

糖基化对乳制品加工性能及致敏性影响的研究进展

陈欣彤^{1,2}, 邱毓^{1,2}, 杨若婷^{1,2}, 高金燕^{1,2,3}, 李欣^{1,2,3,*}, 陈红兵^{1,3,4}

(1.南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江西 南昌 330031; 2.南昌大学食品学院, 江西 南昌 330047; 3.南昌大学食物过敏重点实验室, 江西 南昌 330047; 4.南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘要:近年来,牛乳过敏因其发生率的增加和研究的深入,愈发受到广泛关注。牛乳蛋白的糖基化改性不仅能改善乳制品的功能性质,还可以通过破坏或掩蔽过敏原蛋白的表位降低乳制品致敏性,在食品风味、抗氧化性和载体等各个领域都有不同的应用。本文介绍乳品工业中常见的糖基化反应及其利弊和糖基化后乳蛋白致敏性的变化规律,总结了避免糖基化反应产生负面影响的方法,为糖基化改性在牛乳过敏及乳品加工的研究、开发和应用方面提供参考。

关键词: 乳制品; 致敏性; 功能特性; 糖基化; 美拉德反应

Research Progress in the Effect of Glycosylation on Functional Properties and Allergenicity of Dairy Products

CHEN Xintong^{1,2}, QIU Yu^{1,2}, YANG Ruoting^{1,2}, GAO Jinyan^{1,2,3}, LI Xin^{1,2,3,*}, CHEN Hongbing^{1,3,4}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330031, China;
2. College of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
3. Laboratory of Food Allergy, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
4. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In recent years, milk allergy has attracted more and more attention because of its increasing incidence and in-depth research on it. The glycosylation modification of milk proteins not only can improve the functional properties of dairy products, but also reduce the allergenicity of dairy products by destroying or shielding the epitope of allergen proteins. This modification has found applications in various fields such as food flavor, antioxidants and carriers. This paper introduces common glycosylation reactions in the dairy industry, discusses their advantages and disadvantages and the pattern of changes in functional properties and allergenicity of milk proteins after glycosylation, and summarizes the methods to avoid the negative effects of glycosylation reactions. This review provides a reference for the research, development and application of glycosylation modification in milk allergy and dairy processing.

Keywords: dairy products; allergenicity; functional properties; glycosylation; Maillard reaction

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221209-102

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)23-0383-11

引文格式:

陈欣彤, 邱毓, 杨若婷, 等. 糖基化对乳制品加工性能及致敏性影响的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(23): 383-393.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221209-102. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Xintong, QIU Yu, YANG Ruoting, et al. Research progress in the effect of glycosylation on functional properties and allergenicity of dairy products[J]. Food Science, 2023, 44(23): 383-393. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221209-102. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-12-09

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2022B0202030002); 江西省中央引导地方科技发展资金项目(20221ZDD02001); 2022年度江西省研究生创新专项资金立项项目(YC2022-s002)

第一作者简介: 陈欣彤(1999—)(ORCID: 0000-0002-9854-2582), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳蛋白定向脱敏。

E-mail: 3067542783@qq.com

*通信作者简介: 李欣(1980—)(ORCID: 0000-0002-9466-2659), 女, 教授, 博士, 研究方向为乳蛋白过敏原表位结构解析。

E-mail: zhizilix@ncu.edu.cn

牛乳营养丰富、成分复杂,不仅是一种优质的蛋白质来源,还是婴幼儿配方奶粉、炼乳、烘焙制品的重要原料。牛乳过敏的发病率在世界范围内迅速增加,成为食物过敏人群中的隐形杀手,被列为重要的食品安全问题。糖基化修饰是食品加工中一种常见的方法,在改善食品口感和功能特性方面发挥了重要作用。糖基化也是一种较为有效的消减牛乳致敏性的化学方法,它的反应机理、反应条件和降敏能力已经成为各界关注的热点。

1 牛乳过敏的机制和危害

近年来,牛乳过敏已经成为了一个备受关注的国际公共卫生问题。世界上对牛乳过敏的人群约占0.3%~7.5%,而我国1岁以下婴幼儿牛乳过敏的发生率达到了2.69%^[1]。本团队去年参与的江西省流行病学调查显示,12岁以下儿童牛乳过敏率达到4.9%^[2]。另有一项横截面调查发现重庆牛乳过敏儿童的比例已达到5.7%^[3]。在对欧洲10个国家1970名儿童的过敏反应调查中发现,20%的严重过敏反应来源于牛乳过敏^[4]。牛乳过敏是6岁以下儿童发生严重过敏反应的重要原因^[5]。鉴于食物过敏对人体生命健康的严重威胁,世界卫生组织和联合国粮农组织已先后把食物过敏的防治列为21世纪需要重点关注的三大食品安全问题之一,牛乳被认定为八大类常见过敏食物之一^[6-7]。

如表1所示,牛乳过敏的免疫学机制通常可以分为免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)E介导、非IgE介导、IgE和非IgE混合介导3种^[8],其中60%的牛乳过敏是IgE介导的^[9],主要表现为皮肤症状、呼吸系统症状、胃肠道症状和心血管症状,如荨麻疹、呼吸困难、腹痛腹泻和低血压等。另一方面,IgG、IgM、免疫复合物乃至T细胞都可以诱发非IgE介导的迟发性过敏反应,通常表现为进食后数小时或数天后发生各类消化道症状,如食物蛋白诱导的小肠结肠炎综合征^[10],也可以累及皮肤或呼吸道,而针对IgE的相关检测呈阴性^[11]。牛乳过敏还可能是IgE和非IgE混合介导引发的过敏反应,主要症状包括特异性皮炎、变应性嗜酸性食管炎和嗜酸性胃肠炎,其特征是胃肠道有弥漫或局限性嗜酸粒细胞浸润,常同时伴有周围血的嗜酸粒细胞增多症^[12]。这些过敏反应极大地影响了婴幼儿的营养状况与生长发育。然而,有研究发现70% IgE介导的牛乳过敏患者可以耐受深度烘焙的乳制品,这可能与致敏原蛋白与共生的食物组分在高温加工中的高级结构改变相关^[13-14]。

表1 牛乳过敏的3种类型及诊断

Table 1 Symptoms and clinical diagnosis of three types of milk allergy

介导类型	表现症状	临床诊断
IgE介导	I型超敏反应:可导致胃肠道、呼吸以及神经系统症状	皮肤点刺或血清IgE检测呈阳性
非IgE介导	IV型超敏反应:可导致食物蛋白诱导的直肠/结肠炎、小肠结肠炎综合征等	摄食数小时后产生消化道症状;长期的慢性腹泻和营养不良
IgE与非IgE混合介导	可导致特异性皮炎、变应性嗜酸性食管炎和嗜酸性胃肠炎等	通过食用史溯源及排除饮食确定

牛乳中已鉴定出约25种致敏原蛋白,其中 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -LG)是最主要的过敏原蛋白^[15]。部分蛋白如 α -s1-酪蛋白、 α -乳白蛋白(α -lactalbumin, α -LA)也是诱发机体产生过敏反应的主要过敏原蛋白^[16]。在母乳中,乳清蛋白占主导地位,而牛乳中的主要蛋白为不易消化的酪蛋白,若婴幼儿配方奶粉中酪蛋白比例过高,则可能导致婴幼儿食欲下降和消化不良等症^[17]。

2 糖基化反应概述

食物中蛋白质的糖基化反应基于美拉德反应的第一阶段,也就是Amadori重排过程,是由蛋白质侧链的自由氨基与还原糖类中的末端羰基发生的非酶促化学反应^[18],此反应用于构建稳定的糖胺或酮胺,并生成不挥发且有特殊香味的共价复合物^[19]。糖基化反应中间产物较多,终产物结构复杂。齐军茹等^[20]建立了通过美拉德反应制备蛋白-多糖复合物的反应路线,将糖基化分为3个阶段,如图1所示,早期糖基化反应是糖分子与赖氨酸或羟赖氨酸的 ϵ -氨基可逆地形成N-葡萄糖基胺的过程;中期为多糖的还原性末端与蛋白质的 ϵ -氨基酸之间的Amadori型连接,即席夫碱上电荷与双键重排形成糖-蛋白质酮胺结合物(Ketoamine或Amadori型产物),得到比较稳定的糖-蛋白产物;末期为醛类和胺类在低温下聚合生成高分子的类黑精(类黑素),以及一系列美拉德反应的中间体还原酮、醛类及挥发性杂环化合物。糖基化反应速率受时间、含水量、水分活度、温度、反应物活性、pH值和食品中的金属离子的影响^[21-22],其中含水量直接影响反应速率,通常水分质量分数为30%~75%时易发生反应,当水分活度为0.60~0.85时,反应速率最高,同时,反应速率也随着pH值的增加和温度的升高而增加^[23]。

