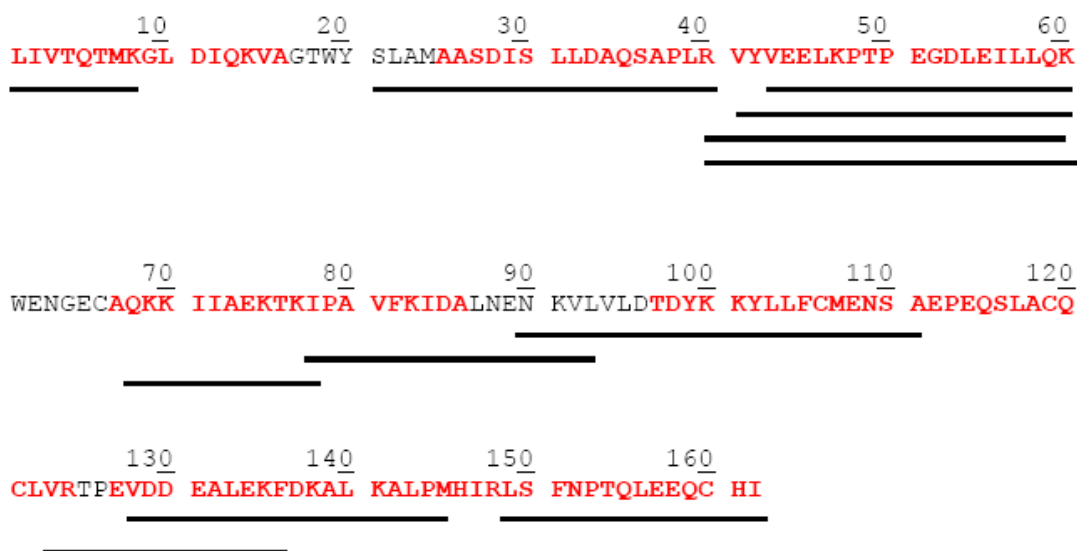
**Tabla R13.** Epítomos IgE lineales mayoritarios en la  $\beta$ -Lg.

Fragmentos peptídicos de unión a IgE	Referencia
124-134	Adams y col. (1991)
97-108	Ball y col. (1994)
1-8, 25-40, 41-60, 102-124, 149-162	Sélo y col. (1999)
1-16, 31-48, 47-60, 67-78, 75-86, 127-144, 141-152	Jarvinen y col. (2001)

➤ *Glicación con dextrano de 10 y 20 kDa*

Dado que el apantallamiento de los epítomos por moléculas de baja inmunogenicidad se considera una buena forma de reducir la inmunorreactividad proteica, la glicación de alérgenos alimentarios con polisacáridos podría ser una alternativa interesante para reducir la alergenicidad proteica, incluso más eficaz que la glicación con monosacáridos (Sehon, 1992; Hattori y col., 1994; Hattori y col., 2000a, 2000b). En este sentido, en diversos estudios la conjugación covalente vía RM de la  $\beta$ -Lg bovina con quitosano (Hattori y col., 2000a; Aoki y col., 2006) y dextrano carboximetilado (Hattori y col., 2000b; Kobayashi y col., 2001), usando carbodiimida soluble en agua, así como con alginatos y oligosacáridos fosforilados (Hattori y col., 2004), resultó ser un método efectivo para

reducir la inmunogenicidad proteica. Sin embargo, ninguno de estos estudios investigaron el impacto de la glicación con carbohidratos de alto peso molecular sobre la inmunorreactividad de la  $\beta$ -Lg tras su digestión gastrointestinal *in vitro*. Así, en la presente memoria, se estudió, mediante ELISA indirecto, la reactividad IgE de los digeridos obtenidos tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de la  $\beta$ -Lg glicada con DX<sub>10</sub> y DX<sub>20</sub>, bajo condiciones de máxima formación del compuesto de Amadori entre la  $\beta$ -Lg y el polisacárido (36 y 60 h a 60 °C).



**Figura R62.** Secuencia primaria de la  $\beta$ -Lg bovina (variante genética B). En rojo aparecen marcados los epítomos lineales de unión a IgE de la  $\beta$ -Lg. Asimismo, los péptidos que sobreviven a la digestión gastrointestinal, cuya secuencia aminoacídica (previamente determinada en el apartado 4.6.3) coincide con la de los epítomos de unión a IgE conocidos están subrayados. Los números indican la posición en la secuencia.

Como se observa en la **Tabla R14**, la glicación de la  $\beta$ -Lg con DX<sub>20</sub> no modificó de forma significativa ( $P < 0,5$ ) la reactividad IgE de los digeridos de la  $\beta$ -Lg glicada en comparación con la de la  $\beta$ -Lg control calentada digerida, probablemente debido a la digestibilidad similar presentada por ambas muestras (Figura R50, apartado 4.6.1.1). En cambio, la glicación con DX<sub>10</sub> incrementó significativamente la respuesta contra anticuerpos IgE de la  $\beta$ -Lg con respecto a la de la  $\beta$ -Lg sin glicar digerida, para los dos sueros humanos empleados, lo cual podría ser atribuido a la menor digestibilidad de la  $\beta$ -Lg glicada con DX<sub>10</sub> comparada con la de la  $\beta$ -Lg sin modificar (Figura R50, apartado 4.6.1.1).

**Tabla R14.** Efecto de la glicación con DX<sub>10</sub> y DX<sub>20</sub> y posterior digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la respuesta contra anticuerpos IgE de la  $\beta$ -Lg.

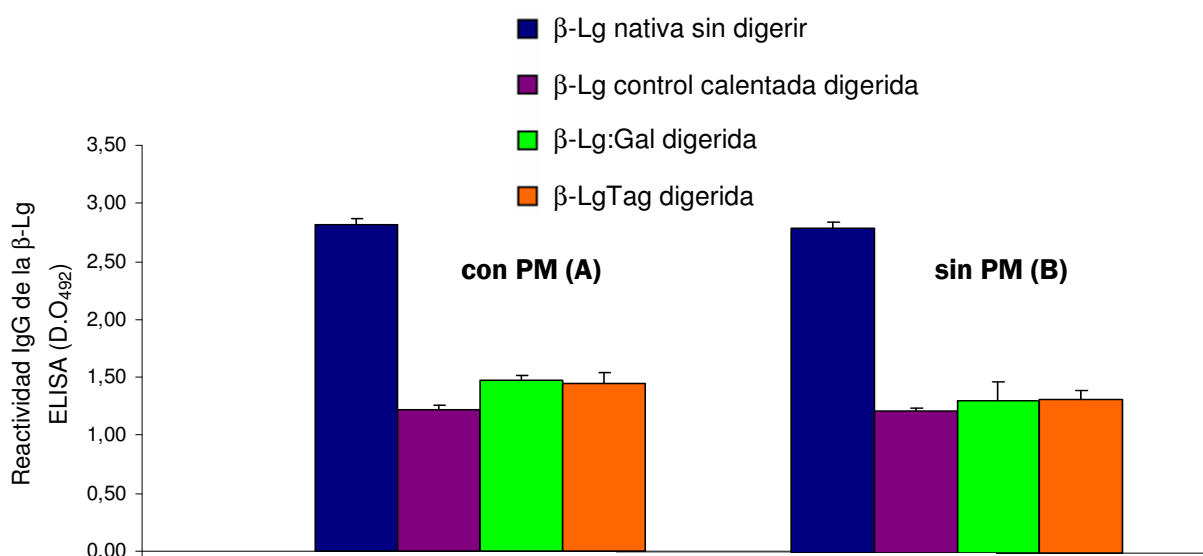
Muestra		Condiciones de incubación		Reactividad IgE (D.O <sub>492</sub> )		
		T <sup>a</sup> (°C)	t (h)	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Sin digerir	$\beta$ -Lg nativa	---	---	1,50 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	2,84 $\pm$ 0,06	3,30 $\pm$ 0,14
	$\beta$ -Lg nativa	---	---	0,85 $\pm$ 0,01	1,87 $\pm$ 0,02	1,90 $\pm$ 0,02
Digeridas	$\beta$ -Lg control calentada	60	36	---	1,72 $\pm$ 0,09	1,74 $\pm$ 0,05
	$\beta$ -Lg:DX <sub>10</sub>			---	1,91 $\pm$ 0,06*	1,92 $\pm$ 0,04*
	$\beta$ -Lg control calentada	60	60	---	1,76 $\pm$ 0,03	1,77 $\pm$ 0,03
	$\beta$ -Lg:DX <sub>20</sub>			---	1,75 $\pm$ 0,01	1,73 $\pm$ 0,03

\* Indica que existen diferencias significativas entre la muestra y el control calentado correspondiente ( $P < 0,05$ ).

<sup>a</sup> Los datos son la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar de la media.

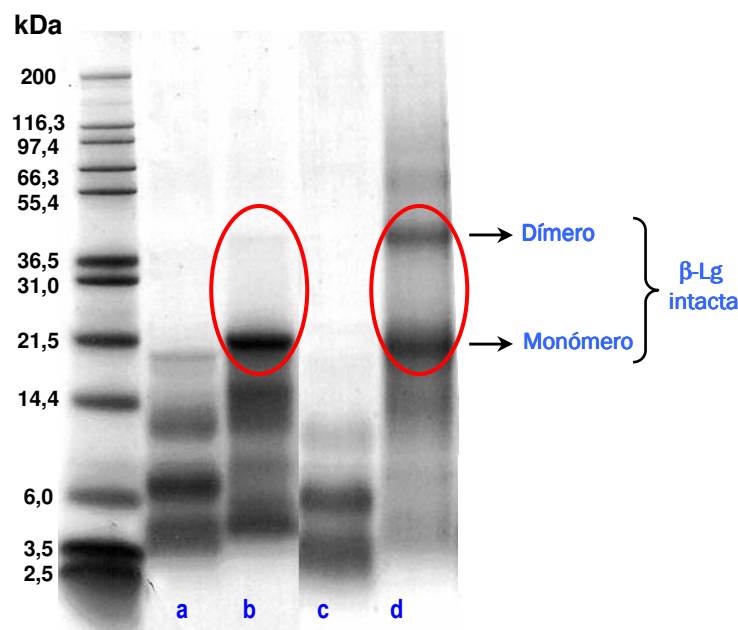
#### 4.7.1.2.2 Efecto del grado de agregación proteica

Con el objetivo de estudiar la influencia de la agregación proteica, debida al avance de la RM, sobre la reactividad IgG de la  $\beta$ -Lg, se realizaron ensayos de ELISA directo con las muestras almacenadas a 50 °C en presencia y ausencia de PM y los resultados se muestran en la **Figura R63**. En presencia de PM (**Figura R63 (A)**) se observó un comportamiento similar al de las muestras obtenidas tras la incubación a 40 °C durante 24 h (**Figura R61**), si bien, las diferencias existentes entre los glicoconjugados y la  $\beta$ -Lg control calentada fueron menores a 50 °C. En ausencia de PM (**Figura R63 (B)**), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,5$ ) entre la  $\beta$ -Lg control calentada y glicada, estando ésta última más agregada y, consecuentemente, menos digerida que la  $\beta$ -Lg glicada en presencia de PM. En concordancia con estos resultados, tampoco se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,5$ ) entre la reactividad IgE de los digeridos de  $\beta$ -Lg control calentada y glicada con Gal durante 48 h a 50 °C en ausencia de PM (**Tabla R14**).



**Figura R63.** Reactividad IgG de la  $\beta$ -Lg nativa sin digerir y de los hidrolizados (digestión con pepsina 2 h + digestión con tripsina/quimotripsina 15 min) de la  $\beta$ -Lg control calentada y glicada, incubadas durante 48 h a 50°C en presencia (A) y en ausencia (B) de PM.

Asimismo, con carácter general, comparando las Figuras R61 y R63, se puede apreciar que los valores de D.O<sub>492</sub> fueron inferiores en el caso de los digeridos de los conjugados obtenidos a 50 que a 40 °C. A primera vista, estos resultados podrían parecer contradictorios, ya que podría esperarse que los digeridos de los conjugados obtenidos a 40 °C, fueran menos inmunorreactivos que los digeridos de los conjugados obtenidos a 50 °C, debido a su mayor digestibilidad y, por tanto, a su menor contenido en proteína intacta (Figura R64). Sin embargo, nuestros resultados indican que la intensa agregación proteica inducida a 50 °C, especialmente en ausencia de PM, puede enmascarar parcialmente las regiones alergénicas presentes tanto en la  $\beta$ -Lg que queda intacta tras la digestión como en los péptidos mostrados en la Figura R62, produciendo una disminución notable de la inmunoreactividad.



**Figura R64.** Perfiles electroforéticos obtenidos por SDS-PAGE de la  $\beta$ -Lg control calentada 24 h a 40 °C (a) y 48 h a 50 °C (c) y de la  $\beta$ -Lg incubada con Gal 24 h a 40 °C (b) y 48 h a 50 °C (d) tras su digestión gastrointestinal *in vitro*. M: marcadores de peso molecular.

#### 4.7.2 Glicoconjugados de caseinato sódico

Con objeto de estudiar el efecto de la glicación y posterior digestión bajo condiciones fisiológicas sobre la reactividad IgE del SC, se llevaron a cabo análisis de ELISA indirecto con los digeridos resultantes de la digestión gastrointestinal *in vitro* del SC nativo, control calentado y glicado con Gal, obtenido tras el almacenamiento a 60 y 50 °C durante 4 y 72 h, respectivamente.

Como se observa en la [Tabla R15](#), a pesar de la ausencia de proteína intacta (apartado 4.6.2), los digeridos tanto del SC glicado como sin glicar presentaron inmunorreactividad frente a los tres sueros ensayados, lo cual podría ser debido, de acuerdo con diversos autores (Astwood y col., 1996; Thomas y col., 2004), a la presencia de epítopos alergénicos, resistentes a la digestión gastrointestinal simulada, en algunos de los fragmentos peptídicos de dichos digeridos. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre la reactividad IgE de los digeridos del SC nativo, control calentado y glicado, sugiriendo que la glicación bajo las condiciones empleadas en este estudio no tiene ningún efecto sobre la inmunorreactividad del SC.

**Tabla R15.** Efecto de la glicación con Gal y posterior digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la reactividad IgE del SC.

Muestra		Condiciones de incubación		Reactividad IgE (D.O492)		
		Tª (°C)	t (h)	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Sin digerir	SC nativo	---	---	1,41 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,87 ± 0,06	3,36 ± 0,07
Digeridas	SC nativo	---	---	0,33 ± 0,04	0,66 ± 0,04	0,68 ± 0,05
	SC control calentado	60	4	0,34 ± 0,04	0,66 ± 0,03	0,69 ± 0,01
	SC:Gal			0,33 ± 0,04	0,65 ± 0,01	0,70 ± 0,01
	SC control calentado	50	72	0,33 ± 0,06	0,65 ± 0,02	0,69 ± 0,04
SC:Gal	0,30 ± 0,03			0,61 ± 0,04	0,64 ± 0,05	

<sup>a</sup> Los datos son la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar de la media.

### **Conclusiones parciales**

Los digeridos obtenidos tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de los glicoconjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Tag y  $\beta$ -Lg:DX<sub>10</sub>, con un bajo grado de agregación, presentaron una inmunorreactividad mayor que la  $\beta$ -Lg control calentada digerida, como consecuencia de su mayor contenido en proteína intacta inmunorreactiva. De acuerdo con estos resultados, podemos decir que la glicación, en estados iniciales de la RM, tiene un efecto negativo sobre la inmunorreactividad de la  $\beta$ -Lg, debido a la reducción en su digestibilidad. Sin embargo, los digeridos correspondientes a los conjugados con un mayor grado de agregación proteica ( $\beta$ -Lg:Gal/Tag, obtenidos a 50 °C con PM) presentaron una inmunorreactividad similar a la de los digeridos de  $\beta$ -Lg control calentada, a pesar de presentar un mayor contenido en proteína intacta. Tales resultados sugieren que la agregación proteica inducida por el avance de la RM podría originar el enmascaramiento parcial de los epítomos presentes en la  $\beta$ -Lg intacta y péptidos detectados tras la digestión, contrarrestando, de este modo, la menor digestibilidad de los agregados proteicos.

Con respecto al SC, la glicación y posterior proteólisis enzimática no tuvieron ningún efecto sobre su inmunorreactividad, no observándose diferencias significativas entre la reactividad IgE de los digeridos del SC glicado y sin modificar.

## 4.8 EFECTO SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL

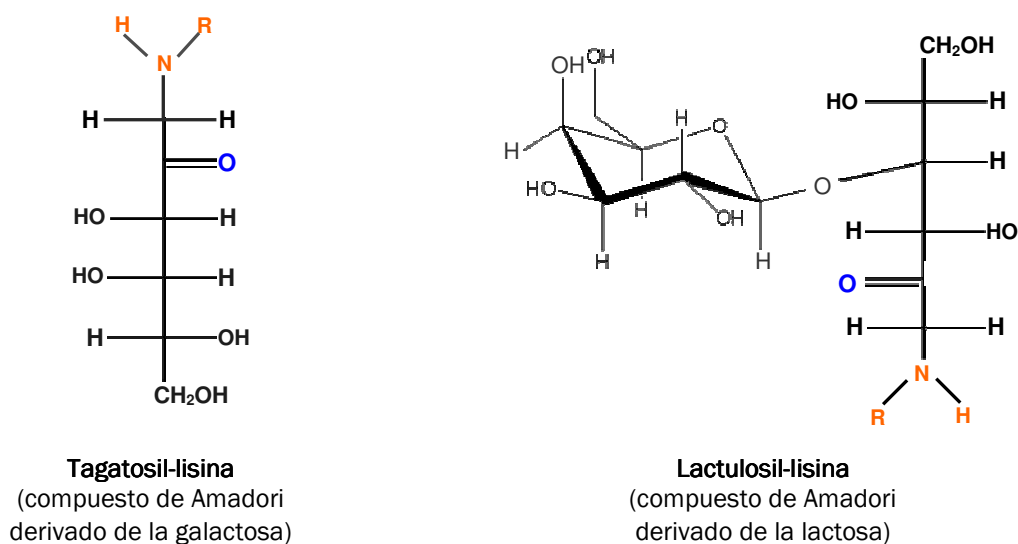
Para determinar el efecto de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC digeridos sobre el crecimiento microbiano, se llevaron a cabo ensayos de fermentabilidad *in vitro* con distintas cepas bacterianas en forma de cultivos puros, así como con cultivos mixtos procedentes de muestras fecales. Además, también se evaluó la capacidad de dichos glicoconjugados para alterar la adhesión intestinal de bacterias potencialmente patógenas, para lo cual se llevaron a cabo estudios de adhesión bacteriana a mucina en presencia de los mismos.

Tales estudios se llevaron a cabo con los glicoconjugados  $\beta$ -Lg/SC:Gal (tagatosil derivados, debido a la isomerización de la Gal durante las etapas iniciales de la RM) (Figura R65) con el objetivo de comparar su efecto sobre el crecimiento microbiano con el de la tagatosa, carbohidrato con carácter prebiótico reconocido. Además, considerando los resultados derivados de estudios previos acerca de las propiedades antiadherentes de la albúmina sérica (bovina, porcina y humana) lactosilada (Aring y col., 1989; Ledesma-Osuna y col., 2008, 2009; Sarabia-Sainz y col., 2009), así como el carácter prebiótico, también ampliamente reconocido, de la lactulosa, pensamos que podría resultar interesante estudiar también el efecto sobre la microbiota intestinal de los glicoconjugados  $\beta$ -Lg/SC:Lac (lactulosil derivados) (Figura R65), con el fin de compararlo con el de la lactulosa y tagatosil derivados.

Así, las muestras empleadas en ambos estudios fueron los glicoconjugados  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40°C],  $\beta$ -Lg:Lac [8 h, 60 °C], SC:Gal [4 h, 60 °C] y SC:Lac [8 h, 60 °C], en estados iniciales de la RM (máximo contenido en el compuesto de Amadori y bajo grado de agregación), y los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal [48 h, 50°C],  $\beta$ -Lg:Lac [48 h, 60 °C], SC:Gal [72 h, 50 °C] y SC:Lac [24 h, 60 °C], en estados avanzados de la RM (elevado grado de glicación y de agregación proteica) (Tabla M10), previamente sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro*, con el fin de simular las condiciones fisiológicas.

Como resultado de este proceso digestivo se pueden generar péptidos de distinto tamaño en función del grado de agregación proteica del glicoconjugado de partida, particularmente en el caso de los conjugados de  $\beta$ -Lg. Puesto que el tamaño de los péptidos generados podría influir tanto en la metabolización como en las propiedades antiadherentes de los digeridos estudiados, estos se analizaron por SEC empleando una columna adecuada para la separación de péptidos, antes de llevar a cabo los estudios

microbiológicos, con el fin de conocer el rango de tamaño molecular de los péptidos que los constituían.



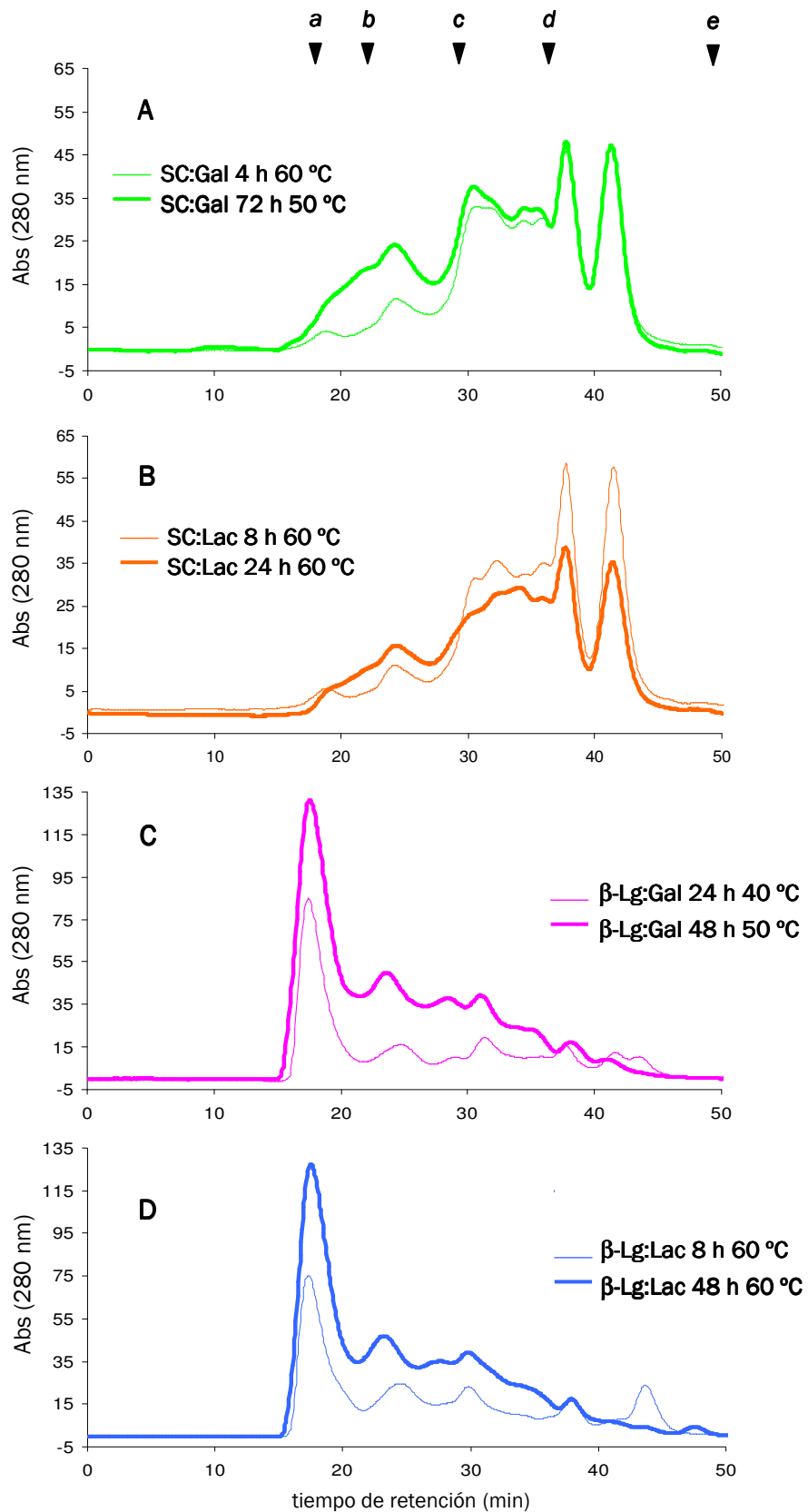
**Figura R65.** Estructuras de los compuestos de Amadori tagatosil- y lactulosil-lisina, derivados de la glicación de proteínas con Gal y Lac.

#### 4.8.1 Análisis por cromatografía de exclusión molecular de los digeridos derivados de los glicoconjugados de $\beta$ -Lg y SC

Como se observa en la [Figura R66](#), en general, los péptidos resultantes de la proteólisis de los glicoconjugados de SC se retuvieron más en la columna que los derivados de los conjugados de  $\beta$ -Lg, sugiriendo un menor tamaño molecular de los primeros (204-2.500 Da) que de los péptidos derivados de la  $\beta$ -Lg (6,5-14,4 kDa).

Tal observación está de acuerdo con la mayor digestibilidad de los glicoconjugados de SC en comparación con la de los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg, tal y como se explicó anteriormente (ver apartado 4.6.2).





**Figura R66.** Perfiles cromatográficos obtenidos por SEC de los glicoconjugados sometidos a digestión gastrointestinal in vitro SC:Gal (A), SC:Lac (B), β-Lg:Gal (C) y β-Lg:Lac (D). Las posiciones de elución de las proteínas estándar aparecen indicadas por flechas: **a**, lisozima (14,4 kDa); **b**, aprotinina (6,5 kDa); **c**, insulina cadena B (3,5 kDa); **d**, insulina cadena A (2,5 kDa); **e**, triptófano (204 Da).

