

超声波辅助糖基化对 β -乳球蛋白消化过程中致敏性的影响

Effects of ultrasound-assisted glycation on the allergenicity of β -lactoglobulin during digestion

马秋平¹ 王 辉¹ 涂宗财^{1,2,3} 温平威¹ 胡月明¹

MA Qiu-ping¹ WANG Hui¹ TU Zong-cai^{1,2,3} WEN Ping-wei¹ HU Yue-ming¹

(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. 江西师范大学国家淡水鱼加工技术研发专业中心, 江西 南昌 330022; 3. 江西师范大学江西省淡水鱼高值化利用工程技术研究中心, 江西 南昌 330022)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China; 2. National R&D Center of Freshwater Fish Processing, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China; 3. Engineering Research Center of Freshwater Fish High-Value Utilization of Jiangxi Province, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China)

摘要:采用间接竞争 ELISA、扫描电镜和动态光散射等技术,研究超声波结合乳糖糖基化修饰对 β -乳球蛋白(β -Lg)在体外模拟消化过程中致敏性和结构变化的影响。结果表明:被修饰的 β -Lg 在消化过程中致敏性显著降低,胃肠消化的水解度也降低;被修饰的 β -Lg 经胃消化形成更大的颗粒结构,在肠消化中发生聚集;消化后其荧光强度先升高后降低,最大发射波长出现红移。综上,超声波结合糖基化改性可有效降低 β -Lg 在消化过程中的致敏性,其致敏性变化与糖基化修饰对其结构的改变有关。

关键词: β -乳球蛋白;致敏性;糖基化;超声波;消化特性

Abstract: The method of indirect competitive ELISA, scanning electron microscopy (SEM) and dynamic light scattering (DLS) were used to study the ultrasound-assisted glycation with lactose (UAG) on changes in allergenicity and structure of β -lactoglobulin (β -Lg) during digestion *in vitro*. The results showed that the allergenicity and the degree of hydrolysis of UAG modified β -Lg had a reduced during gastrointestinal digestion. Glycation limited β -Lg to form a smaller particle structure during gastric digestion, then aggregated during intestinal digestion. The fluorescence intensity first increased and then decreased, and the

maximum emission wavelength appeared red shift. These results indicated that UAG modification could effectively reduce the allergenicity of protein during digestion. The decrease of allergenicity was closely related to structural changes of UAG modification.
Keywords: β -lactoglobulin; allergenicity; glycation; ultrasound; digestive properties

食物过敏可引起免疫系统异常反应,当人体摄入食物过敏原后会引发一系列临床症状,包括皮肤、胃肠道和呼吸道^[1]。据报道^[2],全球儿童和成人的食物过敏患病率分别约为 7.5% 和 5.0%。牛奶是八大主要过敏原之一,牛奶过敏主要是 IgE 介导的 I 型过敏反应,主要是由牛奶中存在的 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -Lg)引起的^[3]。研究^[4]表明,超声波辅助糖基化改性是一种较为有效的降敏方法。它利用超声波的热效应、机械剪切力、空化作用、声冲流等力的协同作用^[5],改变蛋白质的结构,使还原糖能在温和、短时间内对蛋白质进行专一性修饰,生成结构明确的蛋白质修饰产物,可以避免剧烈条件下的糖基化反应导致副产物众多以及产生对健康不利的产物,是一种新型的食品蛋白质糖基化修饰技术^[6-7]。

课题组^[8-9]利用超声波辅助糖基化技术先后将核糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖等连接到卵清蛋白(OVA)、 β -Lg、乳白蛋白(α -La)等蛋白上,显著降低了被修饰蛋白的致敏性。毛积华等^[10]研究了不同己糖(果糖、葡萄糖、半乳糖)对 OVA 的糖基化修饰效应,其中半乳糖修饰的 OVA 糖基化程度最高,其致敏性最低。Zhong 等^[11]研究

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:21878135)

作者简介:马秋平,女,南昌大学在读硕士研究生。

通信作者:涂宗财(1965—),男,南昌大学教授,博士。

E-mail: tuzc_mail@aliyun.com

收稿日期:2021-02-07

表明超声波可以通过改变蛋白质结构进而显著提高糖化程度并增加牛血清蛋白的糖化位点,掩盖抗原表位从而降低其致敏性。Liu 等^[12]采用超声波辅助核糖糖基化修饰β-Lg,其致敏性下降了61.54%。然而,超声波辅助糖基化修饰的蛋白质进入人体后,需要经过胃和肠消化后才能被人体吸收,而蛋白质在整个消化过程中,胃蛋白酶和胰蛋白酶会通过酶切作用破坏其结构,可能会使消化产物的致敏性发生改变。