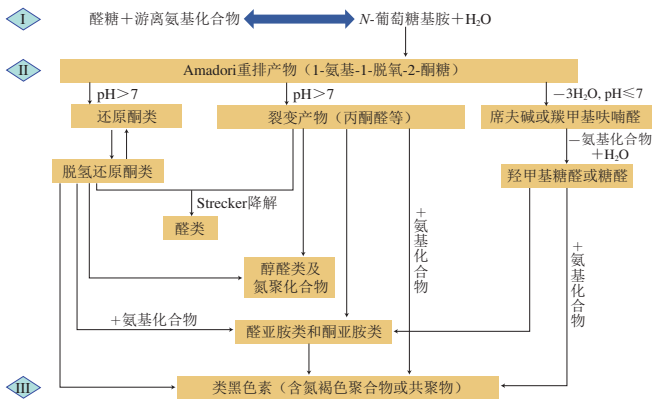


图1 蛋白质糖基化的反应途径

Fig. 1 Reaction pathways for protein glycosylation

在优化制备糖基化产物过程时，需要保证反应的速率以保证加工效率，而为使产品获得最佳的加工性，又需满足适宜的反应进程。例如通过糖基化提高蛋白质的乳化性时，需满足适宜的反应进程以保证足够的接枝度（degree of graft, DG），使得糖与蛋白质有效键合，但DG过大时，蛋白质反应基团全部用于与多糖键合，产物会因过于亲水而失去界面活性。用不同种类和分子质量的糖类修饰后的致敏原蛋白，其致敏性和抗体结合能力均有不同程度的改变^[24-26]。晚期的糖基化反应还会生成糖基化终末产物（advanced glycation endproducts, AGEs），如羧甲基赖氨酸、羧乙基赖氨酸、吡咯素等^[27-28]，这些AGEs可以与IgE或效应细胞受体结合，激活肥大细胞诱发过敏^[29]，而食品基质的组成、底物的含量、pH值、加工方式以及抗氧化剂等都会影响AGEs生成^[30]。N^ε-羧甲基赖氨酸是最具代表性的AGEs化合物，已被证明在过敏反应中充当过敏表位^[31]。

糖基化反应作为一种复杂的化学反应，易受各种因素影响，故较难控制反应进程，而在乳制品加工领域，需要适当的糖基化反应以提升产品的加工性能，又需要避免过度的糖基化反应造成的食物过敏等食品安全问题^[32-33]。因此需要深入系统地研究糖基化反应，优化不同过敏原的反应条件，从而降低蛋白质的致敏性质。目前常见的评价过敏原蛋白致敏性的方法是通过液相色谱或试剂盒分析AGEs的组成^[34]，或利用竞争性酶联免疫吸附测定法检测糖基化蛋白与晚期糖基化终末产物特异性受体（advanced glycosylation end product-specific receptor, RAGE）的结合能力^[27,35]。通过这两种方法可以检测乳制品中潜在的过敏表位、有害化学成分和致敏原对信号通路及免疫系统的激活程度，间接或直接评价过敏原蛋白的致敏性。

3 通过糖基化反应改性牛乳蛋白的常见方法

糖基化是乳制品加工中常见的化学反应。通过糖基化反应对牛乳蛋白进行改性的方法主要包括干热处理、湿热处理、超声波处理、脉冲电场处理、微波辅助处理、静电纺丝处理、辐照处理、高压技术处理、挤压处理等^[36]。

3.1 干热处理

干热糖基化作为一种传统的方法已被广泛用于制备蛋白质-碳水化合物接枝聚合物，具体方法是将一定比例的蛋白质和碳水化合物的混合体系冻干，并在受控温度和相对湿度下保持数小时至数周^[37]。Martinez-Alvarenga等^[38]研究表明，干热糖基化制备条件以温度最为重要，其次分别为相对湿度、时间、反应物物质的量比，而Cermeño等^[39]发现，蛋白质水解程度和蛋白质-碳水化合物比例是决定反应的主导因素。

由于冷冻干燥成本高、热处理时间长，且温度和湿度要求可控，在很大程度上阻碍了工业规模的商业化应用。所以为了缩短干燥时间，大部分工业生产会选择喷雾干燥，即通过对流方式使原料被雾化成细小的液滴，在热空气流或惰性气体（如氮气）中暴露一小段时间形成干粉，再进一步利用高温环境进行糖基化反应^[40]。这种干燥方法的优点是处理时间非常短，可用于在较高温度下短时间制备糖基化产物，能够作为一种替代冷冻干燥的快速方法^[41]。

3.2 湿热处理

湿热处理作为干热处理的替代方法可以缩短加热时长，并省略之前的冷冻干燥步骤。该方法基于蛋白质和多糖在水溶液中的紧密接触，然后在受控温度下加热混合物。这种方法的缺点是蛋白质在水溶液中加热更易变性和聚合^[42]，且运输成本更高，但就溶解性、乳化性和发泡能力等功能性质而言，湿法加热比干热制备的糖基化产物更具有优势^[43-44]。在一项乳清蛋白与菊粉糖基化研究中，湿热处理后的乳清蛋白Zeta电位低于干热反应，说明湿热处理能更好地屏蔽蛋白质表面电荷，防止蛋白质聚沉，且湿热处理中，乳清蛋白抗氧化性与pH值和温度呈正相关^[45]。

3.3 超声波处理

超声波可以通过高频率（超过16 kHz）的声波产生能量和局部高压，并在不均匀的压缩和膨胀中形成气穴。若超声波能量未达到气泡中的汽相，溶液将快速冷凝，凝聚的分子相互碰撞，产生冲击波和高压区域。超声处理过程中可以控制的影响因素包括超声功率（频率、强度）、时间、周期和温度^[46-47]。与传统方法相比，超声波处理的最大优势是无需额外加热，但可能会相应地增加棕色或异味化合物的产生^[48]。

Stanic-Vucinic等^[46]比较了 β -LG与6种不同糖(葡萄糖、半乳糖、乳糖、果糖、核糖和阿拉伯糖)在10~15℃下通过超声引发的糖基化反应,发现超声波可以成功制备非变性的糖基化偶联物,其中 β -LG与核糖的糖基化程度最高,达76%,其产物的抗氧化活性也最高。通过优化超声频率、功率密度和暴露时间,可以在糖基化反应的早期阶段利用温和的反应条件和较短的反应时间实现所需蛋白质的最高糖基化效率,获得被修饰的蛋白质,为工业上应用高强度超声制备糖基化产物提供技术支持。

3.4 微波辐照处理

微波辐照是利用电离能处理不同食品的过程,通常频率范围为300 MHz~300 GHz。由于微波加工能够保持加工产品的营养价值,提高蛋白质的消化率,在食品行业被广泛用于干燥、烹饪和保存。辐射电磁波产生的热量可诱发糖基化反应,且反应过程中样品不易失活^[49]。然而,微波辐照处理不适用于液体体系,若样品含水量丰富,微波波场分布可能会存在死角,造成体系不同位置的反应程度不同,并进一步导致营养损失^[50]。最近的一项研究中,Nooshkam等^[51]利用微波处理研究了乳糖、乳果糖与乳清蛋白之间的结合,发现在微波辐照辅助下形成了糖基化产物。与传统方法相比,微波处理后的蛋白乳化、发泡性能及消化率也显著提升。由此可见,微波加热对糖基化产物功能性质的改善更有效,有进一步探索其功能性及工艺稳定性的必要。