En cuanto al efecto del grado de agregación proteica sobre el tamaño de los péptidos generados, las diferencias más notables se encontraron con los conjugados SC:Gal, observándose un incremento sustancial en el área de los picos menos retenidos y, por tanto, de mayor tamaño, en el cromatograma correspondiente al conjugado obtenido bajo las condiciones de tiempo y temperatura de incubación más severas (72 h a 50 °C), las cuales indujeron el avance de la RM y, por tanto, la formación de agregados, en mayor medida (**Figura R66 (A)**). Aunque de forma algo menos evidente, este comportamiento también se pudo observar con los glicoconjugados SC:Lac y  $\beta$ -Lg:Gal/Lac (**Figura R66 (B-D)**).

#### **4.8.2 Estudios de fermentación *in vitro***

Teniendo en cuenta el carácter prebiótico de la tagatosa y la lactulosa, podría esperarse algún efecto de los conjugados  $\beta$ -Lg/SC:Gal/Lac (tagatosil y lactulosil derivados) sobre las bacterias intestinales. Sin embargo, a pesar de los numerosos trabajos existentes sobre la glicosilación proteica vía RM, el efecto de los productos de esta reacción sobre la microbiota intestinal sigue sin conocerse con exactitud. Además, mientras que la tagatosa y la lactulosa ingeridas son casi completamente fermentadas en el ciego y colon proximal (Laerke y Jensen, 1999; Laerke y col., 2000), varios estudios llevados a cabo acerca de la biodistribución y metabolismo de los compuestos de Amadori en humanos indican que estos no son digeridos en el tracto gastrointestinal, pudiendo alcanzar las zonas más distales del intestino, donde son degradados por la microbiota intestinal (Erbersdobler y Faist, 2001; Faist y Erbersdobler, 2001; Finot, 2005). Este hecho es de especial relevancia ya que, entre otros aspectos, la zona del colon donde se lleva a cabo la fermentación es muy importante a la hora de evaluar la actividad prebiótica de los carbohidratos no digeribles, ya que la incidencia de determinadas enfermedades intestinales de tipo crónico es mucho mayor en el colon descendente y recto que en los primeros tramos del intestino grueso (Gibson y col., 2004). Por ello, existe en la actualidad un gran interés por disponer de ingredientes prebióticos capaces de alcanzar intactos las zonas más distales del intestino.

Así, con el fin de ampliar el conocimiento sobre el papel de los productos de la RM en la modulación de la microbiota intestinal, se evaluó el potencial de dichos productos, incluyendo el compuesto de Amadori y productos de las etapas avanzadas de la reacción, para estimular el crecimiento de la microbiota intestinal, planteándose, en primer lugar, el

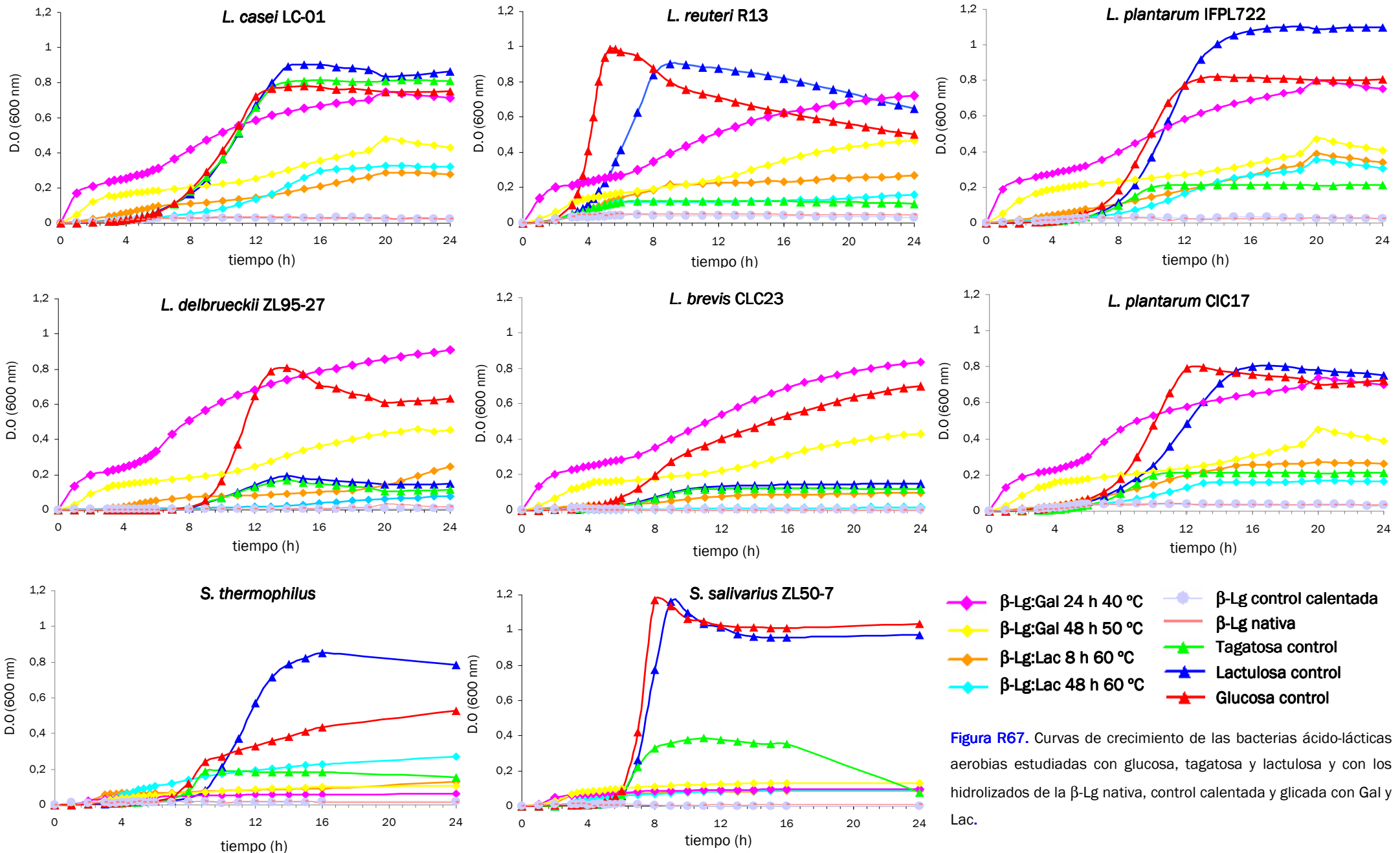
estudio con cultivos puros *in vitro* de varias cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*.

#### **4.8.2.1 Determinación del crecimiento de microorganismos puros**

##### ***4.8.2.1.1 Glicoconjugados de $\beta$ -lactoglobulina***

Las curvas de crecimiento de las 6 cepas de lactobacilos y de las 2 de estreptococos cultivadas aeróbicamente con los diferentes glicoconjugados de  $\beta$ -Lg digeridos como única fuente de carbono, se muestran en la [Figura R67](#). Con objeto de relacionar el crecimiento microbiano y la utilización de los sustratos, se calculó la velocidad máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de crecimiento de los microorganismos. En la [Tabla R16](#) quedan reflejados estos valores y el tiempo de fase de latencia (lag) para cada uno de las muestras estudiadas.

Ninguna de las cepas fue capaz de crecer sobre los controles de  $\beta$ -Lg nativa y calentada en ausencia de Gal/Lac. Sin embargo, los diferentes glicoconjugados digeridos ensayados fueron, en general, utilizados en distinto grado por todos los microorganismos. Como puede observarse en las gráficas de crecimiento ([Figura R67](#)) la utilización de los sustratos ensayados por los microorganismos fue variable, dando lugar a diferentes perfiles de crecimiento. En general, los glicoconjugados de Gal, especialmente los obtenidos tras 24 h de incubación a 40 °C, fueron metabolizados eficientemente por todos los lactobacilos, pero escasamente por los estreptococos. Además, dichos conjugados favorecieron el crecimiento bacteriano en mayor medida que los derivados de Lac.



**Figura R67.** Curvas de crecimiento de las bacterias ácido-lácticas aerobias estudiadas con glucosa, tagatosa y lactulosa y con los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg nativa, control calentada y glicada con Gal y Lac.

**Tabla R16.** Velocidades máximas de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ , h<sup>-1</sup>) y tiempos de fase de latencia (lag, h) de las bacterias ácido-lácticas ensayadas tras la fermentación con glucosa, tagatosa, lactulosa y los digeridos de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Lac como fuente de carbono (datos normalizados).

Muestra			<i>S. salivarius</i> ZL50-7		<i>S. thermophilus</i>		<i>L. brevis</i> CLC23		<i>L. plantarum</i> IFPL722		<i>L. plantarum</i> CIC17		<i>L. delbrueckii</i> ZL95-27		<i>L. casei</i> LC-01		<i>L. reuteri</i> R13	
Conjugado	t (h)	T <sup>a</sup> (°C)	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag
Glucosa control	0	0	0,747	6,46	0,112	7,00	0,057	4,66	0,162	7,04	0,167	7,34	0,246	9,45	0,135	6,97	0,532	3,25
Tagatosa control	0	0	0,139	5,58	0,107	7,38	CND		0,047	5,96	0,047	5,96	0,033	8,44	0,129	7,13	CND	
Lactulosa control	0	0	0,492	6,60	0,177	8,96	CND		0,177	7,95	0,113	7,91	0,036	8,23	0,142	7,52	0,210	4,17
$\beta$ -Lg:Gal	24	40	0,041	0,83	CND		0,114	0	0,191	0	0,102	0	0,102	0	0,048	0	0,132	0
	48	50	0,030	0,88	CND		0,044	0,44	0,056	0	0,038	0	0,045	0	0,048	3,47	0,043	0,44
$\beta$ -Lg:Lac	8	60	CND*		CND		CND		0,022	4,26	0,023	3,77	0,013	2,26	0,020	1,21	0,033	1,90
	48	60	CND		0,030	2,29	CND		0,028	6,79	0,018	5,51	0,005	10,20	0,037	8,79	CND	

\* CND: crecimiento no detectado.

*L. casei* LC-01 fue capaz de crecer sobre todos los sustratos que se ensayaron, alcanzando una  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,142 h<sup>-1</sup> cuando se utilizó lactulosa como fuente de carbono, siendo ésta similar a la alcanzada con la glucosa y la tagatosa. Cuando el sustrato empleado fue el hidrolizado del conjugado  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] los valores de D.O<sub>600</sub> máximos alcanzados fueron muy similares a los obtenidos con los controles de glucosa y tagatosa, estando comprendidos entre 0,7-0,8. Además, aunque el valor de  $\mu_{\text{máx}}$  fue menor (0,048 h<sup>-1</sup>), el crecimiento de *L. casei* LC-01 sobre este sustrato no presentó fase de latencia, mientras que, sobre los controles de glucosa y tagatosa, ésta fue de 7 h, aproximadamente. Cuando se utilizaron los hidrolizados de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal [48 h, 50 °C],  $\beta$ -Lg:Lac [8 h, 60 °C] y  $\beta$ -Lg:Lac [48 h, 60 °C] el crecimiento fue menor que con la glucosa, tagatosa y lactulosa, obteniendo valores de D.O<sub>600</sub> inferiores a 0,5, aunque la fase de latencia del crecimiento se redujo, excepto con  $\beta$ -Lg:Lac [48 h, 60 °C].

*L. reuteri* R13, *L. plantarum* IFPL722 y *L. plantarum* CIC17 mostraron un comportamiento similar. En cuanto al crecimiento sobre los controles de glucosa, lactulosa y tagatosa, ninguno de los tres utilizó bien la tagatosa como fuente de carbono, especialmente *L. reuteri* R13. Sin embargo, sí crecieron bien con glucosa y lactulosa, siendo especialmente bueno el crecimiento de *L. plantarum* IFPL722 con lactulosa (D.O<sub>600</sub> ~ 1,1) y el de *L. reuteri* R13 con glucosa (D.O<sub>600</sub> ~ 1). Cuando el sustrato empleado fue el digerido del conjugado  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] los valores de D.O<sub>600</sub> y de  $\mu_{\text{máx}}$  de las tres cepas fueron similares a los obtenidos con glucosa y muy superiores a los obtenidos con tagatosa. Además, como en el caso del *L. casei* LC-01, la fase de latencia del crecimiento de los tres microorganismos se redujo a cero. Asimismo, aunque en menor medida que el conjugado digerido  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C], el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg galactosilada [48 h, 50 °C] también promovió el crecimiento de estas tres cepas, el cual mostró una fase de latencia más corta y unos valores de D.O<sub>600</sub> más elevados que con la tagatosa. En cambio, *L. reuteri* R13, *L. plantarum* IFPL722 y *L. plantarum* CIC17 utilizaron peor los hidrolizados de los conjugados  $\beta$ -Lg:Lac [8 y 48 h, 60 °C], alcanzándose valores de D.O<sub>600</sub> mucho menores que con lactulosa (D.O<sub>600</sub> < 0,3).

*L. delbrueckii* ZL95-27 y *L. brevis* CLC23 no metabolizaron bien la tagatosa y la lactulosa. Sin embargo, ambos crecieron muy bien sobre el digerido del conjugado  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] como fuente de carbono; especialmente *L. brevis* CLC23, el cual mostró valores de D.O<sub>600</sub> (0,84) y de  $\mu_{\text{máx}}$  (0,114 h<sup>-1</sup>) más altos que con la glucosa (D.O<sub>600</sub>=0,7 y  $\mu_{\text{máx}}$ =0,057). Asimismo, una vez más, el crecimiento de ambas cepas sobre este glicoconjugado no presentó fase de latencia. Aunque con el digerido del conjugado  $\beta$ -Lg:Gal

[48 h, 50 °C], los valores de  $D.O_{600}$  y de  $\mu_{m\acute{a}x}$  observados no fueron tan altos, ambos, *L. delbrueckii* ZL95-27 y *L. brevis* CLC23, también crecieron bien sobre este sustrato. En cuanto a los conjugados de Lac digeridos, ninguno de los dos favoreció el crecimiento de ambas cepas, siendo éste similar o peor que con la lactulosa.

A diferencia de las cepas de lactococos anteriores, *S. salivarius* ZL50-7 y *S. thermophilus* no utilizaron bien ninguno de los glicoconjugados ensayados ni la tagatosa. Sólo crecieron bien, en distinto grado, sobre glucosa y lactulosa como fuente de carbono, aunque la fase de latencia con ambos sustratos fue larga (6-9 h).

En cuanto a las cepas crecidas anaeróbicamente, en la [Tabla R17](#) se muestran los valores de densidad óptica (DO) alcanzados con las diferentes fuentes de carbono estudiadas.

**Tabla R17.** Valores de densidad óptica ( $DO_{600}$ ) después de 24 h de crecimiento de las cepas anaerobias utilizando como fuentes de carbono glucosa, lactulosa, tagatosa y los digeridos de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Lac.

Muestra		<i>L. acidophilus</i> LA-5	<i>L. gasseri</i> Lc9	<i>B. breve</i> 26M2	<i>B. lactis</i> BB12
Conjugado	t, T <sup>a</sup>				
Glucosa	0	0,790	0,799	0,624	1,049
Tagatosa	0	0,703	0,118	0,024	0,004
Lactulosa	0	0,194	0,169	0,914	0,001
$\beta$ -Lg:Gal	24 h, 40 °C	0,522	0,522	0,388	0,382
	48 h, 50 °C	0,206	0,206	0,169	0,208
$\beta$ -Lg:Lac	8 h, 60 °C	0,386	0,077	0,092	0,080
	48 h, 60 °C	0,386	0,021	0,028	0,031

*B. breve* 26M2 y *B. lactis* BB12 no fueron capaces de crecer en tagatosa, pero sí lo hicieron con los digeridos de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal, especialmente con el obtenido tras 24 h de incubación a 40 °C, de acuerdo con los resultados obtenidos con las cepas aerobias. Asimismo, sólo *B. breve* 26M2 creció cuando se utilizó la lactulosa como fuente de carbono y ninguna de las dos cepas de bifidobacterias utilizaron bien los hidrolizados de los conjugados  $\beta$ -Lg:Lac.

*L. gasseri* Lc9 no fue capaz de crecer en los hidrolizados de los conjugados  $\beta$ -Lg:Lac, mientras que sí lo hizo en lactulosa. También creció con la tagatosa, pero lo hizo en mayor medida, alcanzando valores de D.O<sub>600</sub> más elevados, con los hidrolizados de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal, especialmente con el conjugado  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C], de acuerdo con los resultados anteriores. *L. acidophilus* LA-5 creció sobre todos los sustratos; sin embargo, en este caso, los valores de D.O<sub>600</sub> alcanzados fueron mayores con la tagatosa que con los digeridos de la  $\beta$ -Lg galactosilada. Por el contrario, los digeridos de los conjugados  $\beta$ -Lg:Lac promovieron el crecimiento de esta cepa en mayor medida que la lactulosa, siendo ésta la primera vez que se observaba un efecto más positivo de tales conjugados, en comparación con la lactulosa, sobre los microorganismos puros estudiados.

En general, las bacterias ácido-lácticas estudiadas no fermentaron bien los hidrolizados de los conjugados  $\beta$ -Lg:Lac, observándose un mejor crecimiento de éstas en lactulosa como fuente de carbono.

Por el contrario, todas las bacterias ácido-lácticas estudiadas, excepto los estreptococos y *L. acidophilus* LA-5, crecieron notablemente mejor sobre los hidrolizados de los conjugados de  $\beta$ -Lg:Gal, tanto [24 h, 40 °C] como [48 h, 50 °C], que sobre la tagatosa como fuente de carbono, alcanzándose valores más altos de  $\mu_{\text{máx}}$  y observándose fases de latencia más cortas. Esto fue especialmente notable cuando se utilizó como sustrato el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg incubada con Gal a 40 °C durante 24 h, con el máximo contenido en el compuesto de Amadori tagatosil-lisina, sugiriendo que éste tiene un efecto positivo sobre la microbiota intestinal estudiada mayor que el de la tagatosa.

Por otro lado, el menor crecimiento bacteriano observado con la  $\beta$ -Lg incubada con Gal a 50 °C durante 48 h podría explicarse en base a su mayor grado de agregación, menor digestibilidad (Figura R64) y consecuentemente, a la mayor dificultad de las bacterias para metabolizar los péptidos obtenidos tras su digestión, de mayor tamaño y grado de agregación que los péptidos derivados del conjugado  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] (Figura R66 (C)).

#### **4.8.2.1.2 Glicoconjugados de caseinato sódico**

En la Figura R68 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas bacterianas cultivadas aeróbicamente con los diferentes glicoconjugados de SC digeridos como única

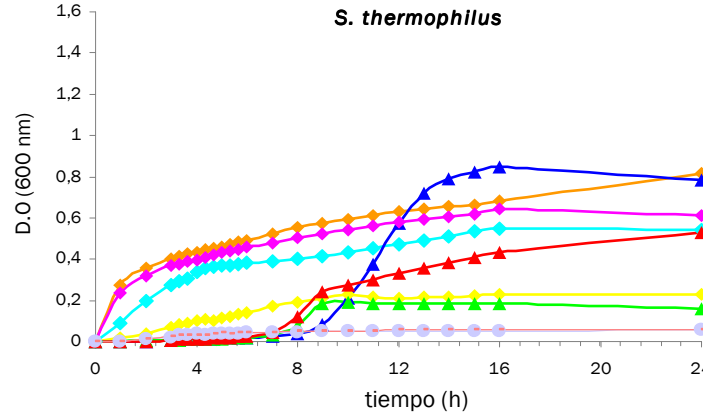
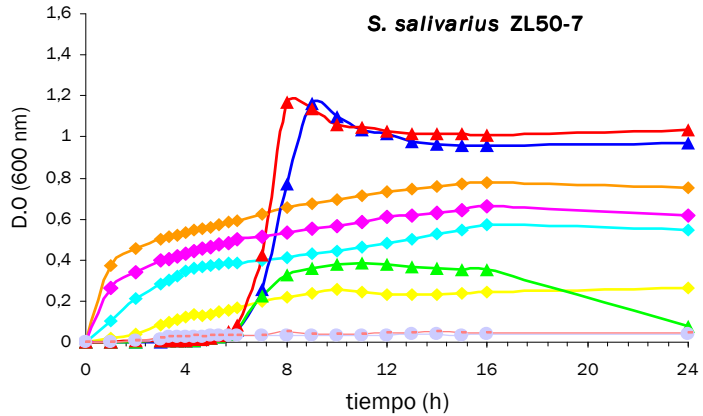
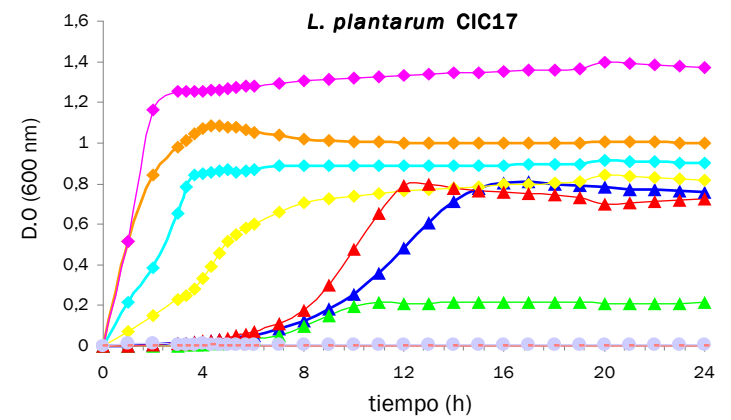
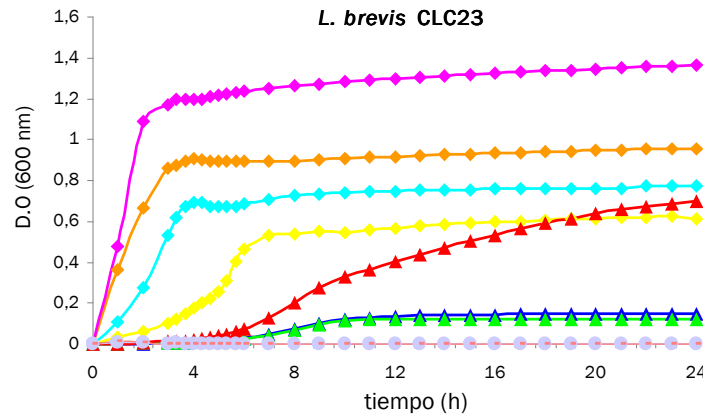
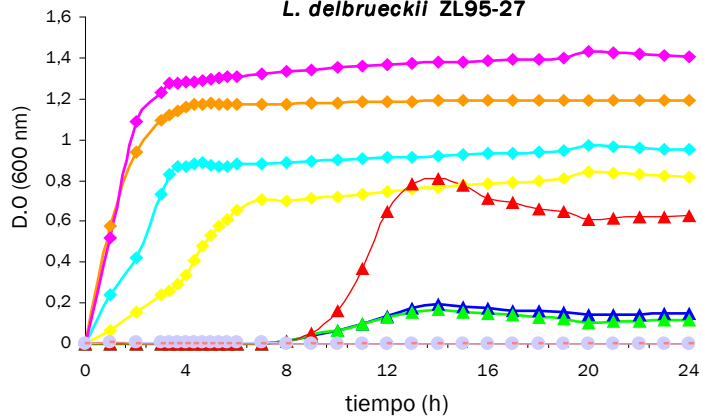
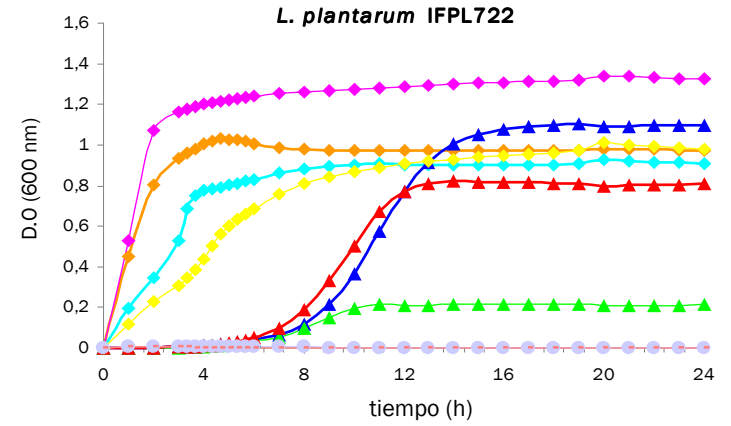
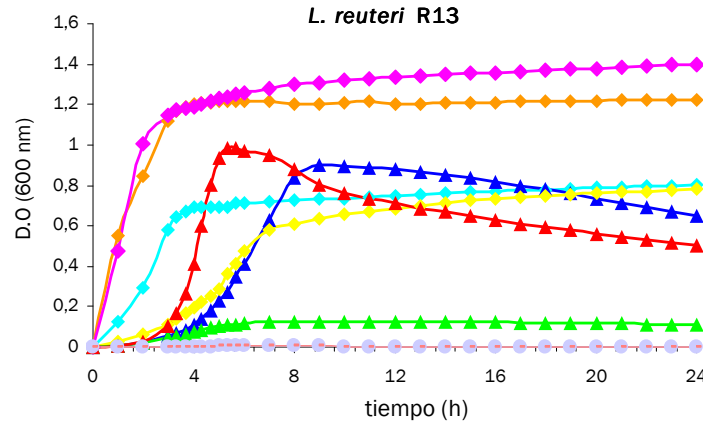
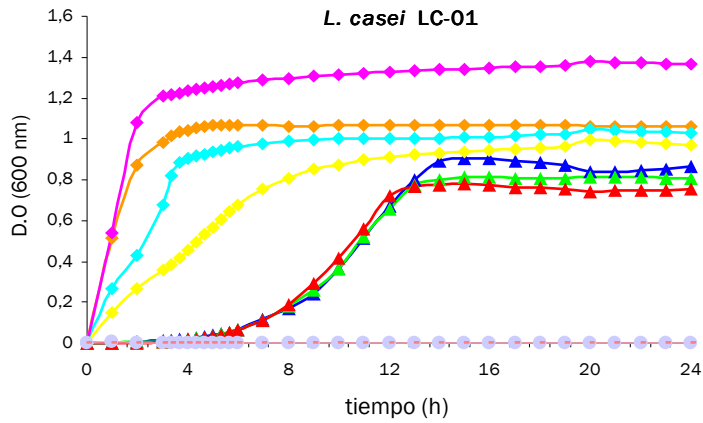


fuente de carbono. Además, en la [Tabla R18](#) se recogen los valores de velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de los microorganismos y el tiempo de fase de latencia (lag) para cada uno de los productos ensayados.

