

高压脉冲电场结合糖基化对 β -乳球蛋白抗原性与结构的影响

涂宗财^{1,2}, 田明¹, 王辉¹, 杨文华¹, 李雪¹, 黄涛¹

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

(2. 江西师范大学生命科学学院, 江西南昌 330022)

摘要: β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin, β -Lg) 是一种营养丰富的牛乳清蛋白, 但也是导致牛乳过敏的主要过敏原; 本文以 β -Lg为研究对象, 通过酶联免疫吸附法、电泳、圆二色谱及荧光光谱等方法, 在蛋白与糖的质量比为1:2、修饰温度60 °C、反应时间3 h、反应环境pH 7.4和不同高压脉冲电场 (pulsed electric fields, PEF) 强度反应条件下, 对 β -Lg-半乳糖复合物中 β -Lg的抗原性变化及反应产物的结构特性进行研究。结果表明: 经过PEF结合糖基化处理后, β -Lg抗原性显著降低, 且PEF预处理会促进 β -Lg抗原性降低, 在电场强度25 kV/cm下预处理90 μ s后进行糖基化, β -Lg抗原性降低最多, 降低了约72.9%; 其分子量增大; α -螺旋和 β -转角结构减少, 而 β -折叠和无规则卷曲结构逐渐增多; 表面疏水性和内源性荧光强度均降低; 自由巯基含量先升高后下降, 这为制备低致敏性 β -Lg提供了一种新的方法。

关键词: 脉冲电场; β -乳球蛋白; 糖基化; 抗原性; 酶联免疫吸附法; 结构

文章编号: 1673-9078(2016)11-203-208

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.031

Effect of the Pretreatment Combining Glycation and Pulsed Electric Fields on the Antigenicity and Structure of β -Lactoglobulin

TU Zong-cai^{1,2}, TIAN Ming¹, WANG Hui¹, YANG Wen-hua¹, LI Xue¹, HUANG Tao¹

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

(2.College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

Abstract: β -Lactoglobulin (β -Lg) is a nutrient-rich bovine whey protein, but it is a major allergen in milk. In this study, we investigated β -Lg, and the changes in the antigenicity of the β -Lg in β -Lg-galactose conjugates and the structural properties of reaction products as determined using indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), circular dichroism spectroscopy, and fluorescence spectroscopy. The reaction conditions were as follows: mass ratio of β -Lg and galactose, 1:2, modification temperature, 60 °C, reaction time, 3 h and reaction pH 7.4. The pulsed electric field (PEF) intensity was varied. The results showed that after the pretreatment with glycation and PEF, the antigenicity of β -Lg significantly reduced, and PEF pretreatment promoted the decrease in antigenicity. When the sample was treated with PEF at 25 kV/cm for 90 μ s, followed by glycation, the largest drop in the antigenicity of β -Lg was achieved (about 72.9%). After pretreatment with glycation coupled with PEF, the molecular weight of β -Lg increased. The contents of α -helix and β -turns decreased while the content of β -sheet and random coil increased. The intrinsic fluorescence intensity and surface hydrophobicity decreased, and the free sulfhydryl content first increased and then decreased. In this study, we describe a novel method for producing low-allergic β -Lg.

Key words: pulsed electric fields; β -lactoglobulin; glycation; antigenicity; enzyme-linked immunosorbent assay; structure

β -乳球蛋白是一种优质的牛乳清蛋白, 营养丰富, 含有人体必需的氨基酸和矿物质元素。同时具有多种功能特性, 被广泛应用于食品加工中。但是, β -Lg 是

收稿日期: 2015-12-20

基金项目: 国家 863 科技计划项目 (2013AA102205)

作者简介: 涂宗财 (1965-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食物资源的开发与高效利用

导致牛乳过敏的主要过敏原, 在牛乳过敏人群中, 对 β -Lg 过敏的患者高达 82%^[1]。近年来, 国内外对降低 β -Lg 的抗原性进行了大量的研究。其中, 利用化学改性蛋白质如糖基化、磷酸化和聚乙二醇 (PEG) 改性等较为广泛; Enomoto 等^[2]利用麦芽五糖与 α -乳白蛋白结合, 降低了 α -乳白蛋白的抗原性, 同时蛋白构象也发生了改变; Li 等^[3]采用麦芽糖与草鱼小清蛋白进