3.5 其他处理方式

糖基化改性除了以上几种主要的处理方法,还可以利用脉冲电场、静电纺丝、高压处理和挤压等方式处理样品。脉冲电场技术利用电压增加碳骨架的内能,削弱—OH基团之间的氢键,此方法利于多糖链的解聚分解和蛋白质的展开^[52-53],它的优势在于反应时间更短(毫秒级)、处理更均匀且发热较少,但其只能应用于电导率低、黏度相对较低的液基样品^[53];而静电纺丝法通过施加高压电场在液滴之间产生排斥力,降低聚合物溶液的表面张力并快速蒸发溶剂,其结合物产率高,干燥时间短^[54],气流辅助静电纺丝装置如图2所示。高压技术通过加压使蛋白结构展开和变化,促进糖基化反应,缩短所需的时间,降低所需温度,使食品的营养价值、色泽、风味和质地得到更好的保护^[55]。高压处理通常分为3种方法:高压高温、高静水压和动态高压微流态化加工,其中,高压高温方法由于使用了热源,可以独立地制备糖基化产物^[56-58],而高静水压^[59]和动态高压微流态化^[60]通常被用作糖基化反应的预处理方法,能提升糖基化反应的效率和效果。

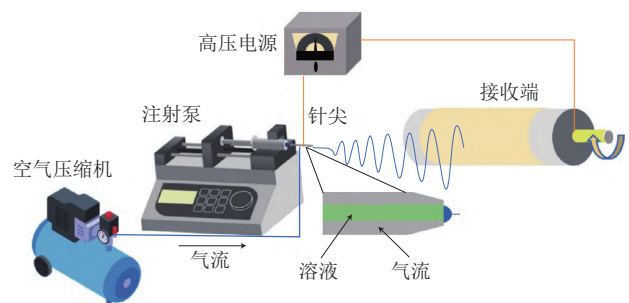


图2 气流辅助静电纺丝装置^[61]

Fig. 2 Air-assisted electrospinning device^[61]

综上所述,为了控制糖基化反应,有必要应用不同技术和反应动力学进行额外的研究,其中重要的一点是要防止糖基化反应进入终反应阶段,因为这会导致有害化合物和杂质的产生。牛乳蛋白普遍在70~80℃下发生热变性,为有目的地改善乳制品的加工特性和控制其致敏性,并有效地保留产品的营养与风味,最适合运用超声波、微波辐照或静电纺丝进行糖基化(表2)。其中微波辐照设备相对简单,易于控制反应进程,对营养物质的保留效果更好,更适用于鲜奶、婴幼儿配方奶粉等产品。目前大部分研究依然普遍采用干法糖基化降低食品蛋白的致敏性,通过在较低温度下反应、透析,得到褐变少且纯度高的产物;而小部分研究正在探究超声波糖基化和微波辅助加热糖基化等更高效节能且活性成分损失小的糖基化方法,但由于反应设备或技术不成熟等问题,两者都还未实现大规模量产。故在大部分食品工业生产中,依然普遍运用设备简单、技术成熟且反应速率相对较快的湿法糖基化。

表2 糖基化方法优缺点与适用类型

糖基化方法	方法	优点	缺点	适用范围
湿热法	液体介质中进行水浴加热	操作简单,速率快,反应时间短	褐变严重,蛋白质易变性	小分子糖类、不易变性的蛋白质
干热法	固体混合物形式于干燥烘箱中反应	反应温度条件温和,产物褐变少	反应速率慢、效率低,反应进度不受控	多糖
超声波法	超声波空穴作用辅助蛋白质结构伸展	反应时间短,温度低,蛋白变性少	设备复杂,不易大规模产业化	易热变性的蛋白质
微波辐照法	利用微波辐照均匀产生的热量诱发反应	利于控制反应进程和保存活性物质	研究较少,不易大规模产业化和规范化	易失活物质
脉冲电场法	通过电场削弱氢键促进蛋白质展开	反应时间短(毫秒级),反应均匀,发热少	设备复杂,不易大规模产业化	电导率低、黏度相对较低的液基样品
静电纺丝法	利用高压电场使样品形成喷射细流并蒸发成干物质	反应时间短,产率高,冻干时间短	设备复杂,研究较少,需要规范化	各类蛋白质-多糖结合物
高压法	通过高压展开蛋白结构促进糖基化反应	反应时间短,副产物少,产物营养与风味被保留	辅助处理方法,需要结合热处理	高安全性的成分,如食品
挤压法	利用剪切力松散蛋白结构促进糖基化反应	反应时间短,产率高,过程连续	辅助处理方法,需要结合热处理	高安全性成分如食品、流水生产线

4 糖基化反应对乳制品的影响

适当的糖基化可以显著改善乳制品的风味和溶解性^[62]、热稳定性^[63]、乳化性^[64]、起泡性^[65]、凝胶性^[66-67]等功能特性,还可以提高某些蛋白质的抗氧化性^[68-69]。但研究发现过度的糖基化反应可能造成食品的异味^[70],降低营养价值并产生有害化学物质,对食物和人体健康产生负面影响。在糖基化反应过程中,糖的类型对反应途径和反应产物有明显的影响,常用的糖包括乳糖、葡萄糖、低聚异麦芽糖、低聚半乳糖、低聚甘露糖、果胶和葡聚糖等,其反应程度取决于参与糖单体的开链数量、浓度及pH值。普遍情况下,反应活性从高到低的顺序为:还原单糖高于还原多糖,还原五碳糖高于还原六碳糖;醛糖的糖基化反应速度要高于酮糖^[71-72]。这些糖类与牛乳蛋白发生糖基化反应后,可以应用于多种产业。

4.1 改变食品的感官品质

糖类主要与牛乳中的游离氨基酸基团发生反应,可以使某些经过热处理的乳制品,如超高温处理的牛奶、奶粉、奶酪等食物产生有吸引力的外观和味道^[73-75],在烘焙产品、含乳酱汁、速溶饮料中也能观察到这一现象。这些食品经加工后会产生诱人的金黄色至深褐色,激发人们的食欲。而烤面包、爆米花、烘焙咖啡等食品在蒸煮、焙烤及煎炸过程中经加热而发生蛋白分解、氧化、重排或降解,会生成具有特殊风味的食品香气物质,多个研究表明,这些香气主要来自糖基化产物,如羟甲基糠醛、麦芽酚、糠醇、糠醛、2-乙酰呋喃等^[76]。

然而,糖基化反应也是导致食品变质的重要原因之一。过度的糖基化反应会给食物带来苦涩和焦味,如乳糖和乳蛋白之间的糖基化反应会给超高温加工牛奶带来异味;在奶粉生产或储存过程中,如果温度和湿度控制不当,也会引起奶粉颜色和气味的变化,如喷雾干燥的乳清蛋白在加工和储存阶段会发生糖基化反应,产生甲酰苏氨酸等物质;加工干酪过程中产生的挥发性成分,如麦芽酚和呋喃酮是奶酪异味的主要原因。多项研究表明,引起不良气味的主要化合物是2-呋喃甲醛、2-丁酸糠酯、烷基吡嗪和N-乙基-2-甲酰基吡咯等^[77]。除此之外,在加工过程中,乳及乳制品酪蛋白末端氨基酸赖氨酸的氨基会与乳糖(或者其他还原糖)生成葡萄糖胺,然后经过Amadori重排、裂解、脱水等过程生成棕褐色物质如N^ε-羧甲基赖氨酸和N^ε-羧乙基赖氨酸。这类物质是乳品颜色变化的主要原因,也是导致蛋白溶解性、起泡性和乳化性降低的原因^[78],这类褐变是人们不希望出现的。

4.2 提升产品加工和功能特性

研究表明,通过糖基化反应可以进一步改善蛋白质的溶解性、热稳定性、凝胶性、发泡能力和成膜性等加工特性,增加其在食品工业中的价值。Wang Qian等^[79]