Mientras que ninguno de los microorganismos fueron capaces de crecer sobre el SC nativo y control calentado digeridos, los digeridos de los glicoconjugados de SC fueron rápidamente fermentados, en algunos casos incluso más rápido que la glucosa, por todas las cepas bacterianas estudiadas, promoviendo su crecimiento en mayor medida que los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg digeridos. Esto podría ser atribuido a la formación, tras su digestión gastrointestinal *in vitro*, de péptidos de menor peso molecular (Figura R66), que son mejor internalizados y metabolizados por las bacterias que los péptidos derivados de la  $\beta$ -Lg glicosilada.

Además, a diferencia de los conjugados de  $\beta$ -Lg digeridos, los cuales fueron utilizados de forma diferente en función de la cepa bacteriana, los perfiles de crecimiento obtenidos cuando se utilizaron los hidrolizados de los conjugados de SC como fuente de carbono fueron muy similares, independientemente de la cepa ([Figura R68](#)). El crecimiento de todas las bacterias ácido-lácticas ensayadas se vio especialmente favorecido cuando se utilizó como fuente de carbono el hidrolizado del conjugado SC:Gal [4 h, 60 °C] (con el máximo contenido en el compuesto de Amadori tagatosil-lisina), no mostrando fase de latencia y alcanzando unos valores de D.O<sub>600</sub> (1,3-1,4) y  $\mu_{\text{máx}}$  (0,232-0,673 h<sup>-1</sup>) más elevados que con la tagatosa y que con el resto de los sustratos (excepto en el caso de *S.salivarius* ZL50-7 y *S. thermophilus*, que crecen mejor sobre glucosa, lactulosa y SC:Lac [8 h, 60 °] y sobre lactulosa, respectivamente). Tales resultados sugieren que el compuesto de Amadori tagatosil-lisina podría fomentar el crecimiento de la microbiota intestinal en mayor medida que la tagatosa, lo que está también de acuerdo con los resultados derivados del estudio realizado con los conjugados de  $\beta$ -Lg.

Aunque en menor medida, el conjugado SC:Gal [72 h, 50 °C] digerido también fue utilizado mejor que la tagatosa por todas la cepas bacterianas, excepto por los estreptococos. El menor crecimiento bacteriano observado con el SC incubado con Gal a 50 °C durante 72 h podría ser atribuido al mayor tamaño de los péptidos generados tras su digestión (Figura R66 (A)), siendo estos peor internalizados y metabolizados que los derivados del conjugado SC:Gal [4 h, 60 °C].



- ◆ SC:Gal 4 h 60 °C
- ◆ SC:Gal 72 h 50 °C
- ◆ SC:Lac 8 h 60 °C
- ◆ SC:Lac 24 h 60 °C
- SC control calentado
- SC nativo
- ▲ Tagatosa control
- ▲ Lactulosa control
- ▲ Glucosa control

**Figura R68.** Curvas de crecimiento de las bacterias ácido-lácticas aerobias estudiadas con glucosa, tagatosa y lactulosa y con los hidrolizados de la SC nativo, control calentado y glicado con Gal y Lac.

**Tabla R18.** Velocidades máximas de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ , h<sup>-1</sup>) y tiempos de fase de latencia (lag, h) de las bacterias ácido-lácticas ensayadas tras la fermentación con glucosa, tagatosa, lactulosa y los digeridos de los conjugados SC:Gal/Lac como fuente de carbono (datos normalizados).

Muestra		<i>S. salivarius</i> ZL50-7		<i>S. thermophilus</i>		<i>L. brevis</i> CLC23		<i>L. plantarum</i> IFPL722		<i>L. plantarum</i> CIC17		<i>L. delbrueckii</i> ZL95-27		<i>L. casei</i> LC-01		<i>L. reuteri</i> R13	
Conjugado	t, T <sup>a</sup>	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag	$\mu_{\text{máx}}$	lag
Glucosa control	0	0,747	6,46	0,112	7,00	0,057	4,66	0,162	7,04	0,167	7,34	0,246	9,45	0,135	6,97	0,532	3,25
Tagatosa control	0	0,139	5,58	0,107	7,38	0,022	5,18	0,047	5,96	0,047	5,96	CND		0,129	7,13		CND
Lactulosa control	0	0,492	6,60	0,177	8,96	CND*		0,177	7,95	0,113	7,91	0,036	8,23	0,142	7,52	0,210	4,17
SC:Gal	4 h, 60 °C	0,253	0	0,232	0	0,673	0,31	0,539	0	0,591	0	0,536	0	0,541	0	0,516	0
	72 h, 50 °C	0,030	0	0,025	0	0,135	3,18	0,118	0	0,103	0	0,140	1,61	0,103	0	0,130	2,84
SC:Lac	8 h, 60 °C	0,373	0	0,192	0	0,323	0	0,410	0	0,428	0	0,474	0	0,445	0	0,410	0
	24 h, 60 °C	0,091	0	0,088	0	0,265	1,06	0,198	0	0,258	0,51	0,251	0	0,232	0	0,254	0,83

\* CND: crecimiento no detectado.

Por otro lado, todas las cepas bacterianas estudiadas crecieron bien en los derivados de lactosa (SC:Lac 8 y 24 h, 60 °C) (Figura R68), especialmente cuando se empleó el conjugado SC:Lac [8 h, 60 °C] (con el mayor contenido en el compuesto de Amadori lactulosil-lisina) como fuente de carbono, con el que no se observó fase de latencia y se alcanzaron valores de  $D.O_{600}$  (0,9-1,2) y  $\mu_{m\acute{a}x}$  (0,192-0,474 h<sup>-1</sup>) más elevados que con la lactulosa, excepto en el caso de los estreptococos (Tabla R18). Estos resultados sugieren un mayor efecto positivo de la lactulosil-lisina (derivada de la glicación del SC) que de la lactulosa sobre la mayoría de los microorganismos puros estudiados.

De acuerdo con estos resultados, todas las cepas anaerobias (Tabla R19) crecieron mejor con los hidrolizados del SC glicado con Gal, particularmente durante 4 h a 60 °C, que con la tagatosa, siendo esto especialmente notable en el caso de las bifidobacterias, que no fueron capaces de crecer en tagatosa como fuente de carbono.

**Tabla R19.** Valores de densidad óptica ( $D.O_{600}$ ) después de 24 h de crecimiento de las cepas anaerobias utilizando como fuentes de carbono glucosa, lactulosa, tagatosa y los digeridos de los conjugados SC:Gal/Lac.

Muestra		<i>L. acidophilus</i> LA-5	<i>L. gasseri</i> Lc9	<i>B. breve</i> 26M2	<i>B. lactis</i> BB12
Conjugado	t, T <sup>a</sup>				
Glucosa	0	0,790	0,799	0,624	1,049
Tagatosa	0	0,703	0,118	0,024	0,004
Lactulosa	0	0,194	0,169	0,914	0,001
SC:Gal	4 h, 60 °C	1,292	1,259	0,700	0,714
	72 h, 50 °C	0,588	0,673	0,440	0,568
SC:Lac	8 h, 60 °C	1,233	0,989	1,081	1,100
	24 h, 60 °C	1,200	1,103	1,136	0,993

Asimismo, los derivados de Lac también originaron un mayor crecimiento de estas 4 cepas, obteniéndose valores de  $D.O_{600}$  tras las 24 h de incubación más elevados que con la lactulosa. Además, es destacable el hecho de que, mientras que en aerobiosis fueron los conjugados SC:Gal obtenidos en las etapas iniciales de la RM los que promovieron el crecimiento microbiano en mayor medida, con las bifidobacterias, crecidas anaeróbicamente, los valores de  $D.O_{600}$  más elevados se alcanzaron cuando se emplearon

los derivados de Lac como fuente de carbono. Esto sugiere que la lactulosil-lisina, formada durante las etapas iniciales de la RM, y los productos avanzados de la RM entre el SC y la Lac, tienen un efecto especialmente positivo sobre el crecimiento de las bifidobacterias.

### ***Conclusiones parciales***

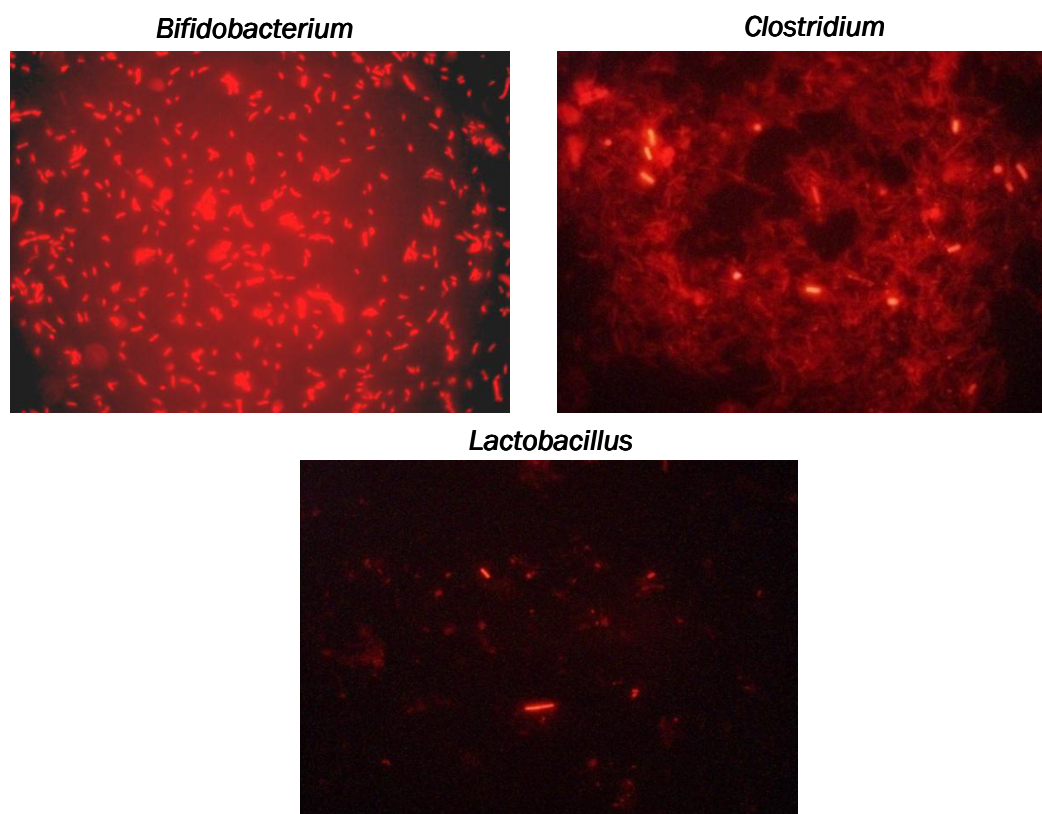
De acuerdo con los resultados anteriores, en general podría decirse que, los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg:Gal fueron metabolizados de forma notable por todos los lactobacilos y bifidobacterias, mientras que fueron escasamente utilizados por los estreptococos, apreciándose, en la mayoría de los casos, un mayor crecimiento bacteriano que en presencia de tagatosa como fuente de carbono. Además, dichos glicoconjugados estimularon el crecimiento bacteriano de forma más eficiente que los derivados de Lac. Por otro lado, los glicoconjugados de SC, tanto con Gal como con Lac, indujeron en gran medida el crecimiento de todas las cepas bacterianas testadas, encontrándose una mayor estimulación del mismo con los conjugados que con los carbohidratos tagatosa y lactulosa como fuente de carbono. Además, los derivados de Gal [4 h, 60 °C], en algunos casos, provocaron un crecimiento, incluso, mayor que la glucosa. Por lo que se refiere al estado de glicación, en general, se detectó un mayor crecimiento de los microorganismos con los conjugados que se hallaban en estados iniciales de la RM, es decir, con el mayor contenido en el correspondiente compuesto de Amadori (tagatosil- o lactulosil-lisina).

Por tanto, podemos decir que la conjugación de ambas proteínas lácteas con galactosa y lactosa (en el caso del SC) vía reacción de Maillard podría ser un método eficiente para obtener nuevos ingredientes alimentarios con un potencial carácter prebiótico.

#### **4.8.2.2 Determinación del crecimiento de microorganismos en cultivos mixtos procedentes de muestras fecales**

Para corroborar los resultados anteriores, se llevaron a cabo estudios adicionales, con el fin de estudiar el comportamiento de un mayor grupo de bacterias constituyentes de la flora intestinal frente a los glicoconjugados digeridos, representando un modelo más próximo a lo que podría ocurrir *in vivo*. Para ello, se realizaron fermentaciones utilizando muestras fecales humanas en las que se determinó el crecimiento de los grupos bacterianos *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Atopobium* y

*Clostridium*. Los glicoconjugados seleccionados para este estudio fueron  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] y SC:Gal [4 h, 60 °C] por ser los que promovieron en mayor medida el crecimiento de las cepas potencialmente probióticas, en forma de cultivos puros, como vimos en el apartado anterior. Además, también se analizaron la tagatosa, la lactulosa y los digeridos de  $\beta$ -Lg y SC calentados en ausencia de Gal, como controles.



**Figura R69.** Fotografías de las poblaciones de *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Lactobacillus* obtenidas de los medios de fermentación conteniendo muestras fecales y los sustratos estudiados sometidas a un procedimiento FISH para su recuento por el microscopio de fluorescencia.

La técnica utilizada para medir los cambios en la población bacteriana fue la fluorescencia con hibridación *in situ* (FISH) (apartado 3.10.2.2) y en la **Figura R69** se muestran, a modo de ejemplo, alguno de los géneros bacterianos vistos bajo el microscopio de fluorescencia.

En la **Tabla R20** se muestran los valores a tiempo 0 y los cambios observados en cada población bacteriana estudiada a las 10 h de fermentación con cada una de las muestras testadas y en ausencia de sustrato (control 10 h).

**Tabla R20.** Cambios en las poblaciones bacterianas ( $\text{Log}_{10}$  células/mL muestra) de los cultivos fecales *in vitro* tras 10 h de incubación en presencia de los diferentes sustratos estudiados.

Muestras	Bacterias totales	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Eubacterium</i>
0 h	8,94± 0,04 <sup>a*</sup>	7,43 ±0,06 <sup>a</sup>	6,72± 0,29 <sup>b</sup>	7,97± 0,04 <sup>b</sup>	6,56± 0,13 <sup>b</sup>	7,49± 0,02 <sup>c</sup>	7,48± 0,03
Control 10 h	9,01± 0,05 <sup>a</sup>	7,61± 0,23 <sup>b</sup>	6,85± 0,11 <sup>ab</sup>	8,19± 0,13 <sup>ab</sup>	6,94± 0,15 <sup>a</sup>	7,82± 0,05 <sup>a</sup>	7,79± 0,05 <sup>c</sup>
SC control 4 h, 60 °C	9,41± 0,31 <sup>b</sup>	7,77± 0,14 <sup>b</sup>	6,94± 0,33 <sup>ab</sup>	8,13± 0,25 <sup>ab</sup>	7,10± 0,24 <sup>a</sup>	7,82± 0,17 <sup>ab</sup>	8,26± 0,59 <sup>ab</sup>
SC:Gal 4 h, 60 °C	9,45± 0,29 <sup>b</sup>	7,98± 0,20 <sup>c</sup>	7,04± 0,33 <sup>ab</sup>	8,19± 0,21 <sup>ab</sup>	7,01± 0,50 <sup>a</sup>	7,85± 0,19 <sup>ab</sup>	8,00± 0,51 <sup>ac</sup>
β-Lg control 24 h, 40 °C	9,45± 0,11 <sup>b</sup>	7,62± 0,12 <sup>b</sup>	6,91± 0,14 <sup>ab</sup>	8,19± 0,22 <sup>ab</sup>	6,90± 0,27 <sup>a</sup>	7,86± 0,04 <sup>ab</sup>	8,15± 0,23 <sup>ab</sup>
β-Lg:Gal 24 h, 40 °C	9,36± 0,10 <sup>b</sup>	8,03± 0,13 <sup>c</sup>	7,11± 0,11 <sup>ab</sup>	8,32± 0,03 <sup>a</sup>	7,09± 0,26 <sup>a</sup>	7,88± 0,01 <sup>ab</sup>	8,32± 0,17 <sup>b</sup>
Tagatosa	9,37± 0,11 <sup>b</sup>	8,92± 0,14 <sup>d</sup>	7,43± 0,08 <sup>c</sup>	8,32± 0,11 <sup>a</sup>	7,07± 0,05 <sup>a</sup>	7,92± 0,02 <sup>ab</sup>	8,63± 0,16 <sup>d</sup>
Lactulosa	9,47± 0,04 <sup>b</sup>	9,01± 0,05 <sup>d</sup>	7,16± 0,07 <sup>ac</sup>	8,35± 0,22 <sup>a</sup>	7,12± 0,13 <sup>a</sup>	7,98± 0,05 <sup>b</sup>	8,66± 0,14 <sup>d</sup>

Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre cada sustrato para cada grupo bacteriano.

\* Los datos son la media de tres determinaciones ± desviación estándar de la media.

En general, para todas las poblaciones bacterianas estudiadas, excepto para *Eubacterium*, los valores obtenidos con los digeridos de los controles de  $\beta$ -Lg y SC calentados no presentaron diferencias significativas con respecto al control 10 h.

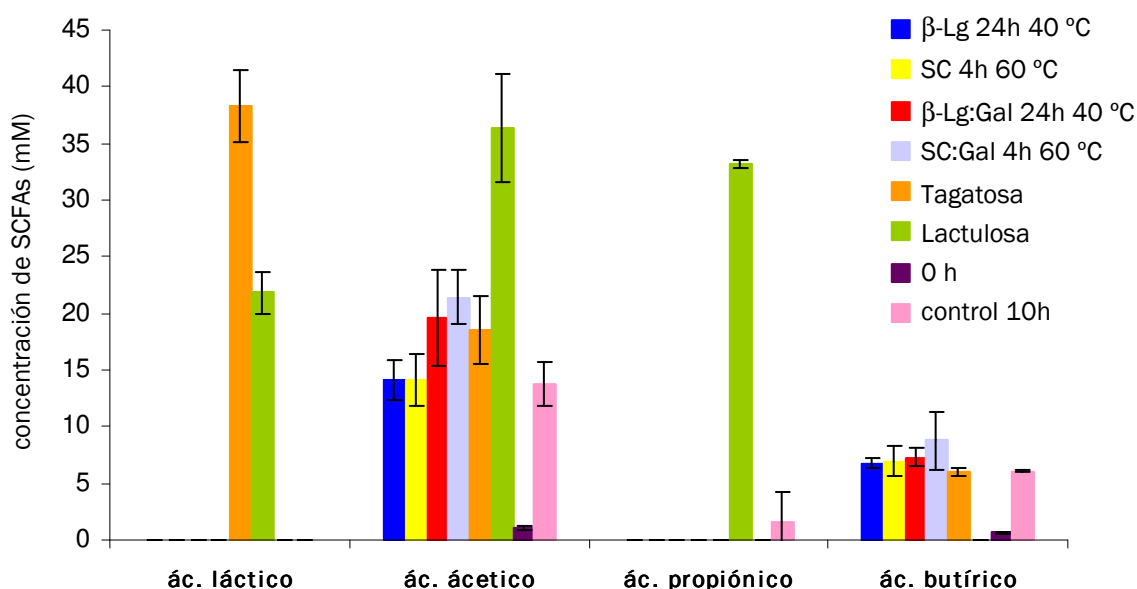
En cuanto a los glicoconjugados, aunque de forma menos evidente que la tagatosa y la lactulosa, los digeridos de  $\beta$ -Lg y SC galactosilados incrementaron de forma significativa el crecimiento de la población de bifidobacterias con respecto a los controles de  $\beta$ -Lg y SC calentados y al control 10 h (sin sustrato). La población de lactobacilos, en cambio, se mantuvo constante, encontrándose únicamente diferencias significativas con la tagatosa.

A las 10 h de fermentación, las poblaciones de bacteroides y clostridios tampoco presentaron valores significativamente diferentes con respecto al control 10 h para ninguno de los sustratos estudiados y, en el caso del género *Atopobium*, sólo el valor obtenido tras la incubación con lactulosa fue estadísticamente diferente al obtenido con el control 10 h. Por último, para la población de bacterias del género *Eubacterium*, se encontraron diferencias significativas, con respecto al control 10 h, con el conjugado  $\beta$ -Lg:Gal digerido, tagatosa y lactulosa, pero no con el digerido del conjugado SC:Gal.

Para completar el estudio de fermentación, además del recuento bacteriano, también se llevó a cabo la determinación de los SCFAs (ácidos grasos de cadena corta) originados durante el proceso de fermentación. Se ha descrito que los SCFAs son eficazmente absorbidos y utilizados por las células epiteliales del colon, estimulando su crecimiento así como la absorción de agua y sales (Macfarlane y col., 2007). Tras su absorción por los colonocitos, el propionato pasa al torrente sanguíneo para ser metabolizado en el hígado como precursor de la gluconeogénesis. Además, el aumento de su producción a través de la fermentación se asocia con una disminución de lípidos en sangre y con la inhibición de la síntesis de colesterol en el hígado (Cheng y Lai, 2000; Wolever y col., 1996). El acetato también pasa a tejidos periféricos, siendo el principal ácido graso presente en la sangre y el sustrato más importante en la síntesis del colesterol (Emenaker y col., 2001; Isolauri y col., 2004). Además, en el colon, el butirato está implicado en el control de todos los mecanismos que controlan la apoptosis, división y proliferación celular (Cummings y col., 1987; Cummings, 1995; Shiavoshian y col., 2000), así como en el mantenimiento de la barrera intestinal (Marcil y col., 2002), y, junto con el propionato, ha sido relacionado con la prevención del cáncer de colon (Cummings y col., 1981; Bornet y col., 2002).



Así, de la misma manera que para el recuento bacteriano, se obtuvieron datos de la producción de SCFAs para las 0 y 10 h de incubación. Los SCFAs determinados fueron láctico, acético, propiónico y butírico (Figura R70).



**Figura R70.** Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) (mM) a las 0 h y después de 10 h de fermentación en ausencia de carbohidrato (control 10h) y en presencia de tagatosa, lactulosa, el digerido de la β-Lg control calentada 24 h a 40 °C y el digerido del conjugado β-Lg:Gal [24 h, 40 °C].

En general, los análisis por LC mostraron un incremento notable de los SCFAs totales después de las 10 h de incubación con todos los sustratos ensayados. Este aumento en la producción de SCFAs fue particularmente notable con lactulosa, cuya fermentación produjo niveles cuantificables de láctico, acético y propiónico (Figura R70). Esto está de acuerdo con Rycroft y col. (2001), quienes destacaron que la lactulosa, cuando es fermentada por las bifidobacterias, da lugar a una elevada producción de ácido acético y SCFAs totales. Asimismo, la metabolización de la tagatosa produjo principalmente láctico y en menor proporción acético y butírico (Figura R70). Finalmente, tras la incubación durante 10 h con los glicoconjugados se observó, como era de esperar, un incremento de los SCFAs totales más pronunciado que con los controles de proteína sin glicar y el control 10h (sin carbohidrato) (Figura R70), indicando que los glicoconjugados ensayados pueden actuar como sustratos fermentables para la microbiota intestinal, aumentando claramente la producción de acético y, en menor medida, la de butírico durante la incubación. Este incremento en la producción de ácido acético está directamente relacionado con el

incremento observado en la población de bifidobacterias en los cultivos fecales analizados por PCR cuantitativa (Tabla R20). Concretamente, los glicoconjugados  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] y SC:Gal [4 h, 60 °C] produjeron niveles de acético y butírico similares o moderadamente más elevados (en el caso del sistema SC:Gal) que los obtenidos con tagatosa (Figura R70).

### **Conclusiones parciales**

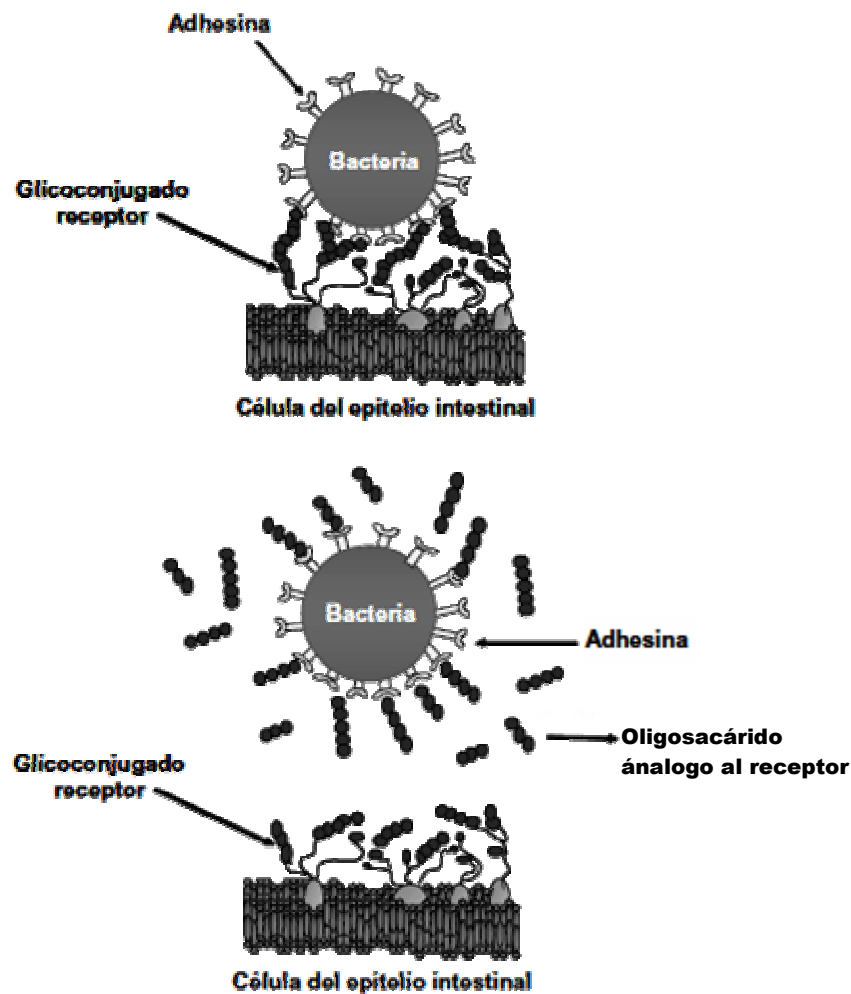
En resumen, los resultados obtenidos muestran que los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC estudiados en la presente memoria actúan como sustratos fermentables para las bacterias intestinales *in vitro*, aumentando la producción de ácido acético y SCFAs totales y promoviendo de forma significativa el crecimiento de bifidobacterias en cultivos fecales humanos, pero no el de bacteroides y clostridios, potencialmente perjudiciales. Esto indica que el compuesto de Amadori, tagatosil-lisina, formado durante las etapas iniciales de la glicación con Gal tanto de la  $\beta$ -Lg como del SC, posee un potencial carácter bifidogénico.