行糖基化处理,显著降低了小清蛋白的抗原性;Iwan等^[4]利用葡萄糖与榛子过敏原 Cor a 11 进行糖基化处理,降低了 Cor a 11 的抗原性。然而,目前未见脉冲电场结合糖基化改性 β -Lg 的相关研究报道。本文采用脉冲电场结合糖基化改性 β -Lg 发现,PEF 预处理会促进 β -Lg 的抗原性降低,将两种改性技术相结合,以达到更好地降低 β -Lg 抗原性的效果。而且脉冲电场技术具有良好的应用特性,工业前景十分看好。

高压脉冲电场 (pulsed electric fields, PEF) 是一种新型的非热食品加工技术,已经较广泛地应用于杀菌、钝酶、物质提取、酒类催陈和农药残留降解等^[5,6]。相对于传统的热加工处理技术,其处理条件温和,能够很大程度上避免食品在处理过程中的感官品质和物理特性的变化,因此,能最大限度的保持食品原有的感官品质和营养成分。目前,PEF 对食品蛋白质的研究主要集中在对蛋白质理化性质的研究,如乳化性、凝胶性与表观粘度等,而关于 PEF 对过敏原蛋白抗原性的报道几乎没有。

目前,关于使用两种或两种以上的加工方法降低蛋白质抗原性的报道还较少。Zhong 等^[7]利用动态高压微射流协同糖基化处理 β -Lg,发现 β -Lg 的抗原性降低显著;Lopez-Exposito 等^[8]利用超高压结合酶解法处理卵清蛋白,发现卵清蛋白的抗原性明显降低。因此,本论文通过脉冲电场结合糖基化改性 β -Lg,探究其抗原性和空间结构之间的关系,这对脉冲电场加工控制过敏原蛋白抗原性的关键技术研究具有理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

β -乳球蛋白、半乳糖、鱼皮明胶和羊抗兔酶标二抗(美国 Sigma 公司);兔抗 β -Lg 血清(实验室自制);其他所需试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

电泳仪,美国 BIO-RAD 公司;高压脉冲电场设备,中国农业大学与清华大学自主研发;F-7000 荧光光谱仪,日本日立公司;HF 2000 酶标分析仪,北京华安麦科;Bio-Logic MOS 450 CD 圆二色谱仪,法国 Bio-Logic 公司。

1.3 方法

1.3.1 PEF处理

用0.01 mol/L、pH 7.4的磷酸盐缓冲液(phosphate

buffer, PBS) 将 β -Lg 配成 1 mg/mL 的溶液,处理时间为 90 μ s,电场强度为 5、15、25 和 35 kV/cm。波形为单极性方波,电场强度 E 和总处理时间 t 计算方法^[9]:

$$E = \frac{U}{d}$$

$$t = \frac{n \times V \times f \times W}{v}$$

式中: U , 实际电压, kV; d , 电极板间距 0.4, cm; n , 处理室个数; V , 处理腔体积 0.05, mL; f , 频率, Hz; W , 脉宽, μ s; v , 流速 (mL/s)。

1.3.2 糖基化处理

根据 Zhang 等^[10]的方法稍作修改, β -乳球蛋白与半乳糖按质量比 1:2 混匀,冻干。将冻干后的粉末置于培养箱中在 65 $^{\circ}$ C, 65% 的相对湿度(饱和碘化钾溶液)下反应 3 h,反应结束后将离心管立即置于冰浴中终止反应。糖基化反应结束后,加入预先冷却的超纯水复溶,然后采用截留分子量为 10 ku 的超滤离心管除去盐和多余的糖。最终将样品中蛋白质的浓度调为 1 mg/mL,并置于 -20 $^{\circ}$ C 待用。

1.3.3 SDS-PAGE凝胶电泳

根据 Zhang 等^[11]的方法,采用 12% 的分离胶,5% 的浓缩胶,样品与 4 \times 上样缓冲液按照 3:1 的比例混合,沸水加热 5 min 左右,离心 1 min。开始上样,上样量 8 μ L。电泳结束后,用染色液(考马斯亮蓝 G250 等)染色 30 min,然后用 7% 的冰乙酸进行脱色。