发现乳清蛋白和葡聚糖进行糖基化得到的产物在较宽的pH值范围内具有较高的溶解性和热稳定性,这可能与蛋白质的物理特性和化学结构变化(如抗变性、转向更酸性的等电点、巯基暴露减少、表面疏水性降低和糖基化位点生成)导致分子间相互作用减少有关;在60℃超声干燥处理制备质量比为1:2的酪蛋白-卡拉胶偶联物,可提高酪蛋白的溶解性和乳化性^[80];Spotti等^[81]通过糖基化制备了乳清蛋白和葡聚糖的偶联物凝胶,相比纯乳清蛋白,凝胶显示出更好的机械性能;乳清蛋白和麦芽糊精的糖基化冷凝胶也显示出氢键强度增强、凝胶硬度提高、持水能力增强、凝胶溶胀减少的特性^[67];糖基化反应还可以提高乳蛋白的发泡能力和成膜性,如酪蛋白酸钠和麦芽糊精糖基化产物溶解度增加,发泡能力和发泡稳定性增强,这主要是由于表面活性粒子含量及其相对疏水性的增加^[82]。糖基化还可以增强蛋白成膜效果,用于制作更适合食品包装的生物可降解材料^[83-84];Corzo-Martínez等^[47]制备了酪蛋白-麦芽糊精的糖基化薄膜,此薄膜相比酪蛋白膜具有更好的亲水性和可塑性,说明糖基化后的蛋白质可以制备亲水性、可塑性更好的膜,用作透明饮料或食品中的纳米封装剂。

同时,糖基化可以改善食品的功能特性如抗氧化性能,尤其是对于容易氧化的含脂食品。糖基化产物的抗氧化作用有多种机制,包括螯合金属离子、破坏自由基链和过氧化氢、清除活性氧等,其抗氧化活性主要与糖基化中间阶段和晚期的反应产物有关。研究表明,以荷斯坦乳牛作为奶源生产的酪蛋白与葡萄糖反应产生的糖基化产物具有抗氧化活性,可作为脂质氧化抑制剂,在还原能力、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除能力和与Fe²⁺螯合能力方面也均有提高^[85]。糖基化产物还具有一定的抗突变作用,研究显示从酱油、黑啤酒、焦糖、黑蒜中分离出来的类黑精都具有很强的抗诱变活性^[86-87],可能与类黑精中还原性聚合物可消除自由基、钝化酶有关。

4.3 降低食品营养价值与安全性

食品中乳糖和赖氨酸的糖基化产物会降低赖氨酸的消化率和生物利用度,从而改变食品营养价值^[88],这可能是由于乳清蛋白的赖氨酸残基与还原糖羰基结合,从而使蛋白质中的大量赖氨酸被束缚,因而无法被生物体消化酶解离利用^[89]。研究表明,奶粉中发生糖基化反应会导致奶粉中维生素和乳蛋白损失,且损失程度与反应进展有关,主要受储存方式、储存时间、温度和湿度的影响^[90]。在喷雾干燥过程中,奶粉在氮气中的褐变反应快于在氧气中的褐变反应^[91],且与普通奶粉相比,婴儿配方奶粉因乳糖含量更高或额外添加了低聚糖,更容易和乳蛋白发生糖基化反应,故营养损失程度更高^[92]。风味奶制品通常还含有添加的甜味剂,产品在超高温加热处理后的长期储存过程中,牛奶蛋白质将经历更多的氨

基酸损失。此外,糖基化产物还会影响铁、磷和镁等微量元素的生物利用度^[93-95]。

糖基化反应也可能产生有毒物质,如丙烯酰胺、杂环胺、呋喃和5-羟甲基糠醛等^[96-97]。这些化合物具有神经毒性、遗传毒性、致癌性、生殖毒性、肝毒性和免疫毒性^[98],严重影响人类健康。国际癌症研究机构将丙烯酰胺和呋喃列为对人类“可能”致癌的物质。不同还原糖产生的糖基化产物的致癌性不同,葡萄糖和半乳糖等还原糖的糖基化产物具有较高的致癌性,而乳糖和低聚糖等非还原糖的糖基化产物具有较低的致癌性,这些差异主要归因于反应机制的不同^[99]。此外,糖基化的反应进程也与致癌性相关。一项关于前列腺癌增殖的实验证明,乳清和葡萄糖的早期糖基化产物可以通过调节巨噬细胞间接促进癌细胞增殖,而AGEs可以直接促进癌细胞增殖^[100]。同时,饮食摄入的外源性AGEs可能会在体内累积,而人体组织中过高的AGEs水平与各种炎症疾病有关,如肾功能衰竭^[101]、糖尿病^[102]、动脉粥样硬化^[103]、阿尔茨海默病^[104]、帕金森病和其他疾病^[105]。这些疾病主要通过AGEs与细胞表面受体结合或与体内蛋白质交联,改变其结构和功能,促进氧化应激和炎症的发展而发生。研究结果表明,食用婴儿配方奶粉小鼠血浆中的N^ε-羧甲基赖氨酸浓度比食用母乳的小鼠高46%^[106]。因此,控制食品中不必要糖基化反应和反应进程对食品安全至关重要。

5 糖基化反应对牛乳蛋白致敏性的影响

研究普遍认为,糖基化反应可以改变牛乳蛋白的免疫特性,主要通过对过敏原蛋白结构和理化性质的改变消减蛋白的致敏性。综合已有研究的体外致敏性评估、细胞致敏性评估和动物模型体内致敏性评估,可以大致了解糖基化反应后蛋白致敏性的变化机理和规律。

5.1 糖基化修饰过敏原蛋白识别位点以阻断过敏反应

免疫反应的基础即是抗原与抗体的相互识别,而糖基化修饰蛋白即是对抗原的加工修饰。通过糖基化反应,糖链可以完全或部分地覆盖住蛋白表面的识别位点,阻断抗原抗体之间的识别进程。Hackstadt等^[107]认为,单糖与蛋白表位结合后,形成的空间位阻会限制IgE与线性表位结合,导致抗体结合能力减小,缓解过敏反应的发生。另有研究发现,将天门冬酰胺酶蛋白质突变序列进行覆盖,可以逃避机体的免疫监视作用,从而减弱其在实验小鼠体内的免疫原性;相反,若将原有的蛋白侧链上连接的糖链水解,则会提高免疫反应的强度,例如将治疗红细胞再生障碍的重组人红细胞生成素的糖侧链水解会导致其免疫反应增强,半衰期变短,从而干扰药效^[108]。这说明糖链可以遮蔽蛋白质表面某些免

疫反应必需的识别位点,造成免疫耐受。Gasparini等^[109]利用胰蛋白酶和乳糜蛋白酶消化高温短时杀菌牛奶,通过质谱确定了 α -LA和 β -LG中的一些乳糖糖基化位点(即K8、K14、K47、K60、K69、K75、K77、K83、K91、K100、K101和K135),作者选取IgE结合表位(TKIPAVFKIDALNEN)合成肽段并进行糖基化,通过傅里叶变换高分辨质谱对其产物进行分析,发现 α -LA和 β -LG的乳糖糖基化位点与IgE结合表位多处重合,且糖链的存在影响蛋白的IgE结合能力。这一结果证实了糖基化位点与IgE结合表位之间的密切联系,对于进一步研究糖基化修饰对蛋白质过敏性至关重要。

糖基化反应还可以通过蛋白质高级结构和物理性质的变化降低其致敏性。Perusko等^[110]发现糖基化反应改变了 β -LG的高级结构并发生热聚,减弱Caco-2细胞对完整蛋白的摄取,增加细胞水解酶对 β -LG的消化率,并通过破坏蛋白的构象表位降低过敏原与抗体的结合几率,从而降低干扰素- γ 、白细胞介素(interleukin, IL)-5和IL-13的释放和嗜碱性粒细胞的活性。还有研究表明,糖基化能改变 β -LG的物理性质如疏水性,从而减弱消化系统对蛋白的转运和受体介导的细胞吞噬,并且降低的程度与反应的完全程度呈正比^[111]; α -LA通过和葡萄糖糖基化结合可以明显降低其疏水性和抗原性,其中反应物的重量比对抗原性的影响最大,反应时间的影响最小^[112]。

5.2 控制糖基化反应以降低乳过敏原蛋白致敏性

虽然糖基化修饰对蛋白的致敏性影响并没有严格的规律性,但依然有研究从单个致敏原蛋白出发,研究了不同糖类对致敏性的影响和不同反应条件下致敏性的变化规律,即过敏原表位的破坏程度大于新抗原表位生成时,过敏原致敏性减弱;而过敏原表位的破坏程度小于新抗原表位生成时,过敏原致敏性会相应地增强。