Asimismo, tales glicoconjugados podrían constituir una buena alternativa a la tagatosa como ingredientes prebióticos, ya que su mayor peso molecular, así como la resistencia de los compuestos de Amadori frente a la proteólisis enzimática (Erbersdobler y Faist, 2001; Faist y Erbersdobler, 2001; Finot, 2005) les podría permitir alcanzar zonas más distales del colon. Concretamente, en el presente trabajo, la glicación, especialmente de la  $\beta$ -Lg, con Gal durante 24 h a 40 °C resultó disminuir la digestibilidad proteica (apartado 4.6.1.1). De modo que, el compuesto de Amadori tagatosil-lisina, formado durante las etapas iniciales de la galactosilación vía RM de la  $\beta$ -Lg, podría llegar a tener un mayor carácter prebiótico que la tagatosa en el caso de que fuera capaz de alcanzar realmente el colon distal. Para poder confirmar esto sería necesario llevar a cabo estudios cinéticos de fermentación, así como experimentos adicionales *in vivo*.

### **4.8.3 Propiedades antiadherentes**

Se considera que la adhesión de bacterias potencialmente patógenas al intestino es el primer paso de la invasión y desarrollo de infecciones. La mayoría de las bacterias patógenas presentan en su superficie (glico)proteínas (lectinas) con capacidad para unirse, con una elevada especificidad, a carbohidratos (Ofek y col., 2000; Shoaf y col., 2006) o glicoconjugados (glicoproteínas o glicolípidos) (Ofek y col., 2000) localizados en la

superficie de los tejidos del huésped e iniciar la infección (Zopf y Roth, 1996). El bloqueo de estas lectinas con carbohidratos adecuados, estructuralmente similares a los receptores del huésped, puede ser una estrategia efectiva para prevenir la adhesión e infección bacteriana (Karlsson, 1998; Ofek y col., 2003) (Figura R71).



**Figura R71.** Modelo de acción directa de oligosacáridos análogos a los receptores bacterianos en la prevención de infecciones. (A) Las adhesinas tipo lectinas bacterianas reconocen los receptores oligosacáridos en las células del epitelio intestinal; (B) inhibición de la adhesión bacteriana por carbohidratos estructuralmente similares a los glicanos receptores.

Hasta ahora, una de las propuestas consideradas para inhibir la adhesión bacteriana ha sido el empleo de oligosacáridos sintéticos análogos a los receptores del huésped. Sin embargo, la baja eficacia de estos oligosacáridos, debido a su alta absorción a través de la mucosa intestinal y/o baja afinidad por las lectinas bacterianas, hace que sea necesario su

empleo a concentraciones elevadas (Ofek y col., 2003). Esto, unido al elevado coste de producción de tales oligosacáridos, hace que esta estrategia no sea viable a nivel industrial en el ámbito alimentario.

Por otra parte, y con el fin de incrementar la afinidad por las lectinas bacterianas, se está estudiando la posibilidad de unir múltiples moléculas del carbohidrato a un soporte polimérico adecuado (Sharon, 2006). En este sentido, la glicosilación de proteínas (soporte polimérico) vía reacción de Maillard bajo condiciones controladas es un proceso efectivo, simple, barato y seguro, por lo que podría constituir una alternativa para la obtención de glicoconjugados con propiedades antiadherentes, con capacidad de unión a ciertas lectinas presentes en la superficie de las bacterias patógenas intestinales, alterando, de este modo, su capacidad de adhesión a la mucosa intestinal.

Así, en la presente memoria se consideró la necesidad de evaluar la capacidad de los productos de la RM, tanto de glicoconjugados ricos en el compuesto de Amadori como con un alto contenido de productos avanzados de la reacción, para inhibir la adhesión de varias cepas intestinales de *Escherichia coli* a mucina, con el objetivo de determinar las posibles propiedades antiadherentes de estos productos. Para ello, se emplearon los glicoconjugados  $\beta$ -Lg/SC:Gal/Lac en estados iniciales ( $\beta$ -Lg:Gal 24 h a 40 °C,  $\beta$ -Lg:Lac 8 h a 60 °C, SC:Gal 4 h a 60 °C y SC:Lac 8 h a 60 °C) y avanzados ( $\beta$ -Lg:Gal 48 h a 50 °C,  $\beta$ -Lg:Lac 48 h a 60 °C, SC:Gal 72 h a 50 °C y SC:Lac 24 h a 60 °C) de la RM, obtenidos bajo las condiciones indicadas en la Tabla M10, todos ellos previamente sometidos a digestión gastrointestinal simulada.

#### **4.8.3.1 Efecto de los glicoconjugados digeridos sobre la adhesión bacteriana a mucina**

El efecto de los hidrolizados derivados de la digestión gastrointestinal *in vitro* de la proteína ( $\beta$ -Lg y SC) nativa, control calentada y glicada sobre los porcentajes de adhesión de las diferentes cepas de *E. coli* ensayadas (CBL2, CBL8 y CBM1) se muestra en la [Tabla R21](#). Todas las bacterias exhibieron unos valores similares de adhesión a mucina ( $P>0,05$ ). En general, en presencia de la proteína ( $\beta$ -Lg y SC) nativa digerida los porcentajes de adhesión no se vieron significativamente ( $P>0,05$ ) modificados, excepto en el caso de la *E. coli* CBL8, cuya adhesión aumentó ( $P<0,05$ ). Asimismo, la presencia del digerido de la proteína ( $\beta$ -Lg y SC) control (no glicada), sometida a las condiciones de incubación más enérgicas (48 h, 60 °C, para la  $\beta$ -Lg, y 24 h, 60 °C, para el SC), tampoco afectó de forma

significativa ( $P>0,05$ ) a la adhesión de las cepas de *E. coli* ensayadas con respecto a la proteína nativa digerida (datos no mostrados).

Los glicoconjugados digeridos, en cambio, mostraron tener un efecto diferente sobre los porcentajes de adhesión bacteriana en función de la cepa de *E. coli* estudiada, lo que sugiere que moléculas de diferente naturaleza podrían estar implicadas en las interacciones de reconocimiento entre los glicoconjugados y las moléculas situadas en la superficie de las células bacterianas. Así, la presencia de los digeridos de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] (con 14 moléculas de Gal unidas a la  $\beta$ -Lg tras la glicación) y [48 h, 50 °C] (con 19 moléculas de Gal unidas a la  $\beta$ -Lg tras la glicación) redujo notablemente los porcentajes de adhesión de *E. coli* CBL2, independientemente de su grado de glicación. Los conjugados digeridos  $\beta$ -Lg:Lac, así como los conjugados SC:Gal/Lac, también disminuyeron la adhesión de *E. coli* CBL2 a mucina, sin embargo, en este caso, la reducción de los porcentajes de adhesión fue más notable con los hidrolizados de los conjugados en estados iniciales de la RM, es decir,  $\beta$ -Lg:Lac [8 h, 60 °C], SC:Gal [4 h, 60 °C] y SC:Lac [8 h, 60 °C]. Dado que estos glicoconjugados se caracterizan por su máximo contenido en el compuesto de Amadori y bajo grado de agregación, tales resultados sugieren que el compuesto de Amadori, tagatosil-lisina (correspondiente a los derivados de Gal) o lactulosil-lisina (correspondiente a los derivados de Lac), tienen la capacidad de interferir en la adhesión de *E. coli* CBL2 a mucina.

Por otro lado, como vimos anteriormente, debido al mayor grado de agregación de los conjugados en estados avanzados de la RM, tras su digestión se forman péptidos con un mayor tamaño que los derivados de los conjugados en estados iniciales (Figura R66). De este modo, gran parte de los residuos de carbohidrato unidos a la cadena peptídica podrían estar enmascarados, no siendo accesibles a las moléculas de la superficie de las células bacterianas implicadas en su reconocimiento. Esto podría explicar el que los conjugados en estados avanzados de la RM no inhibieran la adhesión de *E. coli* CBL2 a mucina.

**Tabla R21.** Efecto de los diferentes glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC digeridos sobre la adhesión (expresada como porcentajes de fluorescencia) de las cepas de *E. coli* CBL2, CBL8 y CBM1 a mucina.

Cepas <i>E. coli</i>	Mucina	$\beta$ -lactoglobulina				
		$\beta$ -Lg Nativa	$\beta$ -Lg:Gal [24h, 40 °C]	$\beta$ -Lg:Gal [48h, 50 °C]	$\beta$ -Lg:Lac [8h, 60 °C]	$\beta$ -Lg:Lac [48h, 60 °C]
<b>CBL2</b>	5,56 $\pm$ 0,31 <sup>a*</sup>	5,55 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	3,49 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>	3,62 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	3,67 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	4,31 $\pm$ 0,31 <sup>c</sup>
<b>CBL8</b>	5,30 $\pm$ 0,41 <sup>a,b,c</sup>	6,56 $\pm$ 0,38 <sup>d</sup>	5,19 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	5,62 $\pm$ 0,48 <sup>c,d</sup>	5,23 $\pm$ 0,23 <sup>a,b</sup>	6,07 $\pm$ 0,64 <sup>b,c,d</sup>
<b>CBM1</b>	5,09 $\pm$ 0,80 <sup>a,b</sup>	4,78 $\pm$ 0,51 <sup>a,b</sup>	4,44 $\pm$ 0,58 <sup>b,c</sup>	3,94 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	5,20 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	4,00 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>
	Mucina	Caseinato sódico				
		SC Nativo	SC:Gal [4h, 60 °C]	SC:Gal [72h, 50 °C]	SC:Lac [8h, 60 °C]	SC:Lac [24h, 60 °C]
<b>CBL2</b>	5,56 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	6,05 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	3,48 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	4,27 $\pm$ 0,44 <sup>a,b</sup>	3,63 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>	4,44 $\pm$ 0,62 <sup>c</sup>
<b>CBL8</b>	5,30 $\pm$ 0,41 <sup>a,b</sup>	5,91 $\pm$ 0,75 <sup>a,b</sup>	6,11 $\pm$ 1,07 <sup>b</sup>	4,95 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	5,88 $\pm$ 1,26 <sup>a,b</sup>	5,45 $\pm$ 0,35 <sup>a,b</sup>
<b>CBM1</b>	5,09 $\pm$ 0,80 <sup>a,b</sup>	5,62 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	5,43 $\pm$ 0,57 <sup>a,b</sup>	4,21 $\pm$ 0,39 <sup>c</sup>	5,73 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	5,05 $\pm$ 0,63 <sup>a,b</sup>

<sup>a-c</sup> Diferentes letras en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

\* Medidas realizadas por triplicado. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media.

La adhesión de *E. coli* CBM1 se vio significativamente reducida ( $P < 0,05$ ) en presencia de los digeridos de los complejos  $\beta$ -Lg:Gal,  $\beta$ -Lg:Lac y SC:Gal en estados avanzados de la RM, es decir, obtenidos bajo las condiciones de tiempo y temperatura de incubación más severas (48 h a 50 y 60 °C para la  $\beta$ -Lg galactosilada y lactosilada, respectivamente, y 72 h a 50 °C, para el SC galactosilado). Teniendo en cuenta la gran cantidad de productos que se forman durante las etapas avanzadas de la RM, estos resultados sugieren que en la adhesión de la *E. coli* CBM1 a mucina podrían intervenir moléculas de diversa naturaleza, cada una con una probable especificidad diferente.

Por último, la adhesión de *E. coli* CBL8, a diferencia de las dos cepas anteriores, no resultó modificada por ninguno de los glicoconjugados digeridos estudiados ([Tabla R21](#)).

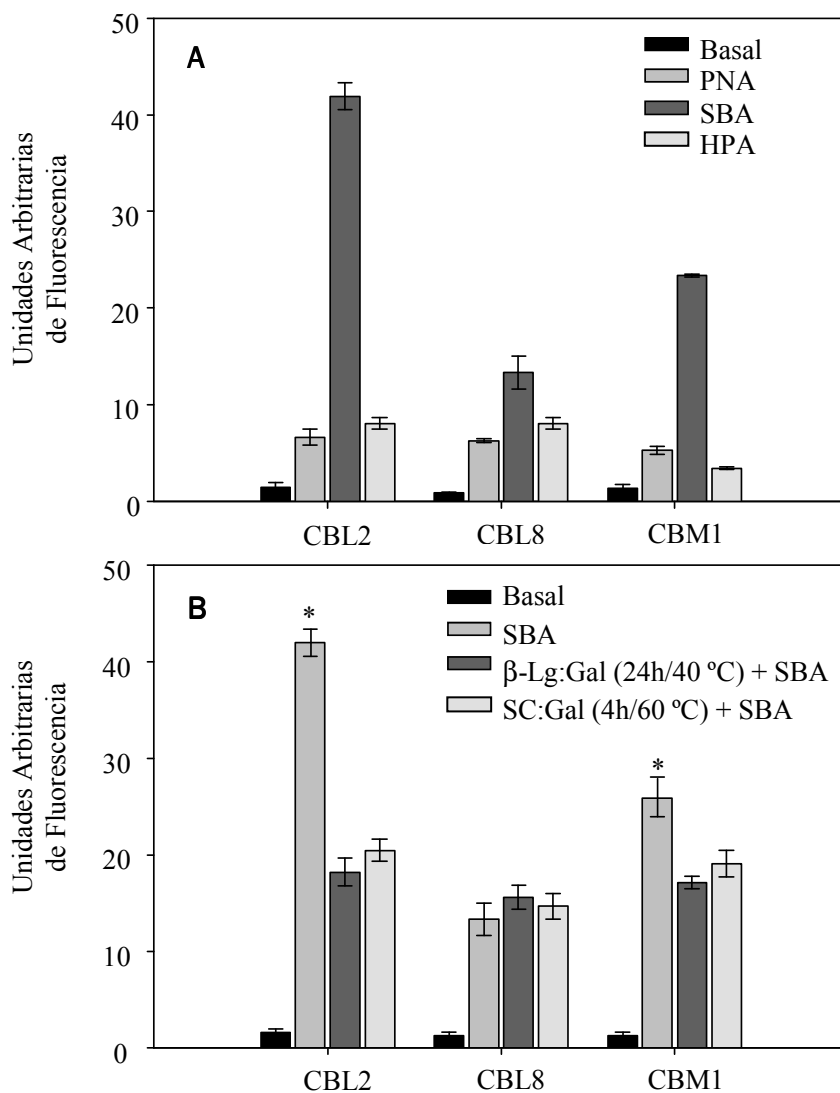
#### **4.8.3.2 Ensayos competitivos de adhesión en presencia de lectinas**

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de interacción entre los glicoconjugados y las cepas de *E. coli* estudiadas, se realizaron una serie de ensayos competitivos de adhesión en presencia de lectinas de diferente origen.

La mayoría de las lectinas reaccionan con los azúcares reductores situados en el extremo terminal de glicoproteínas o glicolípidos, formando uniones (lábilas, no covalentes y reversibles) muy similares a las de los anticuerpos con sus respectivos antígenos (Micucci y Camps, 1987), pero sin ser inducidas como parte de la respuesta inmune a la estimulación antigénica. En cuanto a las lectinas empleadas en el presente trabajo, la *aglutinina de soja* (*Glycine max*, SBA) se une específicamente a residuos de  $\alpha$ - y  $\beta$ -N-acetilgalactosamina (GalNAc) y  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosa; la *aglutinina de Helix pomatia* (HPA) presenta afinidad por residuos de  $\alpha$ -N-acetilgalactosamina y la *aglutinina del cacahuete* (*Arachis Hypogaea*, PNA) se une específicamente a residuos de  $\beta$ -galactosa(1-3)GalNAc.

En la [Figura R72 \(A\)](#) se muestra la especificidad de unión de las cepas de *E. coli* ensayadas a la SBA, HPA y PNA. Las diferentes cepas de *E. coli* estudiadas mostraron tener una capacidad similar de reconocimiento de la PNA. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el reconocimiento de la SBA por las tres cepas bacterianas, siguiendo este orden: CBL2 > CBM1 > CBL8. Además, *E. coli* CBM1 presentó la menor capacidad de unión a la HPA. Estos resultados evidenciaron la abundancia de sitios de reconocimiento específicos de la SBA en la superficie celular de las cepas de *E. coli* estudiadas; por ello, la SBA fue la lectina empleada para los ensayos competitivos de

adhesión con los digeridos de los conjugados  $\beta$ -Lg:Gal y SC:Gal, obtenidos tras la incubación 24 h a 40 °C (con 14 moléculas de Gal unidas a la  $\beta$ -Lg) y 4 h a 60 °C (con 14 moléculas de Gal unidas al SC), respectivamente (**Figura R72 (B)**). Estos glicoconjugados fueron los seleccionados para el estudio debido a su elevada eficacia de glicación (mayor que la de la  $\beta$ -Lg y el SC incubados con Lac a 60 °C durante 8 h (10 y 6 moléculas de Lac unidas a la  $\beta$ -Lg y al SC, respectivamente) y al limitado avance de la RM hacia la formación de agregados proteicos y compuestos coloreados (Tablas R2 y R7).



**Figura R72.** Unión de lectinas (aglutinina de soja, SBA; aglutinina de cacahuete, PNA; y aglutinina de Helix pomatia, HPA) a diferentes cepas de *E. coli* (CBL2, CBL8 y CBM1) (**A**) y efecto de los glicoconjugados digeridos  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] y SC:Gal [4 h, 60 °C] sobre la unión a SBA de las diferentes cepas de *E. coli* (**B**). \* Indica diferencias estadísticamente significativas para la misma cepa.



La incubación de ambos complejos de Maillard con las suspensiones bacterianas resultó en una reducción significativa ( $P < 0,05$ ) de la unión de SBA a *E. coli* CBL2 y CBM1, no alterando la afinidad de *E. coli* CBL8 por esta lectina. La fuerte reducción en la unión de SBA de *E. coli* CBL2 concuerda con los menores porcentajes de adhesión a mucina anteriormente calculados para esta cepa en presencia de estos glicoconjugados (Tabla R21). Asimismo, la capacidad de unión inalterada de SBA a *E. coli* CBL8 está de acuerdo con la no variación de los porcentajes de adhesión de esta cepa a mucina en presencia de los dos glicoconjugados ensayados (Tabla R21). Sin embargo, la menor capacidad de unión a SBA mostrada por *E. coli* CBM1 en presencia de ambos conjugados digeridos, no fue acompañada de una reducción en los valores de adhesión de esta cepa a mucina (Tabla R21).

La reducción en la capacidad de unión de SBA a *E. coli* CBL2 y CBM1 en presencia de los conjugados digeridos  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] y SC:Gal [4 h, 60 °C], indica, de acuerdo con los resultados de adhesión a mucina, que adhesinas tipo lectinas reactivas a galactosa pueden ser las responsables, al menos en parte, del reconocimiento de los glicoconjugados estudiados en los ensayos de adhesión. Además, el hecho de que la reducción en la adhesión de SBA a *E. coli* CBM1 no concuerda con los porcentajes de adhesión inalterados de esta cepa a mucina en presencia de estos conjugados, apoya la suposición realizada anteriormente, según la cual, además de las adhesinas reactivas a galactosa, otras moléculas de distinta naturaleza podrían estar implicadas en la adhesión de *E. coli* CBM1 a mucina.

Se sabe que la microbiota intestinal se puede modular a través de la dieta; sin embargo, los estudios que han evaluado la capacidad potencial de los carbohidratos de la dieta y derivados para inhibir la adhesión de bacterias intestinales potencialmente patogénicas son muy escasos (Shoaf y col., 2006; Laparra y Sanz, 2009; Sarabia-Sainz y col., 2009). Algunos de estos estudios han descrito que varios oligosacáridos prebióticos (galactooligosacáridos > lactulosa y oligofruktosa, incluyendo la inulina) inhiben la adhesión de patógenos entéricos, bloqueando los sitios de reconocimiento que cubren la superficie de las células del epitelio gastrointestinal (Shoaf y col., 2006; Kunz y Rudloff, 2008). Por otra parte, otros estudios han demostrado que varios glicoconjugados sin digerir obtenidos por lactosilación no enzimática de la seroalbúmina de diferentes especies (humana, bovina y porcina) pueden reducir la adhesión de *E. coli* a mucina (Ledesma-Osuna y col., 2009; Sarabia-Sainz y col., 2009), así como ser reconocidos por lectinas específicas de diferente origen (Aring y col., 1989; Ledesma-Osuna y col., 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los glicoconjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Lac y SC:Gal/Lac son reconocidos

principalmente por *E. coli* CBL2, interfiriendo claramente en su adhesión a mucina. Hasta donde nosotros sabemos, estos resultados representan la primera evidencia del efecto inhibidor de una proteína, concretamente de la  $\beta$ -Lg, galactosilada vía RM y posteriormente sujeta a digestión gastrointestinal simulada, sobre la adhesión *in vitro* de *E. coli*.

#### **4.8.3.3 Detección de factores de virulencia**

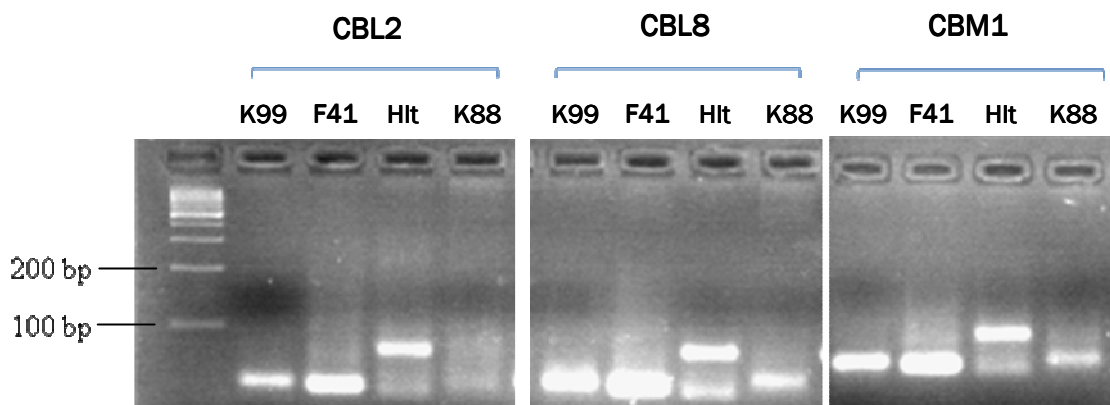
La *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es la principal causa de diarrea en los países desarrollados. Algunos de los mecanismos moleculares de patogenicidad de la *E. coli* han sido caracterizados, mostrando la implicación de complejas interacciones patógeno-huésped a través de un grupo heterogéneo de moléculas de naturaleza proteica situadas en la superficie de las células bacterianas; adhesinas fimbriales y adhesinas no fimbriales (Fleckenstein y col., 2010). Entre estas interacciones, se ha descrito la unión de la proteína de invasión enterotoxigénica A (Tia) (adhesina no fimbrial) a carbohidratos acídicos, como los proteoglicanos heparán sulfato (Fleckenstein y col., 2002), entre otros, situados en la superficie de los enterocitos. Asimismo, las mucinas, una familia de proteínas altamente glicosiladas de alto peso molecular (glicoconjugados) producidas por tejidos epiteliales, son también potenciales dianas para la adhesión de *E. coli* mediada por la Tia.

Otros mecanismos de patogénesis claramente definidos son la expresión de antígenos fimbriales de adhesión (o adhesinas fimbriales tipo lectinas), los cuales tienen un importante impacto en la habilidad de las cepas de *E. coli* para adherirse y colonizar los enterocitos del intestino delgado del huésped, así como la producción posterior de toxinas (toxina termolábil (Hlt) y/o termoestable (Hst)) (Fleckenstein y col., 2010). Hasta la fecha, se han descrito determinadas asociaciones específicas de los factores de virulencia, K88/Hlt y K99/F41, en cepas de *E. coli* ETEC porcina (West y col., 2007), las cuales frecuentemente expresan adhesinas fimbriales similares a las de las cepas de *E. coli* ETEC humanas (Fleckenstein y col., 2010). En este sentido, se han realizado trabajos que han permitido determinar la participación de las fimbrias K88 (Sarabia-Sainz y col., 2009; Koh y col., 2008) y K99/F41 en la adhesión de *E. coli* ETEC porcina a células embrionarias intestinales (INT-407) (Koh y col., 2008) o epiteliales (Caco-2) humanas (Roubos-van den Hil y col., 2009).

Con el fin de seguir profundizando en el estudio de estos mecanismos, en el presente trabajo se llevó a cabo la identificación de los posibles factores de virulencia implicados en la patogénesis de las cepas de *E. coli* ensayadas. Para ello, se realizó un análisis por PCR

cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), utilizando cebadores específicos para los antígenos o adhesinas fimbriales K99, F41, K88 y la Hlt (Tabla M13). A partir de las curvas de amplificación se calcularon los valores de ciclo umbral (Ct). Estos indicaron una expresión diferencial del gen F41 en *E. coli* CBM1 ( $26,4 \pm 0,1$ ), con respecto a la de *E. coli* CBL2 ( $24,9 \pm 0,1$ ) y *E. coli* CBL8 ( $24,8 \pm 0,3$ ). Asimismo, *E. coli* CBL2 exhibió el nivel más bajo de expresión de la toxina termolábil (Hlt), de acuerdo con el mayor valor Ct ( $26,3 \pm 0,6$ ) calculado para esta cepa en comparación con los de *E. coli* CBL8 ( $24,5 \pm 0,5$ ) y *E. coli* CBM1 ( $24,4 \pm 0,2$ ). La expresión diferencial del gen F41 y Hlt podría estar relacionado con las diferencias observadas en el efecto inhibitor de los conjugados digeridos  $\beta$ -Lg:Gal [24 h, 40 °C] y SC:Gal [4 h, 60 °C] sobre la adhesión de *E. coli* CBL2 y CBM1.