1.3.4 圆二色谱(CD)分析

蛋白质的二级结构采用圆二色谱法进行测定。测定条件:样品浓度 0.2 mg/mL,扫描速度 100 nm/min,扫描范围 190~250 nm,带宽 1.0 nm^[1,2]。结果采用圆二分析软件 dichroweb 进行分析。

1.3.5 内源性荧光的测定

采用 F-7000 荧光光谱仪测定 β -Lg 内源荧光强度。参照 Lucia 等^[1,2]方法, β -Lg 溶液用 0.01 mol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液稀释至质量浓度 0.5 mg/mL。测定条件:激发波长为 280 nm,发射波长为 300~450 nm,激发和发射的狭缝宽度均为 5 nm,扫描速度为 1200 nm/min。

1.3.6 表面疏水性的测定

采用 ANS 荧光探针法测定表面疏水性。将 ANS (8-苯胺-1-萘磺酸) 作为荧光探针,用 0.01 mol/L、pH 7.4 PBS 配制一定浓度梯度的 β -Lg 溶液,然后与等量的 ANS 溶液混合,测定其荧光强度。测定条件:激发波长为 370 nm,发射波长为 400~600 nm,扫描速度为 1200 nm/min,激发和发射的狭缝宽度均为 10 nm。以蛋白浓度 (mg/mL) 为横坐标,荧光强度为纵坐标模

拟曲线, 表面疏水性 (H_0) 为拟合曲线的斜率^[13]。

1.3.7 自由巯基含量的测定

自由巯基含量测定采用Ellman's DTNB法^[14], 取 1.0 mL、1 mg/mL的 β -Lg溶液与4.0 mL Tris-Gly缓冲溶液混合, 再加入Ellman's试剂, 于25 °C温育30 min, 然后在412 nm下检测吸光值。所有样品重复三次、计算平均值。计算方法如下:

$$\text{自由巯基含量}(\mu\text{mol/g}) = 73.53 \times A_{412} \times D/C$$

式中, D: 稀释倍数; C: 样品浓度 (mg/mL)。

1.3.8 抗原性评估

抗原性的测定采用间接竞争 ELISA 法。酶标板中每孔加入 100 μ L、2 μ g/mL 的 β -Lg 标准品在 37 °C 包被 45 min。每孔加入 250 μ L、质量分数为 1% 的鱼皮明胶, 在 37 °C 温浴 35 min。依次加入 50 μ L 不同浓度的 β -Lg 标准品以及 50 μ L、15 μ g/mL 不同条件 PEF 结合糖基化处理的样品, 再加入 50 μ L 兔抗 β -Lg 血清, 37 °C 温浴 30 min。再每孔加入 100 μ L 羊抗兔酶标二抗, 37 °C 温浴 30 min, 每步操作之后均用 PBST 溶液洗板 3 次并拍干。加显色液 (TMB, 四甲基联苯胺) 显色, 37 °C 避光反应 15 min, 最后每孔加入 100 μ L、2 mol/L H_2SO_4 溶液终止反应, 酶标仪 450 nm 检测及结果分析^[15,16]。以 β -Lg 标准品浓度 (0.5~64 μ g/mL) 的对数为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制标准曲线, 根据标准曲线即可算出不同 PEF 处理条件下 β -Lg 样品的抗原性 (μ g/mL), 从而算出抗原性降低率。计算公式如下:

$$\text{抗原性降低率}(\%) = \frac{C_{\text{原样}} - C_{\text{待测}}}{C_{\text{原样}}} \times 100$$

式中, $C_{\text{原样}}$: 根据标准曲线计算出的原样的抗原性 (μ g/mL);

$C_{\text{待测}}$: 根据标准曲线计算出的待测样品的抗原性 (μ g/mL)。

1.3.9 数据统计与分析

表 1 PEF 结合糖基化处理对 β -Lg 二级结构各组分含量的影响

Table 1 Effects of the pretreatment combination of glycation with PEF on the content (%) of β -Lg secondary structure