张自业^[113]研究发现,小分子糖类更易发生糖基化反应,但也更易产生AGEs,AGEs可以充当新的IgE抗原表位,导致糖基化产物的致敏性没有显著变化;而低聚糖或多糖的糖基化产物可以通过破坏抗原表位、降低肠壁血管和肠黏膜通透性抑制小鼠脾脏和肠系膜淋巴结内淋巴细胞辅助型T细胞2(T helper 2, Th2),细胞因子IL-4、IL-10、IL-13、转化生长因子- β 和调节性T细胞(regulatory cells, Treg)分泌,减弱其对RBL-2H3细胞和小鼠的致敏反应。Li Zheng等^[114]使用乳清分离蛋白分别与麦芽糖、麦芽二糖、麦芽三糖与麦芽五糖偶联,发现糖基化有效降低了 α -LA和 β -LG抗原性,其中与麦芽五糖偶联的糖基化蛋白抗原性降低最显著。Xu Lei等^[115]用分子质量1~2 000 kDa的葡聚糖糖化乳清蛋白,发现低分子质量葡聚糖可以遮蔽蛋白线性表位并改变其潜在构象表位,从而降低乳清分离蛋白致敏性,但其偶联难度随分子质量的增加而升高。

综上所述,小分子质量的低聚糖最适宜修饰致敏原蛋白,其产生的有害副产物比利用单糖修饰时更少,且比利用单糖或高分子质量聚糖修饰的蛋白致敏性更低。

5.3 糖基化产物改变免疫细胞的功能导致过敏反应增强

免疫系统可以保护机体免受病原体感染,增加机体暴露于抗原时的耐受性,免疫功能紊乱与过敏性疾病息息相关。AGEs作为抗原,它的受体在单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞和脂肪细胞等多种细胞中表达^[116],迄今为止,已经鉴定出几种AGEs受体,包括RAGE、寡糖转移酶复合蛋白48、80K-H蛋白和半乳糖凝集素-3等^[117]。

糖基化蛋白通过与RAGE结合,不仅能操纵抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC)对过敏原的摄取,还可以激活核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)细胞通路,增强促炎细胞因子调节受体的敏感性,并诱导下游细胞信号传导。研究表明,将糖基化的卵白蛋白与树突状细胞(dendritic cells, DC)共培养,发现生成的AGEs增强了特异性CD4 T细胞的活化和成熟DC细胞的摄取率,且共培养物中IL-6的产生量增加,说明食物过敏原的糖基化反应在T细胞免疫中起重要作用^[118]; van der Lugt等^[119]发现用葡萄糖和乳糖糖基化酪蛋白产生的AGEs与蛋白质结合后可以刺激人巨噬细胞,直接诱导肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)分泌并诱导炎症反应,该反应中AGEs通过刺激巨噬细胞上的RAGE,激活丝裂原活化蛋白激酶/NF- κ B信号通路,诱导TNF- α 分泌;还有研究表明,糖基化反应可以损伤小鼠骨髓来源的DC受体,诱导细胞因子生成,引发机体炎症反应^[120]; Zenker等^[121]在研究糖基化 β -LG的过程中发现产物增加了与RAGE、血小板糖蛋白4(platelet glycoprotein 4, CD36)、半乳糖凝集素-3的能力结合,激活适应性免疫,从而引发更强的免疫应答。

上述证据表明,虽然适当的糖基化反应可以不同程度地降低蛋白的致敏性,但过度糖基化产生的AGEs也可以通过与RAGE、半乳糖凝集素-3、CD36和A型清道夫受体的结合,促进APC对抗原的递呈、T细胞的活化和向Th2方向的倾斜,从而改变免疫细胞的功能,最终导致牛乳蛋白致敏性的增强。

6 结语

牛乳是人类生命早期最易接触到的过敏食物,牛乳过敏发病率在世界范围内迅速增长,是国际上一个亟待解决的公共卫生问题。而在液态奶或烘焙乳制品的热杀菌、真空浓缩、喷雾干燥或进一步高温焙烤处理中,牛乳中的乳糖或额外添加的糖类都可能与牛乳蛋白发生糖基化反应。虽然糖基化反应已被证实是能有效改善乳制品加工性质、降低蛋白致敏性的改性技术,但过度的糖

基化反应也会增加蛋白致敏性,故在乳制品加工领域,需要适当的糖基化反应以提升产品的加工性能,又需要避免过度的糖基化反应造成的食品安全问题。由于糖基化反应步骤复杂且反应进程较难控制,因此优化乳制品加工的条件在降低牛乳蛋白致敏性方面有重大研究意义。通过降低反应温度、缩短反应时间或减少含水量,或根据产品性质,开发超声波、微波辐照等利于控制反应进程的新型糖基化工艺,能够减少反应副产物的生成,从而最大程度降低蛋白质的致敏性。

随着科学界的不懈努力,复杂糖基化蛋白的鉴定、性质研究和定向合成都取得了显著的成效,低致敏性糖肽的设计和大量定向合成不再是空想,这也为进一步的研究与应用提供了更多便利。今后可以通过对功能性质优良的低致敏性糖基化蛋白进行选取、鉴定并大量定向合成,为低敏乳制品的加工、开发和应用提供参考策略与数据支撑。

参考文献:

- [1] YANG M, TAN M Z, WU J L, et al. Prevalence, characteristics, and outcome of cow's milk protein allergy in Chinese infants: a population-based survey[J]. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2019, 43(6): 803-808. DOI:10.1002/jpen.1472.
- [2] FENG H, CHEN Y, CHEN H B, et al. A methodology of epidemiologic study in the general population focusing on food allergy-china, 2020[J]. *China CDC Weekly*, 2022, 4(34): 749-755. DOI:10.46234/ccdcw2022.159.
- [3] MA Z Y, CHEN L, XIAN R L, et al. Time trends of childhood food allergy in China: three cross-sectional surveys in 1999, 2009, and 2019[J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2021, 32(5): 1073-1079. DOI:10.1111/pai.13490.
- [4] GRABENHENRICH L B, DOLLE S, MONERET-VAUTRIN A, et al. Anaphylaxis in children and adolescents: the European anaphylaxis registry[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016, 137(4): 1128-1137. DOI:10.1016/j.jaci.2015.11.015.
- [5] FLEISCHER D M, PERRY T T, ATKINS D, et al. Allergic reactions to foods in preschool-aged children in a prospective observational food allergy study[J]. *Pediatrics*, 2012, 130(1): e25-e32. DOI:10.1542/peds.2011-1762.
- [6] NURMATOV U, DHAMI S, ARASI S, et al. Allergen immunotherapy for IgE-mediated food allergy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Allergy*, 2017, 72(8): 1133-1147. DOI:10.1111/all.13124.
- [7] FREW A J. Allergen immunotherapy[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125(2): S306-S313. DOI:10.1016/j.jaci.2009.10.064.
- [8] COSTA C, COIMBRA A, VITOR A, et al. Food allergy-from food avoidance to active treatment[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2020, 91(1): e12824. DOI:10.1111/sji.12824.
- [9] WINBERG A, WEST C E, STRINNHOLM A, et al. Assessment of allergy to milk, egg, cod, and wheat in swedish schoolchildren: a population based cohort study[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): e131804. DOI:10.1371/journal.pone.0131804.
- [10] BERIN M C, SAMPSON H A. Mucosal immunology of food allergy[J]. *Current Biology*, 2013, 23(9): R389-R400. DOI:10.1016/j.cub.2013.02.043.