Asimismo, los productos resultantes de la amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa (4,5%) de alta resolución (Figura R73). Los geles obtenidos revelaron la presencia de productos de amplificación para los antígenos fimbriales K99 (en las tres cepas de *E. coli* ensayadas) y K88 (únicamente en las cepas CBL8 y CBM1), aunque, debido a los bajos niveles de amplificación, no fue posible calcular valores Ct significativos para ellos. El que los glicoconjugados no afectaran a la adhesión de *E. coli* CBL8 podría ser atribuido a la adhesina fimbrial K88, la cual no se detectó en *E. coli* CBL2 (Figura R73).



**Figura R73.** Genes de factores de virulencia detectados en las diferentes cepas de *E. coli* (CBL2, CBL8 y CBM1) ensayadas; antígenos fimbriales (K99, F41 y K88) y toxina termolábil (Hlt).

### **Conclusiones parciales**

Los resultados obtenidos muestran que los glicoconjugados  $\beta$ -Lg:Gal/Lac y SC:Gal/Lac, tanto en estados iniciales como avanzados de la RM, sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro*, pueden contribuir a inhibir la adhesión de *E. coli* a mucina, en función de la cepa considerada. Este comportamiento cepa-dependiente mostrado por los glicoconjugados sugiere la implicación de diferentes sitios de reconocimiento de carbohidrato en la superficie de la célula bacteriana. En este sentido, los ensayos competitivos de adhesión con la lectina SBA indicaron que adhesinas tipo lectinas reactivas a galactosa, situadas en la superficie de las células bacterianas, pueden ser las responsables, parcialmente, del reconocimiento de estos glicoconjugados. Además, el avance de la reacción de Maillard podría tener también un efecto en la actividad anti-adherente de los glicoconjugados en función de la cepa estudiada.

A falta de futuros estudios *in vivo*, estos resultados indican que la producción de complejos de Maillard, con un elevado número de moléculas de carbohidrato unidas a la proteína, es una posible estrategia económica y eficaz para bloquear las adhesinas de ciertas bacterias potencialmente patógenas implicadas en la colonización de la mucosa intestinal y en el desarrollo de la infección.

## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES GENERALES

**1.-** La piridoxamina compite con los grupos amino libres de las proteínas por el grupo carbonilo de la Gal/Tag, inhibiendo ligeramente la formación de los correspondientes compuestos de Amadori y de Heyns. Además, se ha demostrado el potente efecto inhibitorio de la piridoxamina sobre la formación de agregados proteicos durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard.

**2.-** La glicación del caseinato sódico con Lac y, especialmente, con Gal altera notablemente las características de flujo y viscoelásticas del SC, obteniéndose glicoconjugados con mejores propiedades gelificantes que la proteína nativa. Dichos glicoconjugados presentan un comportamiento de flujo pseudoplástico, una mayor viscosidad y un comportamiento viscoelástico intenso, especialmente tras periodos de incubación más largos.

**3.-** Los glicoconjugados de SC y Gal/Lac/Dx<sub>10</sub>, obtenidos en estados iniciales de la RM, forman emulsiones aceite/agua más estables que las estabilizadas con el SC nativo, empleando los HI-US como sistema de emulsificación.

**4.-** La glicación de la  $\beta$ -Lg y del SC con Gal mejora las propiedades interfaciales (eficiencia de adsorción y propiedades reológicas) dando lugar a espumas más estables que la proteína original, especialmente a pH 5 en los glicoconjugados de SC.

**5.-** Se ha desarrollado un método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem para la identificación y caracterización, incluyendo los sitios de glicación, de los glicoconjugados tras su digestión gastrointestinal *in vitro*. Además, se ha descrito una nueva ruta de fragmentación de los compuestos de Amadori y de Heyns que conduce a la formación del correspondiente ión iminio.

**6.-** La glicación con Gal/Lac/Dx<sub>10</sub>, tanto en estados iniciales como avanzados, disminuye la digestibilidad *in vitro* de la  $\beta$ -Lg. Sin embargo, la digestibilidad del SC permanece inalterada tras su glicación debido a su estructura más abierta y flexible.

**7.-** Los digeridos de los glicoconjugados de la  $\beta$ -Lg obtenidos en etapas iniciales de la RM presentan una inmunorreactividad mayor que la proteína sin glicar digerida, debido a la reducción de su digestibilidad. Por el contrario, etapas avanzadas de la reacción conducen

a una similar inmunorreactividad de los glicoconjugados frente a la proteína sin glicar digerida, debido al enmascaramiento parcial de los epítomos.

**8.-** En los estudios de fermentación *in vitro* con cultivos de microorganismos puros se ha observado que los glicoconjugados de SC y  $\beta$ -Lg con Gal/Lac tras su digestión gastrointestinal *in vitro* son eficazmente metabolizados por todas las cepas de lactobacilos y bifidobacterias ensayadas. En cuanto al estado de glicación, se detectó un mayor crecimiento bacteriano con los glicoconjugados obtenidos en estados iniciales de la RM.

**9.-** En los ensayos de fermentación *in vitro* utilizando muestras fecales humanas, los glicoconjugados de SC y  $\beta$ -Lg con Gal promueven de forma significativa el crecimiento de bifidobacterias, pero no el de bacteroides y clostridios, aumentando la producción de ácido acético y, en menor medida, ácido butírico.

**10.-** Los glicoconjugados de  $\beta$ -Lg y SC con Gal/Lac, tanto en estados iniciales como avanzados de la RM, sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro*, contribuyen a la inhibición de la adhesión de *Escherichia coli* a mucina. Ensayos competitivos de adhesión indicaron que adhesinas tipo lectinas reactivas a galactosa son, en parte, las responsables del reconocimiento de estos glicoconjugados.

**Los resultados presentados en esta memoria indican que los glicoconjugados derivados de  $\beta$ -Lg y SC podrían servir como base para el desarrollo de nuevos ingredientes alimentarios con funcionalidad tecnológica y bioactividad mejorada con respecto a la proteína original.**



## **6. BIBLIOGRAFÍA**



- Abismail, B.**, Canselier, J. P., Wilhelm, A. M., Delmas, H., y Gourdon, C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, **1999**, 6, 75-83.
- Adams, S. L.**, Barnett, D., Walsh, B. J., Pearce, R. J., Hill, D. J., y Howden, M. E. H. Human IgE-binding synthetic peptides of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. *In vitro* cross-reactivity of the allergens. *Immunology and Cell Biology*, **1991**, 69, 191-197.
- Adler-Nissen, J.** Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1979**, 27, 1256-1262.
- Adrover, M.**, Vilanova, B., Muñoz, F, y Donoso, J. Inhibition of glycosylation processes: the reaction between pyridoxamine and glucose. *Chemistry and Biodiversity*, **2005**, 2, 964-975.
- Adrover, M.**, Vilanova, B., Muñoz, F., y Donoso, J. Pyridoxamine, a scavenger agent of carbohydrates. *International Journal and Chemical Kinetic*, **2007**, 39, 154-167.
- Adrover, M.**, Vilanova, B., Muñoz, F, y Donoso, J. Unexpected isomeric equilibrium in pyridoxamine Schiff bases. *Bioorganic Chemistry*, **2009**, 37, 26-32.
- Aider, M.** y de Halleux, D. Isomerization of lactose and lactulose production. Review. *Trends of Food Science and Technology*, **2007**, 18, 356-364.
- Ajandouz, E. H.** y Puigserver, A. Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 1786-1793.
- Ajandouz, E. H.**, Tchiakpe, L. S., Dalle Ore, F., Bernajiba, A., y Puigserver, A. Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *Food Chemistry and Toxicology*, **2001**, 66(7), 926-931.
- Alais, C.** y Linden, G. Manual de bioquímica de los alimentos. Masson. Barcelona, **1990**.

- Alkanhal, H.**, Al-Othman, A. A., y Hewedi, F. M. Changes in protein nutritional quality in fresh and recombined ultra high temperature treated milk during storage. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **2001**, 52, 509-514.
- Almécija, M.C.** Obtención de la lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero. Tesis de Doctorado en Tecnología y Calidad de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad de Granada, España, **2007**.
- Almeida, K.E.**, Tamime, A. Y., y Oliveira, M. N. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, **2009**, 42(2), 672–678.
- Amadori, M.** The condensation product of glucose and p-anisidine. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei*. **1929**, 9, 226–230.
- Amarnath, V.**, Amarnath, K., Amarnath, K., Davies, S., y Roberts, L. J. Pyridoxamine: an extremely potent scavenger of 1, 4-dicarbonyls. *Chemical Research in Toxicology*, **2004**, 17(3), 410-415.
- Ames, J.M.** The Maillard reaction. En: B. J. F. Hudson (Ed.), *Biochemistry of Food Proteins*, Elsevier Science Publishers, London, **1992**, pp 99–153.
- Ames, J. M.** Determination of N-ε-(carboxymethyl)lysine in foods and related systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2008**, 1126, 20-24.
- Ames, J. M.**, Apriyantono, A., y Arnoldi, A. A low molecular weight coloured compounds formed in xylose-lysine model system. *Food Chemistry*, **1993**, 46, 121–127.
- Ames, J.M.**, Wynne, A., Hofmann, A., Plos, S., y Gibson, G.R. The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, **1999**, 82, 489–495.
- Aminlari, M.**, Ramezani, R., y Jadidi, F. Effect of Maillard-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2005**, 85, 2617-2624.

- Andersen, C. M.**, y Mortensen, G. Fluorescence spectroscopy: a rapid tool for analyzing dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, 720–729.
- Antipova, A. S.**, Semenova, M. G., y Belyakova, L. E. Effect of sucrose on the thermodynamic properties of ovalbumin and sodium caseinate in bulk solution and at air–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **1999**, 12, 261-270.
- Aoki, T.**, Hiidome, Y., Sugimoto, Y., Ibrahim, H., y Kato, Y. Modification of ovalbumin with oligogalacturonic acids through the Maillard reaction. *Food Research International*, **2001**, 34, 127–132.
- Aoki, T.**, Iskandar, S., Yoshida, T., Takahashi, K., y Hattori, M. Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugating with chitosan. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **2006**, 70, 2349-2356.
- Aring, J.**, Schlepperschaefer, J., Burkart, V., y Kolb, H. Nonenzymatically glycosylated serum-albumin - interaction with galactose-specific liver lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1989**, 1010, 140-144.
- Arita, K.**, Babiker, E. E., Azakami, H., y Kato A. Effect of chemical and genetic attachment of polysaccharides to proteins on the production of IgG and IgE, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 2030-2036.
- Armstrong, H. J.**, Hill, S. E., Schrooyen, P., y Mitchell, J. R. A comparison of the viscoelastic properties of conventional and Maillard protein gels. *Journal of Texture Studies*, **1994**, 25, 285-298.
- Asselin, J.**, Hebert, J., y Amiot, J. Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *Journal of Food Science*, **1989**, 54, 1037-1039.
- Asselin, J.**, Hébert, J., y Amiot, J. Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *Journal of Food Science*, **2006**, 54, 1031-1036.
- Astwood, J. D.**, Leach, J. N., y Fuchs, R. L. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology*, **1996**, 14, 1269-1273.

- Azuaga, A. I.**, Galisteo, M. L., Mayorga, O. L., Cortijo, M., y Mateo, P. L. Heat and cold denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin B. *FEBS Letters*, **1992**, 309, 258-260.
- Azuma, N.**, Yamauchi, K., y Mitsuoka, T. Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human k-casein. *Agricultural, Biology and Chemistry*, **1984**, 48, 2159-2161.
- Baisier, W. M.**, y Labuza, T. P. Maillard browning kinetics in a liquid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1992**, 40, 707-713.
- Ball, G.**, Shelton, M. J., Walth, B. J., Hill, D. J., Hosking, C. S., y Howden, M. E. H. A major continuous allergenic epitope of bovine  $\alpha$ -lactoglobulin recognized by human IgE binding. *Clinical and Experimental Allergy*, **1994**, 24, 758-764.
- Baranyi, J.** y Roberts, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, **1994**, 23, 277-294.
- Beadle, J. R.**, Saunders, J. P., y Wadja, T. J. Process for manufacturing tagatose. U.S. Patent, Número 5.002.612, **1991**.
- Beadle, J. R.**, Saunders, J. P., y Wajda, T. J. Process for manufacturing tagatose. U.S. Patent, Número 5.078.796, **1992**.
- Behrend, O.**, y Schubert, K. A. X. Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2000**, 7, 77-85.
- Bell, L. N.** Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration. *Food Chemistry*, **1997**, 59 (1), 143-147.
- Belloque, J.** y Smith, G. M. Thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. A  $^1\text{H}$  NMR study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46, 1805-1813.
- Ben-Gara, I.** y Zimmerman, G. Changes in the nitrogenous constituents of stable foods and feeds during storage. I. Decrease of lysine. *Journal of Food Science and Technology*, **1972**, 9, 113-116.

- Benjakul, S.**, Lertittikul, W., y Bauer, F. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system. *Food Chemistry*, **2005**, 93 (2), 189-196.
- Berkhout, B.**, Derksen, G. C., Back, N. K., Klaver, B., de Kruif, C. G., y Visser, S. Structural and functional analysis of negatively charged milk proteins with anti-HIV activity. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **1997**, 13 (13), 1101-1107.
- Besler, M.**, Eigenmann, P., y Schwartz, R. H. Cow'smilk (*Bos domesticus*). *Internet Symposium Food Allergens*, **2002**, 4, 19-106.
- Beyer, K.**, Morrow, E., Li, X.-M., Bardina, L., Bannon, G. A., Burks, A., y Sampson, H. A. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2001**, 107, 1077-1081.
- Biziulevičius, G. A.**, Kislukhina, O. V., Kazlauskaitė, J., y Zukaite, V. Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a 'cause and effect' theory of bifunctionality. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **2006**, 46, 131-138.
- Bleumink, E.** y Young, E. Identification of the atopic allergen in cow's milk. *International Archives of Allergy*, **1968**, 34, 521.
- Bondy, C.** y Söllner, K. On the mechanism of emulsification by ultrasonic waves. *Transactions of the Faraday Society*, **1935**, 31, 835-842.
- Bonomi, F.**, Fiocchi, A., Frokiaer, H., Gaiaschi, A., Iametti, S., Poiesi, C., Rasmussen, P., Restani, P., y Rovere, P. Reduction of immunoreactivity of bovine beta-lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. *Journal of Dairy Research*, **2003**, 70, 51-59.
- Bornet, F. R.**, Brouns, F., Tashiro, Y., y Duvillier, V. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestive Liver Diseases*, **2002**, 32 (2), S111-S120.

- Borrelli, R. C.**, Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., y Fogliano, V. Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 1338-1343.
- Borrelli, R. C.** y Fogliano, V. Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2005**, 49, 673-678.
- Bouhallab, S.**, Favrot, C., y Maubois, J. L. Growth-promoting activity of tryptic digest of caseinomacropeptide for *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Lait*, **1993**, 73, 73-77.
- Bouhallab, S.**, Morgan, F., Henry, G., Mollé, D., y Léonil, J. Formation of stable covalent dimer explains the high solubility at pH 4.6 of lactose- $\alpha$ -lactoglobulin conjugates heated near neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 1489-1494.
- Bressa, F.**, Tesson, N., Rosa, M. D., Sensidoni, A., y Tubaro, F. Antioxidant effect of Maillard reaction products: application to a butter cookie of a competition kinetics analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44, 692-695.
- Briczinski, E. P.** y Roberts, R. F. Production of an exopolysaccharide-containing whey protein concentrate by fermentation of whey. *Journal of Dairy Science*, **2002**, 85 (12), 3189-3197.
- Broersen, K.**, Voragen, A. G. J., Hamer, R. J., y de Jongh, H. H. J. Glycoforms of  $\beta$ -lactoglobulin with improved thermostability and preserved structural packing. *Biotechnology and Bioengineering*, **2004**, 86, 78-87.
- Brown, E. M.** Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin with lipids: a review. *Journal of Dairy Science*, **1984**, 67, 713-722.
- Brownlee, M.**, Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., y Cerami, A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linked. *Science (Washington, D.C.)*, **1986**, 232, 1629-1632.
- Brownlow, S.**, Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. T., y Sawyer, L. 1997. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8 angstrom resolution-still an enigmatic lipocalin. *Structure*, **1997**, 5, 481-495.



- Bu, G.**, Lu, J., Zheng, Z., y Luo, Y. Influence of Maillard reaction conditions on the antigenicity of bovine  $\alpha$ -lactalbumin using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2009**, 89, 2428-2434.
- Bucala, R.**, Model, P., y Cerami, A. Modifications of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1984**, 48, 105-109.
- Bunn, H. F.** y Higgins, P. J. Reactions of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, **1981**, 213, 222-224.
- Bunn, H. F.**, Shapiro, R., McManus, M., Garrick, L., McDonald, M. J., Gallop, P. M., y Gabbay, K. H. Structural heterogeneity of human haemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry*, **1979**, 254, 3892-3898.
- Burvall, A.**, Asp, N.-G., Bosson, A., San José, C., y Dahlgvist, A. Storage of lactose-hydrolyzed dried milk: effect of water activity on the protein nutritional value. *Journal of Dairy Research*, **1978**, 45, 381-389.
- Bush, R. K.** y Hefle, S. L. Food Allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1996**, 36, S119-S163.
- Cabodevila, O.**, Hill, S. E., Armstrong, H. J., De Sousa, I., y Mitchell, J. R. Gelation enhancement of soy protein isolate using the Maillard reaction and high temperatures. *Journal of Food Science*, **1994**, 59, 872-875.
- Cairolì, S.**, Iametti, S, y Bonomi, F. Reversible and irreversible modifications of  $\beta$ -lactoglobulin upon exposure to heat. *Journal of Protein Chemistry*, **1994**, 13, 347-354.
- Camino, N. A.**, Perez, O. E., y Pilosof, A. M. R. Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, **2009**, 23, 1089-1095.
- Cämmerer, B.**, Jalyschko, W., y Kroh, L. W. Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50 (7), 2083-2087.

- Cämmerer, B.** y Kroh, L. W. Antioxidant activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, **2006**, 223 (4), 469-474.
- Canselier, J. P.**, Delmas, H., Wilhelm, A. M., y Abismail, B. Ultrasound emulsification – an overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **2002**, 23, 333-349.
- Carabasa-Giribert, M.** y Ibarz-Ribas, A. Kinetics of color development in aqueous glucose system at high temperatures. *Journal of Food Engineering*, **2000**, 44 (3), 181-189.
- Cayot P.** y Lorient D. Structure-function relationships of whey proteins. En: S. Damodaran S. y A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, **1997**, pp. 199-223.
- Cerny, C.** The aroma side of the Maillard reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2008**, 1126, 66-71.
- Cerrutti, P.**, Resnik, S. L., Seldes, A., y Ferro Fontán, C. Kinetics of deteriorative reactions in food systems of high water activity: glucose 5-HMF accumulation and fluorescence development due to non-enzymatic browning. *Journal of Food Science*, **1985**, 50, 627–636.
- Chan, R. I. M.**, Stich, H. F., Rosin, M. P., y Powrie, W. D. Antimutagenic activity of browning reaction products. *Cancer Letters*, **1979**, 15, 27-33.
- Charbonnel, E.**, Wilde, P. J., y Clark, D. C. Preparation and characterization of a model whey protein isolate to determine the contribution of the protein components to functional properties (Posters). Symposium of Royal Society of Chemistry, Food Chemistry Group, Dijon, March **1994**.
- Chatterton, D. E. W.**, Smithers, G., Roupas, P., & Brodkorb, A. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin-Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, **2006**, 16, 1229-1240.
- Chen, X. M.** y Kitts, D. D. Antioxidant activity and chemical properties of crude and fractioned Maillard reaction products derived from four sugar-amino acid Maillard reaction model systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2008**, 1126, 220-224.

- Cheng, H. H.** y Lai, M. H. Fermentation of resistant rice starch produces propionate reducing serum and hepatic cholesterol in rats. *Journal of Nutrition*, **2000**, 130, 1991-1995.
- Chetyrkin, S. V.**, Zhang, W., Hudson, B. G., Serianni, A. S., y Voziyan, P. A. Pyridoxamine protects proteins from functional damage by 3-deoxyglucosone: mechanism of action of pyridoxamine. *Biochemistry*, **2008**, 47, 997-1006.
- Chevalier, F.**, Chobert, J. -M., Dalgalarrrondo, M., y Haertlé, T. Characterization of the Maillard reactions products of  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated in mild conditions. *Journal of Food Biochemistry*, **2001d**, 25, 33-55.
- Chevalier, F.**, Chobert, J. M., Genot, C., y Haertlé, T. Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated with several sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001a**, 49 (10), 5031-5038.
- Chevalier, F.**, Chobert, J. M., Mollé, D., y Haertlé, T. Maillard glycation of beta-lactoglobulin with several sugars: comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Lait*, **2001c**, 81 (5), 651-666.
- Chevalier, F.**, Chobert, J. M., Popineau, Y., Nicolas, M. G., y Haertlé, T. Improvement of functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*, **2001b**, 11 (3), 145-152.
- Chicón, R.**, Belloque, J., Alonso, E., y López-Fandiño, R. Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. *International Dairy Journal*, **2008a**, 18, 367-376.
- Chicón, R.**, Belloque, J., Alonso, E., y López-Fandiño, R. Hydrolysis under high hydrostatic pressure as a means to reduce the binding of beta-lactoglobulin to immunoglobulin E from human sera. *Journal of Food Protection*, **2008b**, 71 (7), 1453-1459.
- Chicón, R.**, Belloque, J., Recio, I., y López-Fandiño, R. Influence of high hydrostatic pressure on the proteolysis of beta-lactoglobulin A by trypsin. *Journal of Dairy Research*, **2006**, 73 (1), 121-128.

- Cho, Y.,** Batt, C. A., y Sawyer, L. Probing the retinol-binding site of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Biological Chemistry*, **1994**, 269, 11102–11107.
- Chobert, J. M.,** Bertrand-Harb, C., y Nicolas, M.-G. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1988a**, 36, 883-892.
- Chobert, J. M.,** Briand, L., Grinberg, V., y Haertlé, T. Impact of esterification on the folding and the susceptibility to peptic proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1995**, 1248, 170–176.
- Chobert, J. M.,** Sitohy, M. Z., y Whitaker, J. R. Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1988b**, 36, 220-224.
- Christiansen, K. F.,** Vegarud, G., Langsrud, T., Ellekjaer, M. R., y Egelanddal, B. Hydrolyzed whey proteins as emulsifiers and stabilizers in high-pressure processed dressings. *Food Hydrocolloids*, **2004**, 18, 757-767.
- Chuyen, N. V.** Maillard reaction and food processing – application aspects. *Process-Induced Chemical Changes in Food*. **1998**, 434, 213-235.
- Clausen, M. R.,** Skibsted, L. H., y Stagsted, J. Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 2912-2919.
- Closs, B.** Influence des traitement thermique, *Influence de la Structure sur les propriétés de surface des protéines du lactosérum*. Thèse de Doctorat de l'Université de Bourgogne, **1990**, p. 161.
- Cohen, S. A.,** Meys, M., y Tarvin, T. L. The PICO TAG™ Method. A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis, Millipore Corporation, Bedford, MA, **1989**.
- Colas, B.,** Gobin, C., y Lorient, D. Viscosity and voluminosity of caseins chemically modified by reductive alkylation with reducing sugars. *Journal of Dairy Research*, **1988**, 55, 539-546.

- Coste, M.**, Rochet, V., Léonil, J., Mollé, D., Bouhallab, S., y Tomé, D. Identification of C-terminal peptides of bovine  $\beta$ -casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunological Letters*, **1992**, 33, 41-46.
- Courthaudon, J.-L.**, Colas, B., y Lorient, D. Covalent binding of glycosyl residues to bovine casein: effects on solubility and viscosity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1989**, 37, 32-36.
- Creamer, L. K.** y MacGibbon, A. K. H. Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *International Dairy Journal*, **1996**, 6, 539-568.
- Creamer, L. K.**, y Sawyer, L.  $\beta$ -Lactoglobulin. En: H. Roginski, J. W. Fuquay, y P. F. Fox (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences*. New York: Academic Press, **2003**.
- Cucheval, A.** y Chow, R. C. Y. A study on the emulsification of oil by power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2008**, 15, 916-920.
- Cummings, J. H.** Short-chain fatty acids in the human colon. *Gut* , **1981**, 22, 763-779.
- Cummings, J. H.** Short chain fatty acids. En: G. R. Gibson y G. T. MacFarlane (Eds.), *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and health*. Boca Raron: CRC Press, **1995**, pp. 101-130.
- Cummings, J. H.**, Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P. E., y MacFarlane, G. T. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, **1987**, 28, 1221-1227.
- Czerwenka, C.**, Maier, I., Pittner, F., y Lindner, W. Investigation of the lactosylation of whey proteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 8874-8882.
- Dalgalarondo, M.**, Dufour, E., Chobert, J.-M., Bertrand-Harb, C., y Haertlé, T. Proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein by pepsin in ethanolic media. *International Dairy Journal*, **1995**, 5, 1-14.

- Dagleish, D. G.** Structure-function relationship of caseins. En: S. Damodaran y A. Paraf (Eds.), *Food Proteins and Their Applications. Part I: Physicochemical Bases of Protein Functionality*. Marcel Dekker Inc. New York, **1997**, pp. 199-223.
- Damodaran, S.** Structure-function relationship of food proteins. En: N. S. Hettiarachchy y G. R. Ziegler (Eds.), *Protein Functionality in Food Systems*. Marcel Dekker Inc. New York, **1994**, pp. 1-38.
- Damodaran, S.** Food proteins: an overview. En: S. Damodaran y A. Paraf (Eds.), *Food Proteins and Their Applications. Part I: Physicochemical Bases of Protein Functionality*. Marcel Dekker Inc. New York, **1997a**, pp. 1-25.
- Damodaran, S.** Protein-stabilized foams and emulsions. En: S. Damodaran y A. Paraf (Eds.), *Food Proteins and Their Applications. Part I: Physicochemical Bases of Protein Functionality*. Marcel Dekker Inc. New York, **1997b**, pp. 57-110.
- Daniel, H., Vohwinkei, H., y Rehner, G.** Effect of casein and  $\beta$ -casomorphins on gastrointestinal motility in rats. *Journal of Nutrition*, **1993**, 120, 252-257.
- Darewicz, M., y Dziuba, J.** The effect of glycosylation on emulsifying and structural properties of bovine  $\beta$ -casein. *Nahrung/Food*, **2001**, 45, 15-20.
- Davis, P. J. y Williams, S. C.** Protein modification by thermal processing. *Allergy*, **1998**, 53 (Suppl. 46), 102-105.
- Defilippi, C., Gómez, E., Charlin, V., y Silva, C.** Inhibition of small intestinal motility by casein: a role of  $\beta$ -casomorphins? *Nutrition*, **1995**, 11, 751-754.
- Delaney, R. A. M.** Composition, properties and uses of whey protein concentrates. *Journal of the Society of Dairy Technology*, **1976**, 29, 91-101.
- de Lara, R. C. y Gilliland, S. E.** Growth inhibition of microorganisms in refrigerated milk by added Maillard reaction products. *Journal of Food Project*, **1985**, 48, 138-141.