蛋白样品	二级结构组成/%			
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
未处理	22.0 \pm 1.20 ^b	36.9 \pm 1.20 ^a	20.4 \pm 1.10 ^b	20.6 \pm 0.10 ^a
5 kv/cm、90 μ s	21.1 \pm 1.30 ^b	37.2 \pm 1.50 ^a	17.3 \pm 0.30 ^a	22.5 \pm 1.60 ^{ab}
15 kv/cm、90 μ s	20.2 \pm 0.10 ^b	38.8 \pm 0.40 ^{ab}	16.6 \pm 0.40 ^a	23.6 \pm 0.10 ^{bc}
25 kv/cm、90 μ s	17.0 \pm 0.10 ^a	41.1 \pm 0.10 ^{bc}	16.7 \pm 0.50 ^a	25.4 \pm 1.20 ^c
35 kv/cm、90 μ s	15.2 \pm 0.40 ^a	44.4 \pm 0.60 ^c	16.4 \pm 0.60 ^a	24.2 \pm 0.10 ^{bc}

注: 实验结果以平均值 \pm 标准偏差表示 (n=3), 同列不同小写字母代表具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

圆二色谱是检测蛋白质二级结构的常用方法。 β -Lg 是以 β -折叠为主的球蛋白, 由9条反平行的 β -折叠和一条 α -螺旋组成。表1所示是通过Bio-Logic MOS 450圆二色谱仪测定的不同PEF结合糖基化处理对 β -Lg二级结

构各组分含量的影响。由表1可知: α -螺旋和 β -转角结构减少, 同时 β -折叠和无规则卷曲结构逐渐增多, 但仍然以 β -折叠为主。可能的原因是PEF处理破坏了氢键作用, 使蛋白质结构展开, 二级结构遭到破坏。这与Li

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

β -Lg 单体由 162 个氨基酸组成, 分子量为 18.4 ku, 图 1 为 PEF 结合糖基化处理对 β -Lg 分子量的影响。根据图 1 的电泳图谱可以看出, 与未处理的 β -Lg 相比, 经 PEF 结合糖基化处理的样品电泳条带明显上移, 说明糖基化反应后 β -Lg 与糖分子发生了共价交联反应, β -Lg 的分子量增大。随着 PEF 场强强度的增大, 电泳条带没有明显变化, 说明 PEF 处理不会改变 β -Lg 分子量。另外, 在分子量 31~43 ku 范围内出现一条明显的条带, 原因是热处理作用使 β -Lg 形成了共价二聚体^[17]。

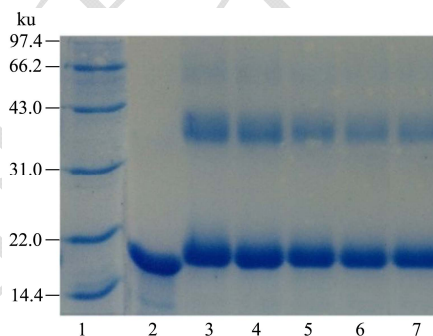


图 1 PEF 结合糖基化处理对 β -Lg 分子量的影响

Fig.1 Effects of the pretreatment combination of glycation with PEF on the molecular weight of β -Lg

注: 1 为 Marker; 2 为 β -乳球蛋白; 3~7 分别为 0、5、15、25 和 35 kv/cm 糖基化 β -乳球蛋白。

2.2 圆二色谱分析

等^[18]研究PEF处理对大豆分离蛋白二级结构的影响类似。

2.3 内源性荧光分析

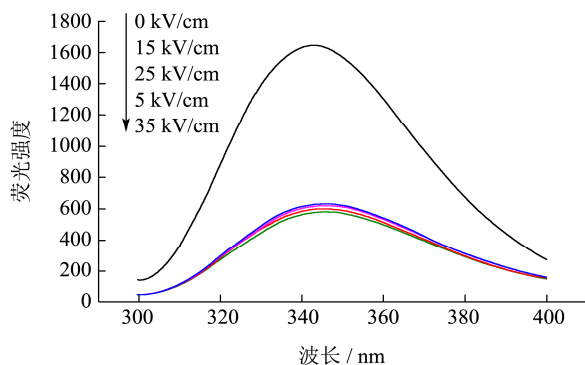


图2 PEF结合糖基化处理对 β -Lg内源性荧光强度的影响

Fig.2 Effects of the pretreatment combination of glycation with PEF on the intrinsic fluorescence intensity of β -Lg