- [11] CONNORS L, O'KEEFE A, ROSENFELD L, et al. Non-IgE-mediated food hypersensitivity[J]. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2018, 14(Suppl 2): 56. DOI:10.1186/s13223-018-0285-2.
- [12] YU W, FREELAND D, NADEAU K C. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(12): 751-765. DOI:10.1038/nri.2016.111.
- [13] KIM J S, NOWAK-WEGRZYŃ A, SICHERER S H, et al. Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011, 128(1): 125-131. DOI:10.1016/j.jaci.2011.04.036.
- [14] LAMBERTI C, ACQUADRO E, CORPILLO D, et al. Validation of a mass spectrometry-based method for milk traces detection in baked food[J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 119-127. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.11.130.
- [15] HEINE R G, ELSAYED S, HOSKING C S, et al. Cow's milk allergy in infancy[J]. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2002, 2(3): 217-225. DOI:10.1097/00130832-200206000-00011.
- [16] 何圣发, 陈红兵, 龙彩云, 等. 牛乳过敏原 β -乳球蛋白检测方法的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(7): 1763-1769. DOI:10.3969/j.issn.2095-0381.2019.07.004.
- [17] LAYMAN D K, LONNERDAL B, FERNSTROM J D. Applications for α -lactalbumin in human nutrition[J]. *Nutrition Reviews*, 2018, 76(6): 444-460. DOI:10.1093/nutri/nuy004.
- [18] 江波, 杨瑞金. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2018: 511.
- [19] ZHOU Q, QIU H W. The mechanistic impact of *N*-glycosylation on stability, pharmacokinetics, and immunogenicity of therapeutic proteins[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 108(4): 1366-1377. DOI:10.1016/j.xphs.2018.11.029.
- [20] 齐军茹, 杨晓泉, 廖劲松, 等. 大豆蛋白-多糖干热制备复合物及其反应机理研究(II)功能性质的改善[J]. *食品科学*, 2006, 6(2): 61-64.
- [21] MALEKI S J, CHUNG S Y, CHAMPAGNE E T, et al. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, 106(4): 763-768. DOI:10.1067/mai.2000.109620.
- [22] SROGA G E, SIDDULA A, VASHISHTH D. Glycation of human cortical and cancellous bone captures differences in the formation of Maillard reaction products between glucose and ribose[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(2): e117240. DOI:10.1371/journal.pone.0117240.
- [23] FRIEDMAN M. Prevention of adverse effects of food browning[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1991, 289: 171-215. DOI:10.1007/978-1-4899-2626-5_15.
- [24] DASANAYAKA B P, LI Z, PRAMOD S N, et al. A review on food processing and preparation methods for altering fish allergenicity[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(7): 1951-1970. DOI:10.1080/10408398.2020.1848791.
- [25] WANG W Q, BAO Y H, CHEN Y. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system[J]. *Food Chemistry*, 2013, 139: 355-361. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.01.072.
- [26] XU L, GONG Y S, GERN J E, et al. Glycation of whey protein with dextrans of different molar mass: effect on immunoglobulin E-binding capacity with blood sera obtained from patients with cow milk protein allergy[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(8): 6823-6834. DOI:10.3168/jds.2017-14338.
- [27] EHN B M, EKSTRAND B, BENGTSSON U, et al. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen β -lactoglobulin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(5): 1398-1403. DOI:10.1021/jf0304371.
- [28] DAVIS P J, SMALES C M, JAMES D C. How can thermal processing modify the antigenicity of proteins?[J]. *Allergy*, 2001, 56(Suppl 67): 56-60. DOI:10.1034/j.1398-9995.2001.00918.x.
- [29] TODA M, HEILMANN M, ILCHMANN A, et al. The Maillard reaction and food allergies: is there a link?[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2014, 52(1): 61-67. DOI:10.1515/cclm-2012-0830.
- [30] 房红娟, 王丽娟, 张双凤, 等. 高蛋白食品加工模拟体系中晚期糖基化末端产物的形成[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(2): 28-34.
- [31] KISLINGER T, FU C, HUBER B, et al. *N*^ε-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(44): 31740-31749. DOI:10.1074/jbc.274.44.31740.
- [32] TODA M, HELLMIG M, HENLE T, et al. Influence of the Maillard reaction on the allergenicity of food proteins and the development of allergic inflammation[J]. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2019, 19(1): 4. DOI:10.1007/s11882-019-0834-x.
- [33] GUPTA R K, GUPTA K, SHARMA A, et al. Maillard reaction in food allergy: pros and cons[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(2): 208-226. DOI:10.1080/10408398.2016.1152949.
- [34] MONACI L, HENGEL A J. Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1192(1): 113-120. DOI:10.1016/j.chroma.2008.03.041.
- [35] MUELLER G A, MALEKI S J, JOHNSON K, et al. Identification of Maillard reaction products on peanut allergens that influence binding to the receptor for advanced glycation end products[J]. *Allergy*, 2013, 68(12): 1546-1554. DOI:10.1111/all.12261.
- [36] KAN X, CHEN G, ZHOU W, et al. Application of protein-polysaccharide Maillard conjugates as emulsifiers: source, preparation and functional properties[J]. *Food Research International*, 2021, 150: 110740. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110740.
- [37] WANG C Y, LI J H, LI X, et al. Emulsifying properties of glycation or glycation-heat modified egg white protein[J]. *Food Research International*, 2019, 119: 227-235. DOI:10.1016/j.foodres.2019.01.047.
- [38] MARTINEZ-ALVARENGA M S, MARTINEZ-RODRIGUEZ E Y, GARCIA-AMEZQUITA L E, et al. Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate-maltodextrin conjugates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 38: 110-118. DOI:10.1016/j.foodhyd.2013.11.006.
- [39] CERMEÑO M, FELIX M, CONNOLLY A, et al. Role of carbohydrate conjugation on the emulsification and antioxidant properties of intact and hydrolysed whey protein concentrate[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 88: 170-179. DOI:10.1016/j.foodhyd.2018.09.030.
- [40] YOHA K S, MOSES J A, ANANDHARAMAKRISHNAN C. Effect of different drying methods on the functional properties of probiotics encapsulated using prebiotic substances[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(5): 1575-1588. DOI:10.1007/s00253-023-12398-3.
- [41] ZHOU C L, WANG H, CHEN Y L, et al. Effect of *L*-cysteine and lactose on color stability of porcine red blood cell during freeze-drying and powder storage[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(3): 669-674. DOI:10.1007/s10068-012-0087-0.
- [42] BAUER J, SCHAAL D, EISOLDT L, et al. Acidic residues control the dimerization of the *N*-terminal domain of black widow spiders' major ampullate spidroin 1[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34442. DOI:10.1038/srep34442.