- Delgado-Andrade, C.**, Seiquer, I., y Navarro, M. P. Bioavailability of iron from a heat treated glucose-lysine model food system: assays in rats and in Caco-2 cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2004b**, 84, 1507-1513.
- Delgado-Andrade, C.**, Seiquer, I., y Navarro, M. P. Changes in calcium absorption and subsequent tissue distribution induced by Maillard reaction products: in vitro and in vivo assays. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006**, 86, 271-278.
- Delgado-Andrade, C.**, Seiquer, I., y Navarro, M. P. Maillard reaction products consumption: Magnesium bioavailability and bone mineralization in rats. *Food Chemistry*, **2008**, 107, 631-639.
- Delgado-Andrade, C.**, Seiquer, I., Nieto, R., y Navarro, M. P. Effects of heated glucose-lysine and glucose-methionine model-systems on mineral solubility. *Food Chemistry*, **2004a**, 87, 329-337.
- Dell'Aquila, C.** Microbial degradation of heated gluten-glucose systems. Implications for gut health. En: G. Vegarud y F. Morales (Eds.), *Melanoidins in food and health*. EC Directorate for Research, EUR 20722, **2003**, Vol. 4, pp. 181-183.
- de Man, J. C.**, Rogosa, M., y Sharpe, E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **1960**, 23, 130-135.
- Desrosiers, T.**, Savoie, L., Bergeron, G., y Parent, G. Estimation of lysine damage in heated whey proteins by furosine determination in conjunction with the digestion cell technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1989**, 37, 1385-1391.
- Dickinson, E.** Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft Matter*, **2008**, 4, 932-942.
- Dickinson, E.** Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, **2009**, 23, 1473-1482.
- Dickinson, E.** y Galazka, V. B. Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of  $\beta$ -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **1991**, 5, 281-296.

- Dickinson, E.**, Rolfe, S. E., y Dalgleish, D. G. Competitive adsorption of  $\alpha$ 1-casein and  $\beta$ -casein in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, **1988**, 2, 397–405.
- Dickinson, E.** y Semenova, M. G. Emulsifying properties of covalent protein-dextran hybrids. *Colloids and Surfaces*, **1992**, 64, 299-310.
- Dills, W. L.** Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1993**, 58, 779S-787S.
- Docena, G. H.**, Fernandez, R., Chirido, F. G., y Fossati, C. A. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy*, **1996**, 51 (6), 412-416.
- Domínguez-Vergara, A. M.**, Vázquez-Moreno, L., y Ramos-Clamont Monfort, G. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **2009**, 59 (4), 358-368.
- Dufour E.**, Robert P., Renard D., Llamas G. Investigation of  $\beta$ -lactoglobulin gelation in water/ethanol solutions. *International Dairy Journal*, **1998**, 8, 87–93.
- Dunlap, C.**, y Gote, G. The emulsifying properties of  $\beta$ -lactoglobulin dextran conjugates. *Crop Bioprotection Research*, **2004**, 3, 17-20.
- Easa, A. M.**, Hill, S. E., Mitchell, J. R., y Taylor, A. J. Bovine serum albumin gelation as a result of the Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, **1996**, 10, 199-202.
- Ehn, B.-M.**, Allmere, T., Telemo, E., Bengtsson, U., y Ekstrand, B. Modification of IgE binding to  $\beta$ -lactoglobulin by fermentation and proteolysis of cow's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 3743-3748.
- Ehn, B. M.**, Ekstrand, B., Bengtsson, U., y Ahlstedt, S. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 1398–1403.
- Einarsson, H.** The effect of time, temperature, pH and reactants on the formation of antibacterial compound in the Maillard reaction. *Lebensm.-Wiss. U-Technology*, **1987a**, 20, 51-55.



- Einarsson, H.** The effect of pH and temperature on the antibacterial effect of Maillard reaction products. *Lebensm.-Wiss. U-Technology*, **1987b**, 20, 56-58.
- Einarsson, H.**, Eklund, T., y Nes, I. F. Inhibitory mechanisms of Maillard reaction products. *Microbios*, **1988**, 53, 27-36.
- Einarsson, H.**, Snygg, B. G., y Eriksson, C. Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1983**, 31, 1043-1047.
- El-Agamy, E. I.** The challenge of cow milk protein allergy. *Small ruminant Research*, **2007**, 68, 64-72.
- El-Zahar, K.**, Sitohy, M., Choiset, Y., Metro, F., Haertlé, T., y Chobert, J. M. Antimicrobial activity of ovine whey protein and their peptic hydrolysates. *Milchwissenschaft*, **2004**, 59 (11-12), 653-656.
- Emenaker, N. J.**, Calaf, G. M., Cox, D., Basson, M. D., y Qureshi, N. Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating upa, timp-1, timp-2, mutant p53, bcl-2, bax, p21 and PCNA protein expression in an *in vitro* cell culture model. *Journal of Nutrition*, **2001**, 131, 3041S-3046S.
- Ennis, M.P.** y Mulvihill, D.M. Milk proteins. En: G. Phillips, y P. Williams (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids*. Cambridge: Woodhead, **2000**, pp. 189-217.
- Enomoto, H.**, Li, C.-P., Morizane, K., Ibrahim, H. R., Sugimoto, Y., Ohki, S., Ohtomo, H., y Aoki, T. Glycation and phosphorylation of b-lactoglobulin by dry-heating: effect on protein structure and some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, 2392-2398.
- Erbersdobler, H. F.** y Faist, V. Metabolic transit of Amadori products. *Nahrung/Food*, **2001**, 45, 177-181.
- Erbersdobler, H. F.** y Somoza, V. Forty years of furosine - forty years of using Maillard reaction products as indicators of foods. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2007**, 51, 423-430.

- Euston, S. R.**, Finnigan, S. R., y Hirst, R. L. Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilised emulsions: effect of low-molecular weight emulsifiers. *Food Hydrocolloids*, **2001**, 15, 253-262.
- Faist, V.** and Erbersdobler, H. F. Metabolic transit and *in vivo* effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **2001**, 45, 1-12.
- FAO/WHO**. Report of fifty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, D-Tagatose, p 13, 2001.
- Fechner, A.**, Knoth, A., Scherze, I., y Muschiolik, G. Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocolloids*, **2007**, 21, 943-952.
- Fenaille, F.**, Morgan, F., Parisod, V., Tabet, J.-C., y Guy, P. A. Solid-state glycation of  $\beta$ -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry and gel electrophoresis techniques. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **2003**, 17, 1483-1492.
- Fenaille, F.**, Morgan, F., Parisod, V., Tabet, J.-C., y Guy, P. A. Solid-state glycation of  $\beta$ -lactoglobulin by lactose and galactose: localization of the modified amino acids using mass spectrometric techniques. *Journal of Mass Spectrometry*, **2004**, 39, 16-28.
- Fernández-Rivas, M.** Food allergy in *alergológica-2005*. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, **2009**, 19 (Suppl. 2), 37-44.
- Fernández-Rivas, M.** y Miles, S. Food allergies: clinical and psychosocial perspectives. En: E. N. C. Mills y P. R. Shewry (Eds.), *Plant Food Allergens*. Blackwell Publishing, **2004**, 1-23.
- Ferranti, P.**, Pizzano, R., Garro, G., Caira, S., Chianese, L., y Addeo, F. Mass spectrometry-based procedure for the identification of ovine casein heterogeneity. *Journal of Dairy Research*, **2001**, 68, 35-51.

- Finot, P.-A.** The absorption and metabolism of modified amino acids in processed foods. *Journal of AOAC International*, **2005**, 88, 894-903.
- Finot, P. -A.,** Deutsch, R., y Bujard, E. The extent of the Maillard reaction during the processing of milk. *Progress in Food and Nutrition Science*, **1981**, 5, 345-355.
- Finot, P. A.** y Furniss, D. E. Metabolic transit and toxicity of Maillard Reaction Products. En: J. W. Baynes, V. M. Monnier y R. Alan (Eds.), *The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition*. New York, Liss, Inc., **1989**.
- Firebaugh, J. D.** y Daubert, C. R. Emulsifying and foaming properties of a derivatized whey protein ingredient. *International Journal of Food Properties*, **2005**, 8, 243-253.
- Fleckenstein, J.M.,** Holland, J.T., y Hasty, D.L. Interaction of an outer membrane protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* with cell surface heparan sulphate proteoglycans. *Infection and Immunity*, **2002**, 70, 1530-1537.
- Fleckenstein, J. M.,** Hardwidge, P. R., Munson, G. P., Rasko, D. A., Sommerfelt, H., y Steinsland, H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection*, **2010**, 12, 89-98.
- Foegeding, E. A.,** Davis, J. P., Doucet, D., McGuffey, M. K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Scienc and Technology*, **2002**, 13, 151-159.
- Foegeding, E. A.,** Luck, P. J., y Davis, J. P. Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, **2006**, 20, 284-292.
- Foley, J.** y O'Connell, C. Comparative emulsifying properties of sodium caseinate and whey protein isolate in 18% oil in aqueous systems. *Journal of Dairy Science*, **1990**, 57, 377.
- Fox, P. F.** Milk proteins: general and historical aspects. En: P. F., Fox y P. L. H., McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2003**, Vol. 1., pp. 1-41.

- Fox, P. F.** y Kelly, A. L. Chemistry and biochemistry of milk constituents. En: Y. H., Hui (Ed.), *Food biochemistry and food processing*. Blackwell Publishing, Iowa, USA, **2006**, pp. 425-452.
- Franks, A. H.**, Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., y Welling, G. W. Variations of bacterial populations in human faeces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA targeted oligonucleotide probes. *Applied Environmental Microbiology*, **1998**, 64, 3336-3345.
- Friedman, M.** Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44, 631-653.
- Frolov, A.**, Hoffmann, P., y Hoffmann, R. Fragmentation behavior of glycosylated peptides derived from D-glucose, D-fructose and D-ribose in tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2006**, 41, 1459-1469.
- Futterman, S.** y Heller, J. The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinol complexed with bovine serum albumin,  $\beta$ -lactoglobulin and the retinol binding protein of human plasma. *Journal of Biological Chemistry*, **1972**, 247, 5168-5172.
- Gasymov, O. K.**, y Glasgow, B. J. ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, 1774 (3), 403-411.
- Georges, C.** y Guinand, S. Sur la dissociation reversible de la  $\beta$ -lactoglobuline, a des pH superieurs a 5.5. 1. Etude par la diffusion de la lumiere. *Journal of Chemical Physics*, **1960**, 57, 606-614.
- Ghaly, A.** y Kamal, M. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*, **2004**, 38 (3), 631-644.
- Gibson, G. R.**, Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R.A., Roberfroid, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of probiotics. *Nutritional Research Reviews*, **2004**, 17, 259-275.

- Graham, D. E.** y Phillips, M. C. Proteins and liquid interfaces : I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid Interface Science*, **1979a**, 70, 403-414.
- Graham, D. E.** y Phillips, M. C. Proteins and liquid interfaces II. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid Interface Science*, **1979b**, 70, 415.
- Gregory, J. F.**, y Kirk, J. R. Assessment of storage effects on vitamin B6 stability and bioavailability in dehydrated food systems. *Journal of Food Science*, **1978**, 43, 1801-1815.
- Groubet, R.**, Chobert, J.-M., y Haertlé, T. Functional properties of milk proteins glycosylated in mild conditions. *Sciences des Aliments*, **1999**, 19, 423-438.
- Gruber, P.**, Vieths, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J., y Hofmann, T. Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 4002-4007.
- Guillerme, C.**, Loisel, W., Bertrand, D., y Popineau, Y. Study of foam stability by video image analysis : relationship with the quantity of liquid in foams. *Journal of Texture Studies*, **1993**, 24, 287-303.
- Guo, M. R.**, Fox, P. F., Flynn, A., y Kindstedt, P. S. Susceptibility of  $\beta$ -lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *Journal of Dairy Science*, **1995**, 78, 2336-2344.
- Haines, B.** Whey's protein star is rising. **2005**.  
<http://www.preparedfoods.com/CDA/Archives/def692deb5788010VgnVCM100000f932a8c0>. Prepared Foods online. Accessed May 2006.
- Handa, A.** y Kuroda, N. Functional improvements in dried egg white through the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 1845-1850.
- Haque, Z.**, y Kinsella, J. E. Heat-Induced changes in the hydrophobicity of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -Lactoglobulin. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1987**, 51, 2245-2247.

- Harmsen, H. J. M.**, Elferrich, P., Schut, F., y Welling, G. W. A 16S rRNA targeted probe for detection of *Lactobacilli* and *Enterococci* in faecal samples by fluorescent *in situ* hybridization. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **1999**, 11, 3-12.
- Harmsen, H. J. M.**, Wildeboer-Veloo, A. C. M., Grijpstra, J., Knol, J., Degener, J. E., y Welling, G.W. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Applied Environmental Microbiology*, **2000**, 66, 4523-4527.
- Hattori, M.**, Ametani, A., Katakura, Y., Shimizu, M., y Kaminogawa, S. Unfolding/refolding studies on bovine  $\beta$ -lactoglobulin with monoclonal antibodies as probes. *Journal of Biological Chemistry*, **1993**, 268 (30), 22414-22419.
- Hattori, M.**, Miyakawa, S., Ohama, Y., Kawamura, H., Yoshida, T., To-o, K., Kuriki, T., y Takahashi, K. Reduced immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 4546-4553.
- Hattori, M.**, Nagasawa, K., Ametani, A., Kaminogawa, S., y Takahashi, K. Functional changes in  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1994**, 42, 2120-2125.
- Hattori, M.**, Nagasawa, K., Ohgata, K., Sone, N., Fukuda, A., Matsuda, H., y Takahashi, K. Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *Bioconjugate Chemistry*, **2000b**, 11, 84-93.
- Hattori, M.**, Numamoto, K., Kobayashi, K., y Takahashi, K. Functional changes in  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000a**, 48, 2050-2056.
- Hattori, M.**, Ogino, A., Nakai, H., y Takahashi, F. Functional improvement of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugating with alginate lyase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 703-708.
- Hayase, H.**, Hirashima, S., Okamoto, G., y Kato, H. Scavenging of active oxygen by melanoidins. *Agricultural Biology and Chemistry*, **1989**, 53, 3383-3385.

- Hefle, S. L.**, Nordlee, J. A., y Taylor, S. L. Allergenic foods. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1996**, 36, S69-S89.
- Heinzmann, A.**, Blattmann, S., Spuergin, P., Forster, J., y Deichmann, K. A. The recognition pattern of sequential B cell epitopes of  $\beta$ -lactoglobulin does not vary with the clinical manifestations of cow's milk allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, **1999**, 120, 280-286.
- Henle, T.** Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acids derivatives in foods. *Amino Acids*, **2005**, 29, 313-322.
- Henle, T.** y Klostermeyer, H. The reactivity of the individual protein-bound lysine residues of  $\alpha$ -casein a1 during the initial stages of the Maillard reaction. En: *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**, pp. 183-189.
- Henning, D. R.**, Baer, R. J., Hassan, A. N., y Dave, R. Major Advances in Concentrated and Dry Milk Products, Cheese, and Milk Fat-Based Spreads. *Journal of Dairy Science*, **2006**, 89, 1179-1188.
- Hernández-Ledezma, B.**, Recio, I., y Amigo, L.  $\beta$ -lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, **2008**, 35, 257-65.
- Herceg, Z.**, Rezek, A., Lelas, V., Kresic, G., y Franetovic, M. Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, **2007**, 79, 279-286.
- Heyns, K.**, Meinecke, K. H. The formation and preparation of D-glucosamine from fructose and ammonia. *Chemische Berichte*, **1953**, 86, 1453-1562.
- Heyns, K.**, Muller, G., y Paulsen, H. Quantitative untersuchungen der reaktion von hexosen mit aminos äuren. *Justus Liebig's Annalen der Chemie*, **1967**, 703, 202-214.
- Hielscher, T.** Ultrasonic production of nano-size dispersions and emulsions. En ENS'05, Paris, France, 14-16 Decembre, **2005**.

- Hill, S.**, Mitchell, J. R., y Armstrong, H. J. The production of heat stable gels at low protein concentrations by the use of the Maillard reaction. En: G.O. Phillips, D.J. Wedlock y P.A. Williams (Eds.), *Gums and stabilisers in the food industry*. London: Elsevier, **1992**, Vol. 6, pp. 471–478.
- Hiller, B.**, y Lorenzen, P. C. Surface hydrophobicity of physicochemically and enzymatically treated milk proteins in relation to techno-functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, 461-468.
- Hinton, D. J. S.**, y Ames, J. M. Site specificity of glycation and carboxymethylation of bovine serum albumin by fructose. *Amino Acids*, **2006**, 30 (4), 425-433.
- Hiramoto, S.**, Itoh, K., Shizuuchi, S., Kawachi, Y., Morishita, Y., Nagase, M., [Suzuki, Y.](#), [Nobuta, Y.](#), [Sudou, Y.](#), [Nakamura, O.](#), [Kagaya, I.](#), [Goshima, H.](#), [Kodama, Y.](#), [Icatro, F. C.](#), [Koizumi, W.](#), [Saigenji, K.](#), [Miura, S.](#), [Sugiyama, T.](#), y [Kimura, N.](#) Melanoidin, a food protein-derived advanced Maillard reaction product, suppresses *Helicobacter pylori* *in vitro* and *in vivo*. *Helicobacter*, **2004**, 5, 429-435.
- Hodge, J. E.** Chemistry and browning reactions in model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1953**, 1, 928-943.
- Hoellnagel, A.** y Kroh, L. W. Formation of alpha-dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung*, **1998**, 207, 50–54.
- Hofmann, T.** Studies on the relationship between molecular weight and the color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose amino acid and glucose/protein solutions by using ultracentrifugation and color dilution techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46 (10), 3891-3895.
- Hoffmann, M. A. M.**, Sala, G., Olieman, C., y de Kruif, K. G. Molecular mass distributions of heat-induced  $\beta$ -lactoglobulin aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 2949-2957.
- Hoffmann, M. A. M.**, y van Mil, P. J. J. M. Heat-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin as a function of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 1898-1905.



- Holt, C.** Molecular basis of whey protein food functionalities. *Australian Journal of Dairy Technology*, **2000**, 55 (2), 53-55.
- Homma, S.** y Murata, M. Metal chelating compounds in instant coffee. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **2001**, 45S, 394-402.
- Horne, D. S.** Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **2006**, 11, 148-153.
- Horvat, S.** y Jakas, A. Peptide and amino acid glycation: new insights into the Maillard reaction. *Journal of Peptide Science*, **2004**, 10, 119-137.
- Høst, A.** Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Annals in Allergy and Asthma Immunology*, **2002**, 89, 87-94.
- Høst, A.** y Halken, S. Hypoallergenic formulas-when, to whom and how long, after more than 15 years we know the right indication! *Allergy*, **2004**, 59, 45-52.
- Hsu, N.-Y.**, Yang, W.-B., Wong, C.-H., Lee, Y.-C., Lee, R.-T., Wang, Y.-S., y Chen, C.-H. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of polysaccharides with 2',4',6'-trihydroxyacetophenone as matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2007**, 21, 2137-2146.
- Huang, L.**, Mills, E. N. C., Carter, J. M., y Morgan, M. R. A. Analysis of thermal stability of soya globulins using monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1998**, 1388 (1), 215-226.
- Hunt, D. F.**, Yates, J. R., Shabanowitz, J., y Winston, S. Protein sequencing by tandem Mass-spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, **1986**, 83, 6233-6237.
- Hurrell, R. F.** Reactions of food proteins during processing and storage and their nutritional consequences. En: B. J. F. Hudson (Ed.), *Developments in food proteins*. London, United Kingdom: Applied Science, **1984**, pp. 213-244.

- Huyghues-Despointes, A.**, y Yaylayan, V. A. Retro-aldol and redox reactions of Amadori compounds: mechanistic studies with variously labelled D-[<sup>13</sup>C] glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44, 672–681.
- Iametti, S.**, Rasmussen, P., Frøkiær, H., Ferranti, P., Addeo, F., y Bonomi, F. Proteolysis of bovine  $\beta$ -lactoglobulin during thermal treatment in subdenaturing conditions highlights some structural features of the temperature-modified protein and yields fragments with low immunoreactivity. *European Journal of Biochemistry*, **2002**, 269, 1362–1372.
- Ibrahim, O. O.** y Spradlin, J. E. Process for manufacturing D-tagatose USA. U.S. Patent Number 6,057,135, **2000**.
- Idota, T.**, Kawakami, H., y Nakajima, I. *Bifidus* growth-promoting activity effect of N-acetyl-neuraminic acid-containing substances. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **1994**, 58, 1720-1722.
- Institute of Medicine (IOM) of the National Academies.** Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids cholesterol, protein and amino acids. Washington, D.C: The National Academies Press, **2002** (Prepublication copy).
- Isolauri, E.**, Salminen, S., Ouwehand, A. C. Probiotics. *Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, **2004**, 18, 299-313.
- Jarvinen, K.-M.**, Chatchatee, P., Bardina, L., Beyer, K., y Sampson, H. A. IgE and IgG binding epitopes on  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in cow's milk allergy. *International Archives in Allergy and Immunology*, **2001**, 126, 111-118.
- Jerić, I.**, Versluis, C., Horvat, S., y Heck, A. J. R. Tracing glycoprotein structures: electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of sugar–peptide adducts. *Journal of Mass Spectrometry*, **2002**, 37, 803-811.
- Jeyarajah, S.** y Alle, J. C. Calcium binding and salt-induced structural changes of native and preheated  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1994**, 42 (1), 80-85.

- Jiménez-Castaño, L.** (2005). "Glicosilación de la  $\beta$ -lactoglobulina con dextrano de alto peso molecular mediante reacción de Maillard: efecto en su estructura y funcionalidad". Memoria del trabajo tutelado de iniciación a la investigación. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias.
- Jimenez-Castaño, L.,** López-Fandiño, R., Olano, A., y Villamiel, M. Study on  $\beta$ -lactoglobulin glycosylation with dextran: effect on solubility and heat stability. *Food Chemistry*, **2005a**, 93, 689–695.
- Jimenez-Castaño, L.,** Villamiel, M., Martín-Alvarez, P. J., Olano, A., y Lopez-Fandiño, R. Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of  $\beta$ -lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, **2005b**, 19 (5), 831-837.
- Jimenez-Castaño, L.,** Villamiel, M., y López-Fandiño, R. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*, **2007**, 21, 433-443.
- Jiménez-Guzmán, J.** y García-Garibay, M. Propiedades nutraceuticas de las proteínas del suero de leche. *Alfa Editores Técnicos*, Octubre/Noviembre **2006**, 22-27.
- Jing, H.** y Kitts, D. D. Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2004**, 429, 154-163.
- Jollés, P.,** Lévy-Toledano, S., Flat, A. M., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, S., Dunn, F. W., y Caen, J. B. Analogy between fibrinogen and casein. *European Journal of Biochemistry*, **1986**, 158, 379-384.
- Johnson, M. E.** y Lucey, J. A. Major Technological Advances and Trends in cheese. *Journal of Dairy Science*, **2006**, 89, 1174-1178.
- Johnson, R. S.,** Martin, S. A., Biemann, K., Stults, J. T., y Watson, J. T. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Analytical Chemistry*, **1987**, 59 (21), 2621-2625.

- Jost, R.**, Fritsche, R., y Pahud, J. J. Reduction of milk protein allergenicity through processing. *Biblical Nutrition and Diet*, **1991**, 48, 127–137.
- Kaminogawa, S.** Food allergens and the mucosal immune system. *Biofactors*, **2000**, 12, 29-32.
- Kaminogawa, S.**, Shimizu, M., Ametani, A., Hattori, M., Ando, O., Hachimura, S., Nakamura, Y., Totsuka, M., y Yamauchi, K. Monoclonal-antibodies as probes for monitoring the denaturation process of bovine beta-lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1989**, 998 (1), 50-56.
- Kanny, G.**, Moneret-Vautrin, D-A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., y Thevenin, F. Population study of food allergy in France. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2001**, 108 (1) 133-140.
- Karlsson, K. A.** Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Molecular Microbiology*, **1998**, 29, 1-11.
- Katayama, S.**, Shima, J., y Saeki, H. Solubility improvement of shellfish muscle proteins by reaction with glucose and its soluble state in low-ionic strength medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 4327–4332.
- Kato, A.** Industrial applications of Maillard-type protein polysaccharide conjugates, *Food Science and Technology Research*, **2002**, 8, 193-199.
- Kato, H.**, Hayase, F., Shin, D. B., Oimomi, M., y Baba, S. 3-Deoxyglucosone, an intermediate product of the Maillard reaction. *Progress in clinical and biological research*, **1989**, 304, 69–84.
- Kato, H.**, Kim, S. B., Hayase, F., y Chuyen, N. V. Desmutagenicity of melanoidins against mutagenic pyrolysis products. *Agricultural Biology and Chemistry*, **1985**, 49, 3093-3095.
- Kato, A.** y Kobayashi, K. Excellent emulsifying properties of protein-dextran conjugates. En: M. El-Nokaly y D. Cornell (Eds.), *Microemulsions and Emulsions in Foods*. American Chemical Soc, Washington DC, **1991**, pp. 213–229.