蛋白质分子中因含有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)能发射荧光,具有内源荧光性。 β -Lg的内源荧光主要来源于色氨酸(Trp)。图2为不同电场强度PEF结合糖基化处理对 β -Lg内源性荧光强度的影响。由图2可知,经过脉冲电场结合糖基化处理, β -Lg的内源荧光强度显著降低,在电场强度35 kv/cm、90 μ s时荧光强度最低。可能的原因是脉冲电场处理使得 β -Lg分子展开,Trp和Tyr等发色团暴露于溶剂中发生荧光猝灭,导致荧光强度降低。 β -Lg单体主要包括两个色氨酸(Trp19和Trp61)。根据相关报道发现^[19], β -Lg的糖基化位点可能主要发生在Lys60位置, β -Lg在Lys60位置与半乳糖发生糖基化反应,导致Trp61被掩盖从而引起荧光猝灭。不同电场强度处理下 β -Lg的最大发射波长从343 nm红移至346 nm,发生了轻微的红移现象。说明PEF结合糖基化处理使蛋白结构发生了部分的展开,蛋白结构发生了较大的改变^[20]。

2.4 表面疏水性分析

表面疏水性(H_0)是蛋白质重要的结构性质,是维持蛋白质三级结构的重要作用力之一。 β -Lg经PEF结合糖基化处理后其表面疏水性的变化如图3所示,与原样相比,表面疏水性均显著降低,并且随脉冲场强的增大呈先升高后下降的趋势。这主要是由于 β -Lg与半乳糖发生糖基化反应形成的糖基化产物在油水界面中亲水能力提高;与此同时,糖分子与蛋白质共价交联也提高蛋白质表面亲水性能,从而导致其表面疏水性显著降低。脉冲电场处理使蛋白结构展开,产生和暴露了更多的疏水性区域,因此表面疏水性升高。当脉冲场强增大到35 kV/cm时,使部分蛋白分子重新聚集,

造成表面疏水性下降。这与Marta等^[21]研究半乳糖修饰 β -Lg对其表面疏水性的影响结论一致。

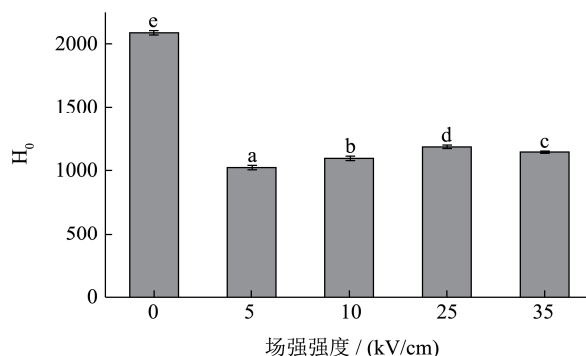


图3 PEF结合糖基化处理对 β -Lg表面疏水性的影响

Fig.3 Effects of the pretreatment combination of glycation with PEF on the surface hydrophobicity of β -Lg

注:小写字母不同表示差异显著($p < 0.05$)。

2.5 自由巯基含量分析

高压和加热等加工方法会导致巯基含量变化和二硫键的断裂,巯基可以被氧化形成二硫键,而二硫键在维持某些蛋白质的三级结构中发挥重要作用。由图4所示,随着PEF的场强增强,自由巯基含量呈先升高后下降的趋势。一方面,可能的原因是PEF处理蛋白质构象发生改变,暴露了更多的巯基基团,但自由巯基含量没有超过54.6 μ mol/g,说明蛋白构象只是发生部分去折叠^[22];另一方面,随着电场场强继续增强,PEF会加大对巯基基团的电离(-SH电离形成S-S),同时诱导部分蛋白发生聚合,巯基被包埋,导致自由巯基含量下降^[22]。

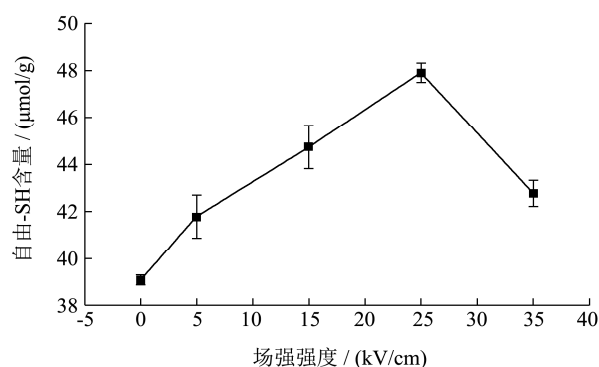


图4 PEF结合糖基化处理对 β -Lg自由巯基含量的影响

Fig.4 Effects of the pretreatment combination of glycation with PEF on the free SH contents of β -Lg