基于超声波辅助糖基化对β-Lg降敏的条件^[12],试验拟以β-Lg和乳糖(lactase)为原料,采用间接竞争ELISA法研究超声波结合糖基化修饰β-Lg在体外模拟消化过程中致敏性的变化,以水解度(DH)分析其消化特性,利用扫描电镜和动态光散射、荧光光谱等技术分析消化产物形态和结构的变化,以期科学评价超声波辅助糖基化修饰对蛋白质在消化过程中致敏性变化的影响,推动该技术在工业上的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

β-乳球蛋白(β-Lg):> 90%,美国Aldrich-sigma公司;
α-乳糖(≥ 98%)、4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐:上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

胃蛋白酶(2 500 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg):北京索莱宝科技有限公司;

兔抗牛乳IgG一抗、羊抗兔IgG-HRP、羊抗人IgE-HRP;美国Biocheck Inc公司;

牛乳过敏患者IgE血清:美国Plasmalab International公司;

试验用水皆为蒸馏水;
其他试剂皆为国产分析纯。

1.1.2 过敏患者血清池 IgE血清池由4个牛乳过敏患者的血清(P1~P4)组成,其基本信息见表1。

1.1.3 主要仪器设备

超声波细胞破碎仪:JY92-II N型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

粒度仪:Nano ZS90型,英国马尔文仪器有限公司;

扫描电镜:Regulus 8100型,日本日立高新技术公司;
荧光分光光度计:F-7000型,日本日立高新技术公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 参照文献^[12]。用超纯水溶解β-Lg样品成2 mg/mL,使用超声波细胞破碎仪以300 W处理15 min。以 $m_{\beta-Lg} : m_{乳糖}$ 为1:1混匀后冻干,相对湿度79%,55℃孵育4 h,冰浴终止,透析,冻干得糖基化样品,记作β-Lg-Lac-300,天然的β-Lg为对照品记作β-Lg-N。测得β-Lg-Lac-300样品的糖基化程度达52.14%。

1.2.2 模拟人体外胃肠消化 参照Minekus等^[13]的方法稍作修改,将样品和胃蛋白酶添加到胃消化液(SGF)中,两者添加量分别为2 mg/mL和2 000 U/mL。调节溶液pH至3.0。在SGF中消化60 min后,使用模拟肠消化液(SIF)消化样品,样品和胰蛋白酶的添加量分别为1 mg/mL和100 U/mL。分别在胃、肠消化0,15,30,60,90,120 min后取出1 mL,调节溶液pH至6.5以终止胃消化,添加4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐使终浓度为4 mmol/L以终止肠消化。所有样品均于-20℃贮藏,并在一周内使用。样品β-Lg-N、β-Lg-Lac-300经SGF消化60 min分别记为β-Lg-N-G、β-Lg-Lac-300-G;再经SGF消化60 min分别记为β-Lg-N-GI、β-Lg-Lac-300-GI。

1.2.3 消化率测定 采用邻苯二甲醛(OPA)的方法^[14]。以赖氨酸为标准品绘制标准曲线,样品质量浓度为1 mg/mL,于340 nm处测定吸光度。按式(1)计算消化率。

$$D_H = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% = \frac{(A_1 - A_0) \times 1\,000}{K \times M_w \times b \times h_{tot}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:
 D_H ——消化率,%;
 h ——水解后每克蛋白质裂解的肽键数;
 h_{tot} ——每克蛋白质的肽键数;
 A_0 ——未消化样品的吸光度值;
 A_1 ——消化样品的吸光度值;
 K ——赖氨酸标准曲线的斜率;
 M_w ——赖氨酸的分子量,g/mol;
 b ——样品质量浓度,mg/mL。

1.2.4 IgG/IgE结合能力测定 采用间接竞争ELISA评估所有样品的IgG/IgE结合能力,结合能力越低致敏性越低。96孔板用100 μL质量浓度为4 μg/mL的β-Lg溶液包被,37℃孵育1 h;加入250 μL质量分数为1%鱼明胶溶液封闭1 h;加入50 μL质量浓度为32 μg/mL待测样品,再加入50 μL IgG血清($V_{IgG} : V_{血清} = 1 : 320\,000$)或者人血清(稀释至 $V_{人血清} : V_{水}$ 为1:32),孵育1 h;加入100 μL IgG-HR或IgE-HRP($V_{IgG} : V_{HRP} = 1 : 5\,000$)二抗,孵育1 h;加入100 μL TMB染色液,孵育15 min,加

表1 牛奶过敏患者信息

Table 1 Information of cow's milk allergic sufferers

编号	性别	年龄	主要症状	IgE/ (kU·L ⁻¹)
P1	女	38	过敏性鼻炎;始于婴幼儿时期	85.10
P2	男	30	过敏性鼻炎;始于6岁	91.00
P3	男	19	过敏性鼻炎;始于婴幼儿时期	11.50
P4	女	47	荨麻疹、湿疹;始于12岁	9.58

入 50 μL 硫酸(2 mol/L)终止反应。于 450 nm 下测量样品吸光度。按式(2)计算 IgG/IgE 结合能力

$$B = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

B ——IgG/IgE 结合能力, %;