- Kato, Y.,** Matsuda, T., Kato, N., y Nakamura, R. Maillard reaction of ovalbumin with glucose and lactose. Browning and protein polymerization induced by amino-carbonyl reaction of ovalbumin with glucose and lactose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1988**, 36 (4), 806-809.
- Kato, Y.,** Matsuda, T., Kato, N., Watanabe, K., and Nakamura, R. Browning and insolubilization of ovalbumin by the Maillard reaction with some aldohexoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1986**, 34, 351–355.
- Kato, A.,** Sasaki, Y., Furuta, R., y Kobayashi, K. Functional proteinpolysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1990**, 54, 107–112.
- Kato, A.,** Watanabe, K., y Sato, Y. Effect of Maillard reaction on some physical properties of ovalbumin. *Journal of Food Science*, **1981**, 46, 1835-1839.
- Kawasaki, Y.,** Isoda, H., Shinmoto, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T., y Vakajima, I. Inhibition by  $\kappa$ -casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus haemagglutination. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **1993**, 57, 1214-1215.
- Kawasaki, Y.,** Isoda, H., Tanimota, M., Dosako, S., y Ahiko, K. Inhibition by lactoferrin and kcasein glycopeptide of binding of cholera toxin to its receptor. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **1992**, 57, 1214-1215.
- Kayser, H.** y Meisel, H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters*, **1996**, 383, 18-20.
- Kim, H.,** Choi, S., Shin, W.-S., y Moon, T. Emulsifying properties of bovine serum albumin-galactomannan conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 1049–1056.
- Kim, D. A.,** Cornec, M., y Narsimham, G. Effect of thermal treatment on interfacial properties of b-lactoglobulin. *Journal of Colloid Interface Science*, **2005**, 285, 100-109.
- Kim, S. B.,** Hayase, F., y Kato, H. Desmutagenic effect of melanoidins against amino acid and protein pyrolisates. *Developments in Food Science*, **1986**, 13, 383-392.

- Kim, S. B.**, Seo, L. S., Khan, M. A., Ki, K. S., Lee, W. S., Lee, H. J., Shi, H. S., y Kim, H. S. Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. *Journal of Dairy Science*, **2007**, 90 (9), 4033-4042.
- Kinsella, J. E.** Milk proteins: physicochemical and functional properties. *CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, **1984**, 21, 197-262.
- Kitts, D. D.** y Hu, C. Biological and chemical assesment of antioxidant activity of sugar-lysine model Maillard reaction products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2005**, 1043, 501-512.
- Kitts, D. D.** y Yuan, Y. V. Caseinphosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, **1992**, 3, 31-35.
- Knorr, D.**, Zenker, M., Heinz, V., y Lee, D. U. Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, **2004**, 15, 261-481.
- Kobayashi, K.**, Hirano, A., Ohta, A., Yoshida, T., Takahashi, K., y Hattori, M. Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran differing in molecular weight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 823-831.
- Koh, S. Y.**, George, S., Brözel, V., Moxley, R., Francis, D., y Kaushik, R. S. Porcine intestinal epithelial cell lines as a new *in vitro* model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, **2008**, 130, 191-197.
- Kohno, Y.**, Honma, K., Saito, K., Shimojo, N., Tsunoo, H., Kaminogawa, S., y Niimi, H. Preferential recognition of primary-protein structures of alpha-casein by IgG and IgE antibodies of patients with milk allergy. *Annals of Allergy*, **1994**, 73, 419-422.
- Kontopidis, G.**, Holt, C., y Sawyer, L.  $\beta$ -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*, **2004**, 87, 785-796.
- Koschinsky, T.**, He, C. J., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, C., Buenting, C., Heitmann, K., y Vlassara, H. Orally absorbed reactive advanced glycation end products (glycotoxins):

an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1997**, 94, 6474-6479.

**Koutinas, A.**, Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Katechaki, E., Bekatorou, A., y Bosnea, L. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology*, **2009**, 100 (15), 3734-3739.

**Krause, R.**, Knoll, K., y Henle, T. Studies on the formation of furosine and pyridosine during acid hydrolysis of different Amadori products of lysine. *European Food Research and Technology*, **2003**, 216, 277-283.

**Krause, R.**, Schlegel, K., Schwarzer, E., y Henle, T. Formation of peptide-bound Heyns compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56 (7), 2522-2527.

**Kunz, C.** y Rudloff, S. Potential anti-inflammatory and anti-infectious effects of human milk oligosaccharides. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2008**, 606, 455-465.

**Kushibiki, S.**, Hodate, K., Kurisaki, J., Shingu, H., Ueda, Y., Watanabe, A., y Shinoda, M. Effect of  $\beta$ -lactoglobulin on plasma retinol and triglyceride concentrations, and fatty acid composition in calves. *Journal of Dairy Research*, **2001**, 68 (4), 579-586.

**Labuza, T. P.** Properties of water as related to the keeping quality of foods. En: *Proceedings of the Third International Congress of Food Science and Technology*. Washington, DC., **1970**, pp.618-635.

**Labuza, T. P.**, y Baisier, W. M. The kinetics of nonenzymatic browning. En: H. G. Schwartzberg, y R. W. Hastel (Eds.), *Physical Chemistry of Foods*. IFT Basic Symposium Series 7; Dekker: New York, **1992**, pp 595-689.

**Labuza, T. P.** y Saltmarch, M. Kinetics of browning and protein quality loss in whey powders during steady state and nonsteady state storage conditions. *Journal of Food Science*, **1981**, 47, 92-96.

**Laerke, H. N.** y Jensen, B. B. D-Tagatose has low small intestinal digestibility but high large intestinal fermentability in pigs. *Journal of Nutrition*, **1999**, 129, 1002-1009.

- Laerke, H. N.**, Jensen, B. B., y Hojsgaard, S. In vitro fermentation pattern of D-tagatose is affected by adaptation of the microbiota from the gastrointestinal tract of pigs. *Journal of Nutrition*, **2000**, 130, 1772–1779.
- Lahov, E.** y Regelson, W. Antibacterial and stimulating casein-derives substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, **1996**, 34, 131-145.
- Laparra, J. M.** y Sanz, Y. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelia. *Letters in Applied Microbiology*, **2009**, 49, 695-701.
- Lapolla, A.**, Fedele, D., Martano, L., Arico, N. C., Garboglio, M., Traldi, P., Seraglia, R., y Frarvetto, D. Advanced glycation end products: a highly complex set of biologically relevant compounds detected by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2001**, 36, 370-378.
- Lapolla, A.**, Fedele, D., Reitano, R., Arico, N. C., Seraglia, R., Traldi, P., Marotta, E., y Tonani, R. Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation end products/peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2004**, 15, 496-509.
- Lauber, S.**, Klostermeyer, H., y Henle, T. On the influence of non-enzymatic crosslinking of caseins on the gel strength of yoghurt. *Nahrung/Food*, **2001**, 45, 215-217.
- Laurentin, A.** y Edwards, C. A. A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, **2003**, 315, 143–145.
- Law, A.** y Leaver, J. Métodos de extracción de caseína a partir de leche y caseinatos y producción de productos novedosos. U. E. Patent, Número 2.282.431, **2007**.
- Lea, C. H.** y Hannan, R. S. Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state, I. The effect of activity of water, of pH and of temperature on the primary reaction between casein and glucose. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1949**, 3, 313-325.



- Leary, H. L.** Nonclinical testing of formulas containing hydrolysed milk protein. *Journal of Pediatrics*, **1992**, 121, S42-S46.
- Leclère, J.** y Birlouez-Aragon, I. The fluorescence of advanced Maillard products is a good indicator of lysine damage during the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 4682-4687.
- Ledesma-Osuna, A. I.**, Ramos-Clamont, G., y Vázquez-Moreno, L. Characterization of bovine serum albumin glycosylated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochimica Polonica*, **2008**, 55, 491-497.
- Ledesma-Osuna, A. I.**, Ramos-Clamont, G., y Vázquez-Moreno, L. Biorecognition of chemically modified bovine serum albumin with lactose prepared under different conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 9734-9739.
- Ledi, F.** y Schleicher, E. New aspects of the maillard reaction in foods and in the human-body. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1990**, 29 (6), 565-594.
- Lee, C. M.**, Lee, T. C., y Chichester, C. O. Kinetics of the production of biologically active Maillard browned products in apricot and glucose-L-tryptophan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1979**, 27, 478-482.
- Lehrer, S. B.**, Horner, W. E., y Reese, G. Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *CRC Critical Review in Food Science and Nutrition*, **1996**, 36 (6), 553-64.
- Léonil, J.**, Mollé, D., Fauquant, J., Maubois, J. L., Pearce, R. J., y Bouhallab, S. Characterization by ionization mass spectrometry of lactosyl  $\beta$ -lactoglobulin conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose binding site. *Journal of Dairy Science*, **1997**, 80, 2270-2281.
- Léonil, J.**, Mollé, D., Gaucheron, F., Arpino, P., Guénot, P., y Maubois, J.L. Analysis of major bovine milk proteins by on-line high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Lait*, **1995**, 75, 193-210.
- Lewis, V.M.**, y Lea, C.H. A note on the relative rates of reaction of several reducing sugars and sugar derivatives with casein. *Biochimica Biophysica Acta*, **1950**, 4, 532-534.

- Liu, X.**, K. Chung, S. Yang y A. Yousef. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Journal Process Biochemistry*, **2005**, 40, 13-24.
- Loncin, M.**, Bimbenet, J. J., y Lenges, L. Influence of the activity of water on the spoilage of foodstuffs. *Journal of Food Technology*, **1968**, 3, 131-142.
- Londoño, M.** Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. *Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia*, **2006**, 16, 11-20.
- Lucassen-Reynders, E. H.**, Lucassen, J., Garrett, P. R., y Hollway, F. Dynamic surface measurements as a tool to obtain equation-of-state data for soluble monolayers. *Adv. Chem. Ser.*, **1975**, 144, 272-285.
- Lucey, J. A.**, Srinivasan, M., Singh, H., y Munro, P. A. Characterization of commercial and experimental sodium caseinates by multiangle laser light scattering and size exclusion chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48 (5), 1610-1616.
- Lynch, A. G.**, Mulvihill, D. M., Law, A. J. R., Leaver, J., y Horne, D. S. Chromatographic elution profiles, electrophoretic properties and free amino and sulphhydryl group contents of commercial sodium caseinates. *International Dairy Journal*, **1997**, 7, 213-220.
- Macfarlane, G. T.**, Steed, H., y Macfarlane, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, **2007**, 1, 40-47.
- MacRitchie, F.** Proteins at interfaces. *Advances in Protein Chemistry*, **1978**, 32, 283-326.
- Madsen, K. L.** The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Canadian Journal of Gastroenterology*, **2001**, 15, 817-822.
- Maillard, L. C.** Action des acides amines sur les secretes: formation des melanodines par voie methodique. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, **1912a**, 154, 66-68.

- Maillard, L. C.** Formation d'humus et de combustibles minéraux sans intervention de l'oxygène atmosphérique, des microorganismes, des hautes températures, ou des fortes pressions. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, **1912b**, 155, 1554-1558.
- Maillard, M. N.**, Billaud, C., Chow, Y. N., Ordonaud, C., y Nicolas, J. Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper chelating properties of model Maillard reaction systems. *Food Sciences and Technology*, **2007**, 40 (8), 1434-1444.
- Malec, L. S.**, Gonzales, A.S.P., Naranjo, G.B., y Vigo, M.S. Influence of water activity and storage temperature on lysine availability of a milk like system. *Food Research International*, **2002**, 35, 849-853.
- Maleki, S. J.** Food processing, effects on allergenicity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, **2004**, 4, 241-245.
- Maleki, S. J.**, Chung, S., Champagne, E. T., y Raufman, J. P. The effects of roasting on the allergenic properties of peanuts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2000**, 106, 763-768.
- Marcil, V.**, Delvin, E., Seidman, E., Poitras, L., Zoltowska, M., Garofalo, C., y Levy, E. Modulation of lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly by butyrate. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, **2002**, 283, G340-G346.
- Martin, A. H.**, Grolle, K., Bos, M. A., Cohen-Stuart, M. A., y van Vliet, T. Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2002**, 254, 173-183.
- Martins, S. I. F. S.**, Jongen, W. M. F., y Van Boekel, M. A. J. S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *Trends Food Science and Technology*, **2001**, 11, 364-373.
- Mauron, J.** Influence of processing on protein-quality. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **1990**, 36 (4), S57-S69.

- Matiacevich, S. B.**, y Buera, M. P. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chemistry*, **2006**, 95, 423–430.
- Matsuda, T.**, Kato, Y., y Nakamura, R. Lysine loss and polymerization of bovine  $\beta$ -lactoglobulin by amino carbonyl reaction with lactulose (4-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-fructose). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1991**, 39 (7), 1201-1204.
- Matsudomi, N.**, Nakano, K., Soma, A., y Ochi, A. Improvement of gel properties of dried egg white by modification with galactomannan through the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 4113-4118.
- McGookin, B. J.** y Augustin, M. A. Antioxidant activity of casein and Maillard reaction-products from casein-sugar mixtures. *Journal of Dairy Research*, **1991**, 58 (3), 313-320.
- McKenzie, H. A.**  $\beta$ -lactoglobulins. En: H. A. McKenzie (Ed.), *Milk Proteins: Chemistry and Molecular Biology*. Academic Press, New York, **1971**, Vol. 2, pp 257-330.
- McKenzie, H. A.**, y Sawyer, W. H. Effect of pH on  $\beta$ -lactoglobulin. *Nature*, **1967**, 214, 1101-1104.
- McPherson, J. D.**, Shilton, B. H., y Walton, D. J. Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins. *Biochemistry*, **1988**, 27(6), 1901-1907.
- Meisel, H.** Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, **1998**, 8, 363-373.
- Meisel, H.** Milk Protein-Derived Peptides as Potentially Bioactive Components of Cheese. En: *Proceedings of the 26th International Dairy Congress*, Paris, France, 2002.
- Metcalfe, D. D.**, Astwood, J. D., Townsend, R., Sampson, H. S., Taylor, S. L., & Fuchs, R. L. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1996**, 36 (Suppl.), S165–S186.
- Mills, D. J. S.**, Tuohy, K. M., Booth, J., Buck, M., Crabbe, M. J. C., Gibson, G. R., y col. Dietary glycated protein modulates the colonic microbiota towards a more detrimental

composition in ulcerative colitis patients and non-ulcerative colitis subjects. *Journal of Applied Microbiology*, **2008**, 105, 706-714.

**Mills, E. N. C.**, Jenkins, J. A., y Shewry, P. R. The role of common properties in determining plant food protein allergenicity. En: E. N. C. Mills y P. R. Shewry (Eds.), *Plant Food Allergens*. Blackwell Publishing, **2004**, pp. 158-170.

**Mills, E. N. C.**, Sancho, A. I., Moreno, J., y Kostyra, H. The effects of food processing on allergens. En: C. Mills, H. Wichers, y H. Hoffmann-Sommergruber (Eds.), *Managing allergens in food*. Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing Ltd., **2006**, pp. 117-133.

**Mitchell, J. R.**, Irons, L., y Palmer, G. J. A study of the spread and adsorbed films of milk proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1970**, 200, 138–150.

**Molina, E.**, Chicón, R., Belloque, J., y López-Fandiño, R. Alergia a proteínas lácteas. En: F. J. Fontecha (Ed.), *Funcionalidad de componentes lácteos*. CEE Limencop, S.L., España, **2009**, pp. 197-222.

**Moreno, F. J.** Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **2007**, 61, 50-60.

**Moreno, F. J.**, Jenkins, J. A., Mellon, F. A., Rigby, N. M., Robertson, J. A., Wellner, N., y Mills, C. E. N. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). *Biochimica et Biophysica Acta e Proteins and Proteomics*, **2004**, 1698, 175-186.

**Moreno, F.**, López-Fandiño, R., y Olano, A. Characterization and functional properties of lactosyl caseinomacropeptide conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 5179–5184.

**Moreno, F. J.**, Mackie, A. R., y Mills, E. N. C. Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005a**, 53, 9810-9816.

- Moreno, F. J.**, Mellon, F. A., Wickham, M. S. J., Bottrill, A. R., y Mills, E. N. C. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant *in vitro* gastrointestinal digestion. *FEBS Journal*, **2005b**, 272, 341-352.
- Moreno, F. J.**, Quintanilla-López, J. E., Lebrón-Aguilar, R., Olano, A., y Sanz, M. L. Mass spectrometric characterization of glycosylated  $\beta$ -lactoglobulin peptides derived from galacto-oligosaccharides surviving the *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2008**, 19, 927-937.
- Moreno, F. J.**, Recio, I., Olano, A., y López - Fandino, R. Heterogeneity of caprine  $\kappa$ -casein macropeptide. *Journal of Dairy Research*, **2001**, 68, 197-208.
- Morgan, F.**, Léonil, J., Mollé, D., y Bouhallab, S. Nonenzymatic lactosylation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin under mild heat treatment leads to structural heterogeneity of the glycoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1997**, 236, 413-417.
- Morgan, F.**, Léonil, J., Mollé, D., y Bouhallab, S. Modification of bovine  $\beta$ -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*, **1999a**, 47, 83-91.
- Morgan, F.**, Mollé, D., Henry, G., Vénien, A., Léonil, J., Peltre, G., Levieux, D., Maubois, J.- L., y Bouhallab, S. Glycation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin: effect on the protein structure. *International Journal of Food Sciences and Technology*, **1999b**, 34, 429-435.
- Mossine, V. V.**, Barnes, C. L., Glinsky, G. V., y Feather, M. S. Molecular and crystal structure of N-(2-deoxy-D-aldohexos-2-yl)-glycines (Heyns compounds). *Carbohydrate Research*, **1996**, 284 (1), 11-24.
- Mountzouris, K. C.**, McCartney, A. L., y Gibson, G. R. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *British Journal of Nutrition*, **2002**, 87, 405-420.
- Mu, M.**, Pan, X., Yao, P., y Yiang, M. Acidic solution properties of  $\beta$ -casein-graft-dextran copolymer prepared through Maillard reaction. *Journal of Colloid Interface Science*, **2006**, 301, 98-106.

- Mukhopadhyay, R.**, Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., Banerjee, P., y Guha, A. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal*, **2005**, 15 (3), 299-303.
- Murakami, M.**, Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y., Negishi, H., y Saito, T. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide ( $\beta$ -lactosin B) isolated from a commercial whey product. *Journal of Dairy Science*, **2004**, 87 (7), 1967–1974.
- Nacka, F.**, Chobert, J. M., Burova, T., Léonil, J., y Haertlé, T. Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins. *Journal of Protein Chemistry*, **1998**, 17, 495–503.
- Nagaoka, S.**, Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Tadashi, K., y Kuwata, T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2001**, 281 (1), 11–17.
- Nagaraj, R. H.**, Sarkar, P., Mally, A., Biemel, K. M., Lederer, M. O., y Padayatti, P. S. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2002**, 402 (1), 110-119.
- Nagasawa, K.**, Takahashi, K., & Hattori, M. Improved emulsifying properties of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugating with carboxymethyl dextran. *Food Hydrocolloids*, **1996**, 10, 63-67.
- Nakajima, M.**, Shinoda, I., y Mikogami, T., Iwamoto, H., Hashimoto, S., Miyauchi, H., Fukuwatari, Y., y Hayasawa, H.  $\beta$ -lactoglobulin suppresses melanogenesis in cultured human melanocytes. *Pigment Cell Research*, **1997**, 10 (6), 410–413.
- Nakamura, S.** y Kato, A. Multi-functional biopolymer prepared by covalent attachment of galactomannan to egg-white proteins through naturally occurring Maillard reaction. *Nahrung*, **2000**, 44, 201–206.

- Nakamura, S.**, Kato, A., y Kobayaahit, K. Enhanced antioxidant effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1992**, 40 (11), 2033-2037.
- Nakamura, A.**, Sasaki, F., Watanabe, K., Ojiva, T., Ahn, D. -H., y Saeki, H. Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 9529-9534.
- Nakamura, A.**, Watanabe, K., Ojiva, T., Ahn, D. -H., y Saeki, H. Effect of Maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 7559-7564.
- Nakamura, S.**, Suzuki, Y., Ishikawa, E., Yakushi, T., Jing , H., Miyamoto, T., y Hashizume, K. Reduction of in vitro allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides. *Food Chemistry*, **2008**, 109, 538–545.
- Namiki, M.**, Oka, M., Otsuka, M., Miyazawa, T., Fujimoto, K., y Namiki, K. Weak chemiluminescence at an early stage of the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1993**, 41 (10), 1704-1709.
- Naranjo, G. B.**, Malec, L. S., y Vigo, M. S. Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. *Food Chemistry*, **1998**, 62, 309-313.
- Navarro, M. P.** Impact of Maillard reaction products on mineral bioavailability. En: M. P. Vaquero, T. García-Arias, A. Carbajal, y F. J. Sánchez-Muniz (Eds.), *Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds*. Metabolic and technological aspect. Kerala, India: Research Signpost, **2003**.
- Navarro, M. O.**, Aspe, T., y Seiquer, I. Zinc transport in Caco-2 cells and zinc balance in rats: influence of the heat treatment of a casein-glucose-fructose mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 3589-3596.
- Neeser, J. R.**, Chambez, A., Delvedova, S., Prigent, M. J., y Guggenheim, B. Specific and non specific inhibition of adhesion of oral actinomyces and streptococci to erythrocytes and polystyren by caseinoglycopeptide derivatives. *Infection and Immunity*, **1988**, 56, 3201-3208.



- Neiryck, N.**, Van der Meeren, P., Gorbe, S. B., Dierckx, S., y Dewettinck, K. Improved emulsion stabilizing properties of whey protein isolate by conjugation with pectins. *Food Hydrocolloids*, **2004**, 18, 949-957.
- Neutra, M. R.**, Mantis, N. J., Frey, A., y Giannasca, P. J. The composition and function of M cell apical membranes: implications for microbial pathogenesis. *Seminars in Immunology*, **1999**, 11 (3), 171-181.
- Nieuwenhuizen, N.** y Lopata, A. L. Fighting Food Allergy: Current Approaches. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2005**, 1056, 30-45.
- Nötzold, H.**, Kretschmar, R., y Ludwig, E. Beitrag zur Bestimmung der Hydrophobie von Proteinen. *Nahrung*, **1991**, 35, 969-980.
- Oakenfull, D.**, Pearce, J., y Burley, R. W. Protein gelation. En: Damodaran, S. y Paraf, A. (Eds.), *Food Proteins and Their Applications. Part I: Physicochemical Bases of Protein Functionality*. Marcel Dekker Inc. New York, **1997**, pp. 1-25.
- O'Brien, J.** y Morrissey, P. A. The Maillard reaction in milk products. *Bull Int Dairy Fed*, **1989a**, 238, 53-61.
- O'Brien, J.** y Morrissey, P. A. Nutritional and toxicological aspects of Maillard browning reactioning foods. *CRC Critical Reviews and Food Science*, **1989b**, 28, 211-278.
- O'Brien, J.** y Morrissey, P. A. Metal ion complexation by products of the Maillard reaction. *Food Chemistry*, **1997**, 58, 17-27.
- O'Connell, J. E.** y Fox, P. F. Heat-induced changes in the calcium sensitivity of caseins. *International Dairy Journal*, **1999**, 9, 839-847.
- Oevermann, A.**, Engels, M., Thomas, U., y Pellegrini, A. The antiviral activity of naturally occurring proteins and their peptide fragments after chemical modification. *Antiviral Research*, **2003**, 59 (1), 23-33.
- Ofek, I.**, Hasty, D. J., Abraham, S. N., y Sharon, N. Role of bacterial lectins in urinary tract infections. Molecular mechanisms for diversification of bacterial surface lectins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2000**, 485, 183-192.

- Ofek, I.**, Hasty, D. L., y Sharon, N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **2003**, 38, 181-191.
- Olano, A.** y Martínez-Castro, I. Nonenzymatic browning. En: M. L. Leo (Ed.), *Handbook of food analysis*. Nollet Marcel Dekker, New York, **2004**, Vol. 3, pp. 1855-1890.
- Oldfield, D. J.**, Singh, H., & Taylor, M. W. Kinetics of heat-induced whey protein denaturation and aggregation in skim milks with adjusted whey protein concentration. *Journal of Dairy Research*, **2005**, 72 (3), 369-78.
- Oliver, C. M.**, Kher, A., McNaughton, D. y Augustin, M. A. Use of FTIR and mass spectrometry for characterization of glycated caseins. *Journal of Dairy Research*, **2009**, 76, 105-110.
- Oliver, C. M.**, Melton, L. D., y Stanley, R.A. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2006a**, 46, 337-350.
- Oliver, C. M.**, Melton, L. D., y Stanley, R. A. Functional properties of caseinate glycoconjugates prepared by controlled heating in the “dry” state. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006b**, 86, 732-740.
- Oliver, C. M.**, Melton, L. D., y Stanley, R. A. Glycation of caseinate by fructose and fructooligosaccharides during controlled heat treatment in the “dry” state. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006c**, 86, 722-731.
- O'Regan, J.** y D. M. Mulvihill. Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate–maltodextrin conjugates. *Food Chemistry*, **2009**, 115, 1257-1267.
- Öste, R.**, Dahlqvist, A., Sjötröm, H., Norén, O., y Miller, R. Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vitro studies. *Journal of Agricultural and Food Research*, **1986**, 34, 355-358.
- Ouwehand, A. C.**, Salminen, S. J., Skurnik, M., y Conway, P. L. Inhibition of pathogen adhesion by  $\beta$ -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, **1997**, 7 (11), 685–692.