2.6 抗原性分析

图5所示为不同PEF结合糖基化处理对 β -Lg抗原性的影响。由图5可知,经PEF结合糖基化处理, β -Lg抗原性都有一定程度降低,且PEF预处理会促进

β -Lg 抗原性降低。当处理时间为 90 μ s 时, 随着 PEF 电场强度的增大, β -Lg 抗原性降低率呈先增加后降低, 在电场场强为 25 kV/cm 时抗原性降低程度最大, 降低了 72.9%。经 PEF 处理对 β -Lg 抗原性的影响, 随着 PEF 电场强度的增大, β -Lg 抗原性先增加后降低。根据试验对比发现, 脉冲电场协同糖基化改性 β -Lg 比脉冲电场或糖基化单一改性 β -Lg 有更好地降低 β -Lg 抗原性的效果。

过敏原蛋白的抗原性与蛋白的空间结构密切相关。据报道, 90% 的病人血清的过敏表位为 Val41-Trp60、Tyr102-Arg124 和 Leu149-Ile162, 是 β -Lg 的主要过敏表位^[23]。这3个过敏表位位于蛋白表面, 经过糖基化处理, 抗原表位被糖基结合修饰后, 导致抗原性下降。这也和内源性荧光强度和表面疏水性下降测定结果相符。从晶体结构上看, 肽段C端(149-162)的 α -螺旋结构易发生改变, 结合圆二色谱测定结果可知: α -螺旋结构发生改变, 含量减少。经过脉冲电场结合糖基化处理, 一方面, 糖与蛋白共价结合形成糖蛋白, 糖基的亲水性能使得蛋白表面活性增加, 加大了糖基和抗原表位结合程度; 另一方面, 随着 PEF 处理强度加大, 蛋白空间结构发生改变, 使得更多的抗原表位被包埋在分子内部, 导致抗原性降低。

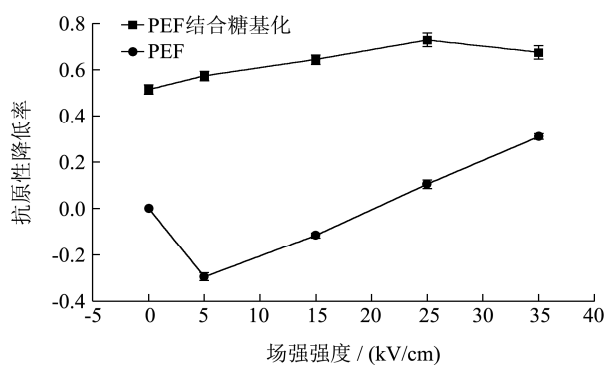


图5 PEF 和糖基化处理对 β -Lg 抗原性的影响

Fig.5 Effects of the pretreatment combination of glycation with PEF on the antigenicity of β -Lg

3 结论

综上所述, PEF 结合糖基化处理会使 β -Lg 的结构发生显著变化, 这使其抗原性也发生了显著的改变。用不同电场强度 (5~35 kV/cm) PEF 结合糖基化处理后, β -Lg 致敏位点被修饰和覆盖, 从而导致抗原性降低, 且 PEF 预处理会促进 β -Lg 抗原性降低。在 25 kV/cm、90 μ s 时抗原性降低程度最大, 降低了 72.9%。表明 PEF 结合糖基化处理对 β -Lg 抗原性有显著降低效果, 这为制备低致敏性 β -Lg 提供了一种新的方法, 也为食品过敏蛋白的脱敏技术研究及过敏蛋白资源的开