- [43] SEO C W, YOO B. Preparation of milk protein isolate/ κ -carrageenan conjugates by Maillard reaction in wet-heating system and their application to stabilization of oil-in-water emulsions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 139: 110542. DOI:10.1016/j.lwt.2020.110542.
- [44] SEO C W, YOO B. Effect of milk protein isolate/ κ -carrageenan conjugates on rheological and physical properties of whipping cream: a comparative study of Maillard conjugates and electrostatic complexes[J]. Food Science of Animal Resources, 2022, 42(5): 889-902. DOI:10.5851/kosfa.2022.e42.
- [45] GUO M R, WANG H, WANG C N. Interactions between whey protein and inulin in a model system[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(10): 4051-4058. DOI:10.1007/s13197-018-3331-7.
- [46] STANIC-VUCINIC D, PRODIC I, APOSTOLOVIC D, et al. Structure and antioxidant activity of β -lactoglobulin-glycoconjugates obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions[J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 590-599. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.10.087.
- [47] CORZO-MARTÍNEZ M, SORIA A C, VILLAMIEL M, et al. Effect of glycation on sodium caseinate-stabilized emulsions obtained by ultrasound[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(1): 51-58. DOI:10.3168/jds.2010-3551.
- [48] NAIK A S, SURYAWANSHI D, KUMAR M, et al. Ultrasonic treatment: a cohort review on bioactive compounds, allergens and physico-chemical properties of food[J]. Current Research in Food Science, 2021, 4: 470-477. DOI:10.1016/j.crfs.2021.07.003.
- [49] 薛丁萍, 徐斌, 姜辉, 等. 食品微波加工中的非热效应研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(4): 143-148.
- [50] MENG C, DA-MING F, LUE-LUE H, et al. A new approach to microwave food research: analyzing the electromagnetic response of basic amino acids[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 41: 100-108. DOI:10.1016/j.ifset.2017.02.015.
- [51] NOOSHKAM M, MADADLOU A. Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides[J]. Food Chemistry, 2016, 200: 1-9. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.12.094.
- [52] GUAN Y, LIN H, HAN Z, et al. Effects of pulsed electric field treatment on a bovine serum albumin-dextran model system, a means of promoting the Maillard reaction[J]. Food Chemistry, 2010, 123(2): 275-280. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.04.029.
- [53] GITERU S G, OEY I, ALI M A. Feasibility of using pulsed electric fields to modify biomacromolecules: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 72: 91-113. DOI:10.1016/j.tifs.2017.12.009.
- [54] KUTZLI I, GRIENER D, GIBIS M, et al. Influence of Maillard reaction conditions on the formation and solubility of pea protein isolate-maltodextrin conjugates in electrospun fibers[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101: 105535. DOI:10.1016/j.foodhyd.2019.105535.
- [55] KURPIEWSKA K, BIELA A, LOCH J I, et al. Towards understanding the effect of high pressure on food protein allergenicity: β -lactoglobulin structural studies[J]. Food Chemistry, 2019, 270: 315-321. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.07.104.
- [56] VAN VLIERBERGHE K, GAVAGE M, DIEU M, et al. The effect of high pressure-high temperature processing conditions on acrylamide formation and other Maillard reaction compounds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(22): 11740-11748. DOI:10.1021/jf102697b.
- [57] AVILA R G, XI B, MINOR M, et al. High-pressure-high-temperature processing reduces Maillard reaction and viscosity in whey protein-sugar solutions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(38): 7208-7215. DOI:10.1021/acs.jafc.6b01955.
- [58] BUCKOW R, WENDORFF J, HEMAR Y. Conjugation of bovine serum albumin and glucose under combined high pressure and heat[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(8): 3915-3923. DOI:10.1021/jf104336w.
- [59] NADERI N, POULIOT Y, HOUSE J D, et al. High hydrostatic pressure effect in extraction of 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) from egg yolk and granule fractions[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 43: 191-200. DOI:10.1016/j.ifset.2017.08.009.
- [60] HUANG X, TU Z, WANG H, et al. Glycation promoted by dynamic high pressure microfluidisation pretreatment revealed by high resolution mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 3250-3259. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.05.159.
- [61] 罗仕园, 杨诚, 陈载晗, 等. 气流辅助静电纺丝制备负载姜黄素纳米纤维及美拉德反应对纤维性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(22): 46-53.
- [62] ABD E M, EL-SHIBINY S. Glycation of whey proteins: technological and nutritional implications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 83-92. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.114.
- [63] RYAN K N, ZHONG Q, FOEGEDING E A. Use of whey protein soluble aggregates for thermal stability: a hypothesis paper[J]. Journal of Food Science, 2013, 78(8): R1105-R1115. DOI:10.1111/1750-3841.12207.
- [64] SIVAPRATHA S, SARKAR P. Multiple layers and conjugate materials for food emulsion stabilization[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 58(6): 877-892. DOI:10.1080/10408398.2016.1227765.
- [65] GRIGOROVICH N V, MOISEENKO D V, ANTIPOVA A S, et al. Structural and thermodynamic features of covalent conjugates of sodium caseinate with maltodextrins underlying their functionality[J]. Food & Function, 2012, 3(3): 283-289. DOI:10.1039/c1fo10187k.
- [66] MEYDANI B, VAHEDIFAR A, ASKARI G, et al. Influence of the Maillard reaction on the properties of cold-set whey protein and maltodextrin binary gels[J]. International Dairy Journal, 2019, 90: 79-87. DOI:10.1016/j.idairyj.2018.11.009.
- [67] SPOTTI M J, PERDUCA M J, PIAGENTINI A, et al. Gel mechanical properties of milk whey protein-dextran conjugates obtained by Maillard reaction[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31(1): 26-32. DOI:10.1016/j.foodhyd.2012.08.009.
- [68] PYO M C, YANG S Y, CHUN S H, et al. Protective effects of Maillard reaction products of whey protein concentrate against oxidative stress through an Nrf2-dependent pathway in HepG2 cells[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2016, 39(9): 1437-1447. DOI:10.1248/bpb.b16-00029.
- [69] NOOSHKAM M, VARIDI M, BASHASH M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 644-660. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.09.083.
- [70] ZHANG L, XIA Y, PETERSON D G. Identification of bitter modulating Maillard-catechin reaction products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(33): 8470-8477. DOI:10.1021/jf502040e.
- [71] STANIC-VUCINIC D, PRODIC I, APOSTOLOVIC D, et al. Structure and antioxidant activity of β -lactoglobulin-glycoconjugates

- obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions[J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 590-599. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.10.087.
- [72] NOOSHKAM M, MADADLOU A. Maillard conjugation of lactulose with potentially bioactive peptides[J]. Food Chemistry, 2016, 192: 831-836. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.07.094.
- [73] KARAGUL-YUCEER Y, DRAKE M A, CADWALLADER K R. Aroma-active components of nonfat dry milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(6): 2948-2953. DOI:10.1021/jf0009854.
- [74] JANSSON T, JENSEN H B, SUNDEKILDE U K, et al. Chemical and proteolysis-derived changes during long-term storage of lactose-hydrolyzed ultrahigh-temperature (UHT) milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(46): 11270-11278. DOI:10.1021/jf504104q.
- [75] ZHONG C, TAN S, LANGRISH T. Redness generation via Maillard reactions of whey protein isolate (WPI) and ascorbic acid (vitamin C) in spray-dried powders[J]. Journal of Food Engineering, 2019, 244: 11-20. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2018.09.020.
- [76] NEWTON A E, FAIRBANKS A J, GOLDING M, et al. The role of the Maillard reaction in the formation of flavour compounds in dairy products-not only a deleterious reaction but also a rich source of flavour compounds[J]. Food & Function, 2012, 3(12): 1231-1241. DOI:10.1039/c2fo30089c.
- [77] 蔡妙颜, 肖凯军, 袁向华. 美拉德反应与食品工业[J]. 食品工业科技, 2003(7): 90-93. DOI:10.3969/j.issn.1002-0306.2003.07.039.
- [78] 李华. 奶与奶制品棕色化的产生及其控制[J]. 中国奶牛, 1998(4): 51-52.
- [79] WANG Qian, ISMAIL B. Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality, solubility, thermal stability and molecular configuration of whey protein[J]. International Dairy Journal, 2012, 25(2): 112-122. DOI:10.1016/j.idairyj.2012.02.009.
- [80] QIU J H, ZHENG Q X, FANG L, et al. Preparation and characterization of casein-carrageenan conjugates and self-assembled microcapsules for encapsulation of red pigment from paprika[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 196: 322-331. DOI:10.1016/j.carbpol.2018.05.054.
- [81] SPOTTI M J, MARTINEZ M J, PILOSOFF A M R, et al. Rheological properties of whey protein and dextran conjugates at different reaction times[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 38: 76-84. DOI:10.1016/j.foodhyd.2013.11.017.
- [82] GRIGOROVICH N V, MOISEENKO D V, ANTIPOVA A S, et al. Structural and thermodynamic features of covalent conjugates of sodium caseinate with maltodextrins underlying their functionalities[J]. Food & Function, 2012, 3: 283-289. DOI:10.1039/C1FO10187K.
- [83] ANDRADE M A, RIBEIRO-SANTOS R, GUERRA M, et al. Evaluation of the oxidative status of salami packaged with an active whey protein film[J]. Foods, 2019, 8(9): 387. DOI:10.3390/foods8090387.
- [84] MARKMAN G, LIVNEY Y D. Maillard-conjugate based core-shell co-assemblies for nanoencapsulation of hydrophobic nutraceuticals in clear beverages[J]. Food & Function, 2012, 3: 262-270. DOI:10.1039/c1fo10220f.
- [85] WANG H X, YANG J T, YANG M, et al. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a Yak casein-glucose model system[J]. International Dairy Journal, 2019, 91: 55-63. DOI:10.1016/j.idairyj.2018.12.010.
- [86] LI Y, JIA X, TANG N, et al. Melanoidins, extracted from Chinese traditional vinegar powder, inhibit alcohol-induced inflammation and oxidative stress in macrophages via activation of SIRT1 and SIRT3[J]. Food & Function, 2021, 12(17): 8120-8129. DOI:10.1039/d1fo00978h.
- [87] KIM J S. Antioxidant activity of various soluble melanoidins isolated from black garlic after different thermal processing steps[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2020, 25(3): 301-309. DOI:10.3746/pnf.2020.25.3.301.
- [88] ERBERSDOBLER H F, SOMOZA V. Forty years of furosine-forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51(4): 423-430. DOI:10.1002/mnfr.200600154.
- [89] ALJAHDALI N, CARBONERO F. Impact of Maillard reaction products on nutrition and health: current knowledge and need to understand their fate in the human digestive system[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(3): 474-487. DOI:10.1080/10408398.2017.1378865.
- [90] FORD J E, HURRELL R F, FINOT P A. Storage of milk powders under adverse conditions 2. Influence on the content of water-soluble vitamins[J]. British Journal of Nutrition, 1983, 49(3): 355-364. DOI:10.1079/bjn19830044.
- [91] WADA Y, LONNERDAL B. Effects of industrial heating processes of milk-based enteral formulas on site-specific protein modifications and their relationship to *in vitro* and *in vivo* protein digestibility[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(30): 6787-6798. DOI:10.1021/acs.jafc.5b02189.
- [92] PISCHETSRIEDER M, HENLE T. Glycation products in infant formulas: chemical, analytical and physiological aspects[J]. Amino Acids, 2012, 42(4): 1111-1118. DOI:10.1007/s00726-010-0775-0.
- [93] KIM E S, YAYLAYAN V. Identification of the Maillard reaction intermediates as divalent iron complexes in alanine/glucose/FeCl₂ model system using ESI/qTOF/MS/MS and isotope labelling technique[J]. Current Research in Food Science, 2021, 4: 287-294. DOI:10.1016/j.crf.2021.04.003.
- [94] RONCERO-RAMOS I, DELGADO-ANDRADE C, MORALES F J, et al. Influence of Maillard products from bread crust on magnesium bioavailability in rats[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(8): 2002-2007. DOI:10.1002/jsfa.6006.
- [95] DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, GARCIA M M, et al. Increased Maillard reaction products intake reduces phosphorus digestibility in male adolescents[J]. Nutrition, 2011, 27(1): 86-91. DOI:10.1016/j.nut.2009.10.009.
- [96] URIBARRI J, WOODRUFF S, GOODMAN S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet[J]. Journal of the American Dietetic Association, 2010, 110(6): 911-916. DOI:10.1016/j.jada.2010.03.018.
- [97] VLASSARA H. Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, 1043: 452-460. DOI:10.1196/annals.1333.051.
- [98] ANESE M, MANZOCCO L, CALLIGARIS S, et al. Industrially applicable strategies for mitigating acrylamide, furan, and 5-hydroxymethylfurfural in food[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(43): 10209-10214. DOI:10.1021/jf305085r.
- [99] BRANDS C M, ALINK G M, VAN BOEKEL M A, et al. Mutagenicity of heated sugar-casein systems: effect of the Maillard reaction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(6): 2271-2275. DOI:10.1021/jf9907586.
- [100] CHEN Y, FILIPOV N M, GUO T L. Dietary glycation products regulate immune homeostasis: early glycation products promote prostate cancer cell proliferation through modulating macrophages[J].

- Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62(3): 1700641. DOI:10.1002/mnfr.201700641.
- [101] URIBARRI J, PEPPA M, CAI W, et al. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2003, 14(3): 728-731. DOI:10.1097/01.asn.0000051593.41395.b9.
- [102] WANG Z Q, JIANG Y C, LIU N F, et al. Advanced glycation end-product N^ε-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(2): 387-396. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.019.
- [103] HARTOG J W, VOORS A A, SCHALKWIJK C G, et al. Clinical and prognostic value of advanced glycation end-products in chronic heart failure[J]. European Heart Journal, 2007, 28(23): 2879-2885. DOI:10.1093/eurheartj/ehm486.
- [104] LI J L, LIU D N, SUN L, et al. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2012, 317(1/2): 1-5. DOI:10.1016/j.jns.2012.02.018.
- [105] SEBEKOVA K, SOMOZA V. Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects-PRO[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51(9): 1079-1084. DOI:10.1002/mnfr.200700035.
- [106] ŠEBEKOVÁ K, SAAVEDRA G, ZUMPE C, et al. Plasma concentration and urinary excretion of N^ε-(carboxymethyl)lysine in breast milk- and formula-fed infants[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1126: 177-180. DOI:10.1196/annals.1433.049.
- [107] HACKSTADT T. Steric hindrance of antibody binding to surface proteins of *Coxiella burnetii* by phase I lipopolysaccharide[J]. Infection and Immunity, 1988, 56(4): 802-807. DOI:10.1128/iai.56.4.802-807.1988.
- [108] POKROVSKY V S, KAZANOV M D, DYAKOV I N, et al. Comparative immunogenicity and structural analysis of epitopes of different bacterial L-asparaginases[J]. BMC Cancer, 2016, 16: 89. DOI:10.1186/s12885-016-2125-4.
- [109] GASPARINI A, BUHLER S, FACCINI A, et al. Thermally-induced lactosylation of whey proteins: identification and synthesis of lactosylated β -lactoglobulin epitope[J]. Molecules, 2020, 25(6): 1294. DOI:10.3390/molecules25061294.
- [110] PERUSKO M, VAN ROEST M, STANIC-VUCINIC D, et al. Glycation of the major milk allergen β -lactoglobulin changes its allergenicity by alterations in cellular uptake and degradation[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62(17): e1800341. DOI:10.1002/mnfr.201800341.
- [111] ROTH-WALTER F, BERIN M C, ARNABOLDI P, et al. Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches[J]. Allergy, 2008, 63(7): 882-890. DOI:10.1111/j.1398-9995.2008.01673.x.
- [112] BU G H, LU J, ZHENG Z, et al. Influence of Maillard reaction conditions on the antigenicity of bovine α -lactalbumin using response surface methodology[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(14): 2428-2434. DOI:10.1002/jsfa.3741.
- [113] 张自业. 基于糖基化修饰消减秀丽白虾原肌球蛋白致敏性及免疫脱敏机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019: 113-117.
- [114] LI Zheng, LUO Yongkang, FENG Ligeng. Effects of Maillard reaction conditions on the antigenicity of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein conjugated with maltose[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(3): 387-394. DOI:10.1007/s00217-011-1532-7.
- [115] XU Lei, GONG Yuansheng, GERN J E, et al. Glycation of whey protein with dextrans of different molar mass: effect on immunoglobulin E-binding capacity with blood sera obtained from patients with cow milk protein allergy[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(8): 6823-6834. DOI:10.3168/jds.2017-14338.
- [116] BRICENO N D, ZENKER H E, CROES C A, et al. Receptor mediated effects of advanced glycation end products (AGEs) on innate and adaptative immunity: relevance for food allergy[J]. Nutrients, 2022, 14(2): 371. DOI:10.3390/nu14020371.
- [117] OTT C, JACOBS K, HAUCKE E, et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling[J]. Redox Biology, 2014, 2: 411-429. DOI:10.1016/j.redox.2013.12.016.
- [118] HEILMANN M, WELLNER A, GADERMAIER G, et al. Ovalbumin modified with pyrroline, a Maillard reaction product, shows enhanced T-cell immunogenicity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(11): 7919-7928. DOI:10.1074/jbc.M113.523621.
- [119] VAN DER LUGT T, WESELER A R, GEBBINK W A, et al. Dietary advanced glycation endproducts induce an inflammatory response in human macrophages *in vitro*[J]. Nutrients, 2018, 10(12): 1868. DOI:10.3390/nu10121868.
- [120] TEODOROWICZ M, ZENKER H E, EWAZ A, et al. Enhanced uptake of processed bovine β -lactoglobulin by antigen presenting cells: identification of receptors and implications for allergenicity[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2021, 65(8): e2000834. DOI:10.1002/mnfr.202000834.
- [121] ZENKER H E, TEODOROWICZ M, EWAZ A, et al. Binding of cml-modified as well as heat-glycated β -lactoglobulin to receptors for ages is determined by charge and hydrophobicity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(12): 4567. DOI:10.3390/ijms21124567.