- Pallante, G. A.** y Cassady, C. J. Effects of peptide chain length on the gas-phase proton transfer properties of doubly-protonated ions from bradykinin and its N-terminal fragment peptides. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2002**, 219, 115-131.
- Papiz, M. Z.**, Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E., y Kraulis, P. J. The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, **1986**, 324, 383-385.
- Pastorello, E. A.**, Pravettoni, V., Calamari, A. M., Banfi, E., y Robino, A. M. New plant-origin food allergens. *Allergy*, **2002**, 57, 106-110.
- Pearce, J. A.** Fluorescence changes in solutions of glucose and glycine and of acetaldehyde and ammonia. *Food Technology*, **1950**, 4, 416-419.
- Pearce, K. N.** y J. E. Kinsella. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1978**, 26, 716-723.
- Pellegrini, A.**, Dettling, C., Thomas, U., y Hunziker, P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2001**, 1526 (2), 131-140.
- Peñas, E.**, Restani, P., Ballabio, C., Préstamo, G., Fiocchi, A., y Gómez, R. Evaluation of the residual antigenicity of dairy whey hydrolysates obtained by combination of enzymatic hydrolysis and high-pressure treatment. *Journal of Food Protection*, **2006**, 69 (7), 1707-1712.
- Pérez, M. D.**, y Calvo, M. Interaction of beta-lactoglobulin with retinol and fatty-acids and its role as a possible biological function for this protein-A review. *Journal of Dairy Science*, **1995**, 78 (5), 978-988.
- Pérez, M. D.**, Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J. M., Oria, R., y Calvo, M. Effect of  $\beta$ -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1992**, 1123 (2), 151-155.
- Pervaiz, S.** y Brew, K. Homology of  $\beta$ -lactoglobulin, serum retinol-binding protein and protein HC. *Science*, **1985**, 228, 335-337.

- Pessen, H.**, Purcell, J. M., y Farrell, H. M., Jr. Proton relaxation rates of water in dilute solutions of  $\beta$ -lactoglobulin: Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of a self-association globular protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1985**, 828, 1-12.
- Peters, R. H.** Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. *International Dairy Journal*, **2005**, 15, 537- 545.
- Pihlanto-Leppälä A.** Bioactive Peptides. En: H. Roginski, J. Fucquay y P. F. Fox (Eds.), *Milk Proteins, Encyclopaedia of Dairy Sciences*. Elsevier Science Academic Press, EUA, **2003**.
- Pihlanto-Leppälä , A.**, Marnila, P., Hubert, L., Rokka, T., Korhonen, H. J., y Karp, M. The effect of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103. *Journal of Applied Microbiology*, **1999**, 87 (4), 540–545.
- Pischetsrieder, M.** A new role for AGE inhibitors. *IMARS Highlights*, **2009**, 4, 16.
- Ponger, S.**, Ulrich, P. C., Bensath, F. A., y Cerami, A. Aging of Proteins: Isolation and Identification of Fluorescent Chromophore from the Reaction of Polypeptides with Glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1984**, 81, 2684-2688.
- Pouliet, Y.** Membrane processes in dairy technology- From a simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal*, **2008**, 18, 735-740.
- Prabhakaram, M.** y Ortwerth, B. J. Determination of glycation crosslinking by the sugar-dependent incorporation of [ $^{14}$ C]lysine into protein. *Analytical Biochemistry*, **1994**, 216, 305-312.
- Qian, Z. Y.**, Jollés, P., Migliore-Samour, D., Schoentgen, F, y Fiat, A. M. Sheep kappa-casein peptides inhibit platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1995**, 1244, 411-417.

- Qin, B. Y.**, Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, H. M., Baker, E. N., y Jameson, G. B. Structural basis of the Tanford transition of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochemistry*, **1998**, 37, 14014–14023.
- Ragno, V.**, Giampietro, P.G., Bruno, G., y Businco, L. Allergenicity of milk protein hydrolysate formulae in children with cow's milk allergy. *European Journal of Pediatrics*, **1993**, 152, 760–762.
- Ragona, L.**, Fogolari, F., Catalano, M., Ugolini, R., Zetta, L., y Molinari, H. EF loop conformational change triggers ligand binding in  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278, 38840-38846.
- Ramirez-Jimenez, A.**, Guerra-Hernandez, E. J., y García-Villanova, B. Evaluation of amino group losses for monitoring storage of infant cereals containing milk. *Food Control*, **2004**, 15 (5), 351-354.
- Reddy, I. M.**, Kella, N. K. D., y Kinsella, J. E. Structural and conformational basis of the resistance of  $\beta$ -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1988**, 36, 737-741.
- Renard, D.**, Lefebvre, J., Griffin, W. G., y Griffin, M. C. A. Effects of pH and salt environment on the association of beta-lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, **1998**, 22, 41–49.
- Revillion, J. P.**, Brandelli, A., y Ayub, M. Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *International Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, **2003**, 46 (1), 121-127.
- Reynolds, E.** Phosphopeptides. PCT International Patent Application WO 87/07615 A1, **1987**.
- Rich, L. M.** y Foegeding, E. A. Effects of sugars on whey protein isolate gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 5046-5052.
- Ringe, M. L.** y Love, M. H. Kinetics of protein-quality change in an extruded cowpea-corn-flour blend under varied steady-state storage-conditions. *Journal of Food Science*, **1988**, 53 (2), 584-588.

- Robin, O.**, Turgeon, S., y Paquin, P. Functional properties of milk proteins. En: Y. H., Hui (Ed.), *Dairy Science and Technology Handbook. 1. Principles and properties*. VCH Publishers, New York, **1993**, pp. 277-353.
- Rodríguez-Patino, J. M.**, Carrera-Sánchez, C., y Rodríguez-Niño, M. R. Structural and morphological characteristics of b-casein monolayers at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, **1999**, 13, 401-408.
- Rodríguez-Patino, J. M.**, Carrera-Sánchez, C., y Rodríguez-Niño, M. R. Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2008**, 140, 95-113.
- Rodríguez-Patino, J. M.**, Molina-Ortiz, S. E., Carrera-Sánchez, C., Rodríguez-Niño, M. R., y Añón, M. C. Dynamic properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface. *Journal of Colloid Interface Science*, **2003**, 268, 50-57.
- Rodríguez-Patino, J. M.**, Naranjo-Delgado, M. D., Linares-Fernández, J. A. Stability and mechanical strength of aqueous foams containing food proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1995**, 99, 65-78.
- Roepstorff, P.** y Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, **1984**, 11, 601-601.
- Roubos-van den Hil, P. J.**, Nout, M. J., Beumer, R. R., van der Meulen, J., y Zwietering, M. H. Fermented soya bean (tempe) extracts reduce adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to intestinal epithelial cells. *Journal of Applied Microbiology*, **2009**, 106, 1013-1021.
- Rubio, L. A.** y Seiquer, I. Transport of amino acids from in vitro digested legume proteins or casein in Caco-2 cell cultures. *Journal and Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 5202-5206.
- Rufian-Henares, J. A.**, Guerra-Hernandez, E., y García-Villanova, B. Maillard reaction in enteral formula processing: furosin, loss of o-phthaldialdehyde reactivity, and fluorescence. *Food Research International*, **2002**, 35, 527-533.

- Rycroft, C. E.**, Jones, M. R., Gibson, G. R., y Rastall, R. A. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic. *Journal of Applied microbiology*, **2001**, 91, 878-887.
- Rytkönen, J.**, Karttunen, T. J., Karttunen, R., Valkonen, K. H., Jenmalm, M. C., Alatossava, T., y col. Effect of heat denaturation on  $\beta$ -lactoglobulin-induced gastrointestinal sensitisation in rats: Denatured bLG induces a more intensive local immunologic response than native  $\beta$ LG. *Pediatric Allergy and Immunology*, **2002**, 13, 269–277.
- Rytkönen, J.**, Valkonen, K. H., Virtanen, V., Foxwell, R. A., Kyd, J. M., Cripps, A. W., y Karttunen, T. J. Enterocyte and M-Cell Transport of Native and Heat-Denatured Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin: Significance of Heat Denaturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54 (4) 1500-1507.
- Ryu, S. Y.**, Roh, H. J., Noh, B. S., Kim, S. Y., Oh, D. K., Lee, W. R., y Kim, S. S. Effects of temperature and pH on the non-enzymatic browning reaction of tagatose-glycine model system. *Journal of Food Science and Biotechnology*, **2003**, 12 (6), 675-679.
- Sakai, K.**, Sakurai, K., Sakai, M., Hoshino, M., y Goto, Y. Conformation and stability of thiol-modified bovine beta-lactoglobulin. *Protein Science*, **2000**, 9 (9), 1719-1729.
- Sánchez, E.**, Nadal, I., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., y Sanz, Y. Reduced diversity and increased virulence-gene carriage in intestinal enterobacteria of coeliac children. *BMC Gastroenterology*, **2008**, 8, 50-57.
- Sánchez, M. C.**, Berjano, M., Guerrero, A., y Gallegos, C. Evolution of the microstructure and rheology of O/W emulsions during the emulsification process. *Canadian Journal of Chemical and Engineering*, **1998**, 76, 479-485.
- Sanz, M. -L.**, Corzo-Martínez, M., Rastall, R. A., Olano, A., y Moreno, F. J. Characterization and *in vitro* digestibility of bovine  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated with galactooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, 7916-7925.
- Sarabia-Sainz, A.**, Ramos-Clamont, G., Candia-Plata, M. C., y Vázquez-Moreno, L. Biorecognition of *Escherichia coli* K88 adhesin for glycosylated porcine albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2009**, 44, 175-181.

- Sato, R.**, Naguchi, T., y Naito, H. Casein phosphopeptide (CPP) enhance calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, **1986**, 32, 67-76.
- Sato, R.**, Sawabe, T., Kishimura, H., Hayashi, K., y Saeki, H. Preparation of neoglycoprotein from carp myofibrillar protein and alginate oligosaccharide: improved solubility in low ionic strength medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 17-21.
- Sawyer, L.**  $\beta$ -lactoglobulin. En: P. F. Fox y P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 3<sup>a</sup> edición, **2003**, Vol. 1, pp. 319-386.
- Sawyer, L.**, Brownlow, S., Polikarpov, I., y Wu, S.-Y. Beta-lactoglobulin: structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*, **1998**, 8 (2), 65-72.
- Sawyer, L.**, y Holt, C. The secondary structure of milk proteins and their biological function. *Journal of Dairy Science*, **1992**, 76, 3062- 3078.
- Sawyer, L.** y Kontopidis, G. The core lipocalin, bovine beta-lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**, 1482, 136-48.
- Scaloni, A.**, Perillo, V., Franco, P., Fedele, E., Froio, R., Ferrara, L., y Bergamo, P. Characterization of heat-induced lactosylation products in caseins by immunoenzymatic and mass spectrometric methodologies. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2002**, 1598, 30-39.
- Schaaff, T. G.**, Cargile, B. J., Stephenson, J. L., y McLuckey, S. A. Ion trap collisional activation of the  $(M + 2H)^{2+}$  -  $(M + 17H)^{17+}$  ions of human hemoglobin  $\beta$ -chain. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 899-907.
- Schanbacher F. L.**, Talhouk, R. S., y Murray F. A. Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Production Science*, **1997**, 50, 105-123.
- Schanbacher, F. L.**, Talhouk, R. S., Murray, F. A., Gherman, L. I., y Wilett, L. B. Milk-borne bioactive peptides. *International Dairy Journal*, **1998**, 8, 393-403.



- Schlimme, E.** y Meisel, H. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung*, **1995**, 39, 1-20.
- Schmidt, D. G.** y van Markwijk, B. W. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **1993**, 47, 15-22.
- Sehon, A. H.** Suppression of IgE antibody responses with tolerogenic conjugates of allergens and haptens. *Progress in Allergy*, **1982**, 32, 161-202.
- Seiquer, I.**, Delgado-Andrade, C., y Navarro, P. Effects of the heat treatment of casein on Zn transport and uptake by Caco-2 cells. *Proceedings of the Nutrition Society*, **2000**, 59, 134-139.
- Seiquer, I.**, Ruiz-Roca, B., Mesías, M., Muñoz-Hoyos, A., Galdó, G., Ochoa, J. J., y Navarro, M. P. The antioxidant effect of a diet rich in Maillard reaction products is attenuated after consumption by healthy male adolescents. In vitro and in vivo comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2008**, 88, 1245-1252.
- Sélo, I.**, Clément, G., Bernard, H., Chatel, J. M., Crémion, C., Peltre, G., y Wal, J. Allergy to bovine  $\beta$ -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clinical and Experimental Allergy*, **1999**, 29, 1055-1063.
- Shah, N.** Effects of milk derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*, **2000**, 84 (Suppl. 1), 3-10.
- Shahidi, F.** y Zhong, Y. Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, **2008**, 91 (4), 914-931.
- Sharon, N.** Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, 1760, 527-537.
- Shepherd, R.**, Robertson, A., y Ofman, D. Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein-maltodextrins. *Food Hydrocolloids*, **2000**, 14, 281-286.
- Shin, D. S.**, Compadre, C. M., Maleki, S. J., Kopper, R. A., Sampson, H., Huang, S. K., Burks, A. W., y Bannon, G. A. Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on

*Ara h1*, an abundant and highly allergenic peanut protein. *Journal of Biological Chemistry*, **1998**, 273 (22), 13753-13759.

**Shiavoshian, S.**, Segain, J. P., Kornprobst, M, Bonnet, C., Cherbut, C., Galmiche, J-P., y Blotière, H. M. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **2000**, 46 (4), 507-514.

**Shoaf, K.**, Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., y Hutkins, R. W. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity*, **2006**, 74, 6920-6928.

**Sicherer, S. H.** y Sampson, H. A. Food Allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annual Review of Medicine*, **2009**, 60, 261-277.

**Simonato, B.**, Pasini, G., Giannattasio, M., Peruffo, A. D., De Lazzari, F., y Curioni, A. Food allergy to wheat products: the effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergenic proteins. A study with bread dough, crumb, and crust. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 5668-5673.

**Sipola, M.**, Finckenberg, P., Vapaatalo, H., Pihlanto-Leppälä, A., Korhonen, H., Korpela, R., y Nurminen, M.- L.  $\alpha$ -lactorphin and  $\beta$ -lactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, **2002**, 71 (11), 1245-1253.

**Sitohy, M.**, Billaudel, S., Haertlé, T., y Chobert, J. Antiviral Activity of Esterified  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin against Herpes Simplex Virus Type 1. Comparison with the Effect of Acyclovir and L-Plylysines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55 (25), 10214-10220.

**Somoza, V.** Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2005**, 49, 663-672.

**Song, Y.**, Babiker, E. E., Usui, M., Saito, A., y Kato, A. Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. *Food Research International*, **2002**, 35, 459-466.

**Song, C. Y.**, Chen, W. L., Yang, M. C., Huang, J. P., y Mao, S. J. Epitope mapping of a monoclonal antibody specific to bovine dry milk: involvement of residues 66-76 of

strand D in thermal denatured beta-lactoglobulin. *Journal of Biological Chemistry*, **2005**, 280 (5), 3574-3582.

**Soria, A. C.** y Villamiel, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, **2010**, 21, 323-331.

**Southward, C. R.** Uses of caseins and caseinates. En: P.F. Fox (Ed.), *Developments in Dairy Chemistry 4. Functional Milk Proteins*. Elsevier Applied Science, New York, **1989**, pp. 173-244.

**Spark, A.A.** Role of amino acids in nonenzymic browning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1969**, 20, 308-316.

**Srinivasan, M.**, Singh, H., y Munro, P. A. Sodium caseinate stabilized emulsions: Factors affecting coverage and composition of surface proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44, 3807-3811.

**Stryer, L.**, Berg, J. M., y Tymoczko, J. L. *Bioquímica*. Barcelona: Reverté, 5ª edición, **2003**.

**Suárez López, M. M.**, Kizlansky, A., y López, L. B. Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el score de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición Hospitalaria*, **2006**, 21 (1), 47-51.

**Sun, Y.**, Hayakawa, S., Chuamanochan, M., Fujimoto, M., Innun, A., e Izumori, K. Antioxidant effects of Maillard reaction products obtained from ovalbumin and different D-aldohehexoses. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **2006**, 70 (3), 598-605.

**Sun, Y.**, Hayakawa, S., y Izumori, K. Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the Maillard reaction: effect on protein structure and gel properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, 52, 1293-1299.

**Svenning, C.**, Brynhildsvold, J., Molland, T., Langsrud, T., y Vegarud, G. E. Antigenic response of whey proteins and genetic variants of  $\beta$ -lactoglobulin - The effect of proteolysis and processing. *International Dairy Journal*, **2000**, 10, 699-711.

**Taheri-Kafrani, A.**, Gaudin, J.-C., Rabesona, H., Nioi, C., Agarwal, D., Drouet, M., Chobert, J.-M., Bordbar, A.- K., y Haertlé, T. 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*, **2009**, 57, 4974-4982.

**Tainturier, G.**, Roullier, L., Martenot, J. P., y Lorient, D. Electroassisted glycosylation of bovine casein : an alternative to the use of reducing chemicals in N-alkylation of proteins. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **1992**, 40, 760-763.

**Tanabe, M.** y Saeki, H. Effect of Maillard reaction with glucose and ribose on solubility at low ionic strength and filament-forming ability of fish myosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 3403–3407.

**Tanford, C.**, Bunville, L. G., y Nozaki, Y. The reversible transformation of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 7.5. *Journal of The American Chemical Society*, **1959**, 81, 4032–4036.

**Tanford, C.** y Nozaki, Y. Physico-chemical comparison of beta-lactoglobulins A and B. *Journal of Biological Chemistry*, **1959**, 234, 2874-2877.

**Taylor, S.** y Lehrer, S. B. Principles and characteristics of food allergens. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Allergenicity of Foods Produced by Genetic Modification*, **1996**, 36, S91-S118.

**Thiansilakul, Y.**, Benjakul, S., y Shahidi, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared form round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, **2007**, 103, 1385-1394.

**Thomas, K.**, Aalbers, M., Bannon, G. A., Bartels, M., Dearman, R. J., Esdaile, D. J., [Fu, T. J.](#), [Glatt, C. M.](#), [Hadfield, N.](#), [Hatzos, C.](#), [Hefle, S. L.](#), [Heylings, J. R.](#), [Goodman, R. E.](#), [Henry, B.](#), [Herouet, C.](#), [Holsapple, M.](#), [Ladics, G. S.](#), [Landry, T. D.](#), [Macintosh, S. C.](#), [Rice, E. A.](#), [Privalle, L. S.](#), [Steiner, H. Y.](#), [Teshima, R.](#), [van Ree, R.](#), [Woolhiser, M.](#), y [Zawodny, J.](#) A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2004**, 39, 87-98.

**Tomberg, E.** The application of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interface. *Journal of Colloid Interface Science*, **1978**, 64, 391-402.

- Tressl, R.**, Wondrak, G. T., Garbe, L. A., Kruger, R. P., y Rewicki, D. Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46 (5), 1765-1776.
- Trofinova, D.** y Jongh, H. Modification of  $\beta$ -lactoglobulin by oligofructose: impact on protein adsorption at the air-water interface. *Langmuir*, **2004**, 20, 5544-5552.
- Trujillo, A. J.**, Casals, I., y Guamis, B. Analysis of major caprine milk proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, **2000**, 1, 11-19.
- Tuohy, K. M.**, Ziemer, C. J., Klinder, A., Knöbel, Y., Pool-Zobel, B. L., y Gibson, G. R. A human volunteer study to determine the prebiotic effects of lactulose powder on human colonic microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **2002**, 14, 165-173.
- Uhrinova, S.**, Smith, M. H., Jameson, G. B., Uhrin, D., Sawyer, L., y Barlow, P. N. Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the beta-lactoglobulin dimer. *Biochemistry*, **2000**, 39, 3565-3574.
- Uhrinova, S.**, Uhrin, D., Denton, H., Smith, M., Sawyer, L., y Barlow, P. N. Complete assignment of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts for bovine  $\beta$ -lactoglobulin: secondary structure and topology of the native state is retained in a partially unfolded form. *Journal of Biomolecular NMR*, **1998**, 12, 89-107.
- van der Ven, C.** Biochemical and functional characterisation of casein and whey protein hydrolysates. Dissertation, internally prepared, **2002**.
- van Nguyen, C.** Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2006**, 50 (12), 1140-1149.
- van Teeffelen, A. M. M.**, Broersen, K., y De Jongh, H. H. J. Glucosylation of  $\beta$ -lactoglobulin lowers the heat capacity change of unfolding; a unique way to affect protein thermodynamics. *Protein Science*, **2005**, 14, 2187-2194.
- Vega, C.** Sobre las propiedades emulsionantes de las caseínas. Mundo Lácteo y Cárnico. Enero/Febrero, **2006**, pp. 14-17.

- Voziyan, P. A.**, Metz, T. O., Baynes, J. W., y Hudson, B. G. A post-Amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, **2002**, 277 (5), 3397-3403.
- Voziyan, P. A.**, Khalifah, R. G., Thibaudeau, C., Yildiz, A., Jacob, J., Serianni, A. S., y Hudson, B. G. Modification of proteins *in vitro* by physiological levels of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278, 46616-46624.
- Wagner, J. R.**, Sorgentini, D. A., y Añón, M. C. Relation between surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation process of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 3159-3165.
- Weissbluth, M. D.** y Grieger, R. A. Alkaline denaturation of  $\beta$ -lactoglobulins. Activation parameters and effect on dye binding site. *Biochemistry*, **1974**, 13 (6), 1285-1288.
- Wal, J. M.** Immunochemical and molecular characterization of milk allergens. *Allergy*, **1998**, 53 (Suppl. 46), 114-117.
- Wal, J. M.** Structure and function of milk allergens. *Allergy*, **2001**, 56 (Suppl. 67), 35-38.
- Wal, J. M.** Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, **2004**, 93, 2-11.
- Walzem, R. L.**, Dillard, C. J., y German J. B. Whey Components: Millennia of Evolution Create Functionalities form Mammalian Nutrition: What We Know and What We May Be Overlooking. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2002**, 42, 353-375.
- Warmbier, H.C.**, Schnickel, R.A., y Labuza, T.P. Nonenzymatic browning kinetics in an intermediate moisture model system. Effect of glucose to lysine ratio. *Journal of Food Science*, **1976**, 41 (5), 981-983.
- West, D. M.**, Springings, K. A., Cassar, C., Wakeley, P. R., Sawyer, J., y Davies, R. H. Rapid detection of *Escherichia coli* virulence factor genes using multiplex real-time TaqMan© PCR assays. *Veterinary Microbiology*, **2007**, 122, 323-331.

- Whitney, R. M. L.** Proteins of Milk. En: N. P. Wong, R. Jenés, M. Keeney, y E. H. Marth (Eds.), *Fundamentals of Dairy Chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold Co., Ltd., **1988**, pp.81-169.
- Wijewickreme, A. N.** y Kitts, D. D. Influence of reactions on the oxidative behaviour of model Maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 4571-4576.
- Wolever, T. M.**, Fernandes, J., y Rao, A. V. Serum acetate: propionate ratio is related to serum cholesterol in men but not women. *Journal of Nutrition*, **1996**, 126, 2790-2797.
- Wolff, S. P.** Free radicals and glycation theory. En: R. Ikan (Ed.), *The Maillard reaction: consequences for the chemical and life sciences*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, **1996**, pp. 73-88.
- Wolfson, M. L.**, Kashimura, N., y Horton, D. Factors affecting the Maillard browning reaction between sugars and amino acids studies on the non enzymatic browning of dehydrated orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , **1974**, 22 (5), 796-799.
- Wooster, T. J.**, y Augustin, M. A.  $\beta$ -lactoglobulin-dextran Maillard conjugates: their effect on interfacial thickness and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2006**, 303, 564-572.
- Wooster, T. J.**, y Augustin, M. A. Rheology of whey protein-dextran conjugate films at the air/water interface. *Food Hydrocolloids*, **2007**, 21, 1072-1080.
- Wu, S.-Y.**, Pérez, M. D., Puyol, P., y Sawyer, L.  $\beta$ -lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *Journal of Biological Chemistry*, **1999**, 274, 170-174.
- Wyand, M. S.**, Manson, K. H., Miller, C. J., y Neurath, A. R. Effect of 3-hydroxyphthaloyl- $\beta$ -lactoglobulin on vaginal transmission of simian immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1999**, 43 (4), 978-980.
- Yamaguchi, T.** e Iki, M. Inhibitory effect of coffee extracts against some mutagens. *Agricultural Biology and Chemistry*, **1986**, 50, 2983-2988.

- Yaylayan, A. V.**, Ismail, A. A., y Mandeville, S. Quantitative determination of the effect of pH and temperature on the keto form of D-fructose by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, **1993**, 248, 355-360.
- Yaylayan, V.** y Sporns, P. [Novel mechanisms for the decomposition of 1-\(amino acid\)-1-deoxy-D-fructoses \(Amadori compounds\): A mass spectrometric approach](#). *Food Chemistry*, **1987**, 26, 283-305.
- Yaylayan, V.** y Sporns, P. Diagnostic ion series for the identification of Amadori rearrangement products by MS techniques based on electron-impact ionization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1989**, 37 (4), 978-981.
- Yaylayan, V. A.**, Huyghues-Despointes, A., y Feather, M. S. Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1994**, 34, 321-369.
- Yeboah, F. K.**, Alli, I., y Yaylayan, V. A. Reactivities of D-glucose and D-fructose during Glycation of Bovine Serum Albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, 3164-3172.
- Yeboah, F. K.**, Alli, I., Yaylayan, V. A., Yasuo, K., Chowdhury, S. F., y Purisima, E. O. Effect of limited solid-state glycation on the conformation of lysozyme by ESI-MSMS peptide mapping and molecular modeling. *Bioconjugate Chemistry*, **2004**, 15, 27-34.
- Yeboah, F. K.**, y Yaylayan, V. A. Analysis of glycated proteins by mass spectrometric techniques: qualitative and quantitative aspects. *Food/Nahrung*, **2001**, 45 (3), 164-171.
- Yen, G. C.**, Tsai, L. C., y Lii, J. D. Antimutagenic effect of Maillard reactions products obtained from amino acids and sugars. *Food and Chemical Toxicology*, **1992**, 30, 127-132.
- Yoshida, S.**, Ye, X., y Nishiumi, T. The binding ability of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin to mutagenic heterocyclic amines. *Journal of Dairy Science*, **1991**, 74 (11), 3741-3745.



- Zayas, J. F.** Solubility of proteins. En: J. F., Zayas (Ed.), *Functionality of proteins in food*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, **1997**, pp. 6-67.
- Zhang, Q. B.**, Frolov, A., Tang, N., Hoffmann, R., van de Goor, T., Metz, T. O., y Smith, R. D. Application of electron transfer dissociation mass spectrometry in analyses of non-enzymatically glycosylated peptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2007**, 21, 661-666.
- Zhu, H.** y Damodaran, S. Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1994**, 42 (4), 846-855.
- Zopf, D.** y Roth, S. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet*, **1996**, 347, 1017-1021.
- Zydney, A. L.** Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. *International Dairy Journal*, **1998**, 8 (3), 243-250.