发提供理论基础。

参考文献

- [1] Frishe R, Adel-patient K, Bernard H. IgE-mediated rat mast cell triggering with tryptic and synthetic peptides of bovine β -lactoglobulin [J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2005, 138(4): 291-297
- [2] Enomoto H, Hayashi Y, Li C P, et al. Glycation and phosphorylation of α -lactalbumin by dry heating: Effect on protein structure and physiological functions [J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(7): 3057-3068
- [3] Li Z, Jiang M Z, You J, et al. Impact of Maillard reaction conditions on the antigenicity of parvalbumin, the major allergen in grass carp [J]. Food and Agricultural Immunology, 2014, 25(4): 486-497
- [4] Iwan M, Vissers Y M, Fiedorowicz E, et al. Impact of Maillard reaction on immunoreactivity and antigenicity of the hazelnut allergen Cor a 11 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(13): 7163-7171
- [5] Wu L, Zhao W, Yang R, et al. Pulsed electric field (PEF)-induced aggregation between lysozyme, ovalbumin and ovotransferrin in multi-protein system [J]. Food Chemistry, 2015, 175: 115-120
- [6] Abenoza M, Benito M, Saldaña G, et al. Effects of pulsed electric field on yield extraction and quality of olive oil [J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6(6): 1367-1373
- [7] Zhong J Z, Tu Y, Liu W, et al. Antigenicity and conformational changes of beta-lactoglobulin by dynamic high pressure microfluidization combining with glycation treatment [J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(8): 4695-4702
- [8] Lopez-Exposito I, Chicon R, Belloque J, et al. Changes in the ovalbumin proteolysis profile by high pressure and its effect on IgG and IgE binding [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(24): 11809-11811
- [9] 陶晓赞, 王寅, 陈健, 等. 高压脉冲电场对蓝莓汁杀菌效果及品质的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 94-97
TAO Xiao-yun, WANG Yin, CHEN Jian, et al. Effect of pulsed electric fields on sterilization and quality of blueberry juice [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(7): 94-97
- [10] Zhang Q T, Tu Z C, Wang H, et al. Improved glycation after ultrasonic pretreatment revealed by high-performance liquid chromatography-linear ion trap/orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2014, 148: 2522-2530

- [11] Zhang Q T, Tu Z C, Xiao H, et al. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate [J]. Food and Bioproducts Processing, 2014, 92(1): 30-37
- [12] Lucia de la Hoz, Flavia M. Netto. Structural modifications of β -lactoglobulin subjected to gamma radiation [J]. International Dairy Journal, 2008, 18(12): 1126-1132
- [13] Xiang B Y, Ngadi M O, Ochoa-Martinez L A, et al. Pulsed electric field-induced structural modification of whey protein isolate [J]. Food and Bioprocess Technology, 2011, 4(8): 1341-1348
- [14] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82(1): 70-77
- [15] Zhong J Z, Liu W, Liu C M, et al. Aggregation and conformational changes of bovine β -lactoglobulin subjected to dynamic high-pressure microfluidization in relation to antigenicity [J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(8): 4237-4245
- [16] Rahaman T, Vasiljevic T, Ramchandran L. Conformational changes of β -lactoglobulin induced by shear, heat, and pH-Effects on antigenicity [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(7): 4255-4265
- [17] Taheri-Kafrani A, Gaudin J C, Rabesona H, et al. Effects of heating and glycation of β -lactoglobulin on its recognition by ige of sera from cow milk allergy patients [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 4974-4982
- [18] Li Y, Chen Z, Mo H. Effects of pulsed electric fields on physicochemical properties of soybean protein isolates [J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(7): 1167-1175
- [19] Zhong J Z, Xu Y J, Liu W, et al. Antigenicity and functional properties of β -lactoglobulin conjugated with fructooligosaccharides in relation with conformational changes [J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(5): 2012-6259
- [20] 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
- [21] Corzo-Martinez M, Moreno F J, Olano A, et al. Structural characterization of bovine β -lactoglobulin-galactose/tagatose maillard complexes by electrophoretic, chromatographic, and spectroscopic methods [J]. Food Chemistry, 2008, 56(11): 4244-4252
- [22] Sava N, Van der Plancken I, Claeys W, et al. The kinetics of heat-induced structural changes of beta-lactoglobulin [J]. Dairy Sci., 2005, 88(5): 1646-1653
- [23] Zhong J Z, Liu C M, Liu W, et al. Effect of dynamic high-pressure microfluidization at different temperatures on the antigenic response of bovine β -lactoglobulin [J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(1): 95-102