A ——待测样品的吸光度值;

A_0 ——用样品稀释液代替样品的吸光度值。

1.2.5 扫描电镜 轻铺一层样品于导电片上, 喷金后置于扫描电镜下进行形貌表征。加速电压 5 000 V, 发射电流 9.6 μA 。

1.2.6 粒径测定 参照 Pinto 等^[15]的方法, 将消化后的样品稀释成 0.25 mg/mL, 采用马尔文激光粒度仪检测其粒径。样品于 20 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 2 min, 每个样品扫描 3 次取平均值。

1.2.7 电位分析 将消化后的样品稀释成 0.25 mg/mL, 散射角 90 $^{\circ}$, 平衡时间 120 s, 测试温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 连续测试 3 次取平均值。

1.2.8 荧光光谱测定 使用荧光光谱仪测量样品的本征荧光强度, 样品浓度为 0.4 mg/mL。内源荧光: 激发波长 280 nm, 扫描速度 1 200 nm/min, 扫描范围, 300 ~ 420 nm。同步荧光: 激发与发射波长间隔 $\Delta\lambda$ 分别为 15, 60 nm, 其他条件同同步荧光^[10]。

1.2.9 统计学分析 所有试验均重复 3 次, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS 23.0、Origin 9.0 软件进行数据分析和制图。

2 结果与分析

2.1 超声波辅助糖基化对 β -Lg 消化率的影响

由图 1 可知, 胃消化阶段, β -Lg-Lac-300 的消化率低于 β -Lg-N 的, 随着消化时间的延长, β -Lg-N 的消化率增加较 β -Lg-Lac-300 快; 胃消化 60 min 后, β -Lg-N 的消化率仍增加, 而 β -Lg-Lac-300 的消化率趋于稳定, 表明超声

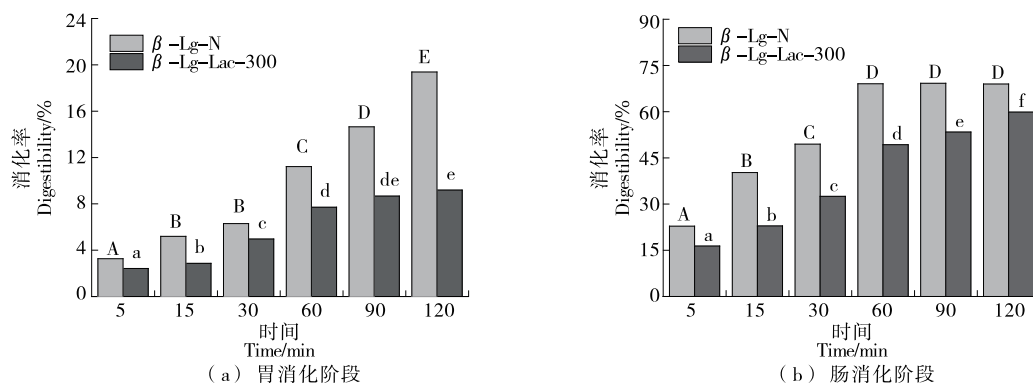
波辅助糖基化显著降低了胃消化率。肠消化阶段, 肠消化 60 min 后, β -Lg-N 达到消化终点, 消化率为 68.81%, 而 β -Lg-Lac-300 在 60 min 时的消化率为 48.29%, 120 min 时的达到 59.85%, 表明超声辅助糖基化减慢了 β -Lg 的肠消化速率。这可能是因为胃蛋白酶优先作用于苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)残基, 而这些氨基酸残基不能被糖基化修饰^[16]。但糖基化对赖氨酸(Lys)和精氨酸(Arg)残基的修饰, 阻断了胰蛋白酶的作用位点^[17]。同时, 糖基化会降低酪蛋白、乳球蛋白、鲑鱼小清蛋白等蛋白的消化率^[15, 18]。

2.2 IgG/IgE 结合能力

由图 2 可知, IgG/IgE 结合能力随消化时间的延长而降低, 且 β -Lg-Lac-300 的 IgG/IgE 结合能力显著低于 β -Lg-N 的, 二者在肠消化阶段降低较胃消化阶段的快; 胃消化 60 min 后, β -Lg-N 和 β -Lg-Lac-300 的 IgG/IgE 结合能力分别降为 10.23%, 8.31%; 肠消化 60 min 后, β -Lg-N 和 β -Lg-Lac-300 的 IgG/IgE 结合能力分别降为 42.09%, 32.09%, 说明超声波辅助糖基化可有效降低 β -Lg 在消化过程中的致敏性。糖基化可通过掩盖或破坏蛋白质分子的过敏表位来降低其致敏性^[19], 参与胃肠道消化的胃蛋白酶和胰蛋白酶则通过酶切作用破坏蛋白质的过敏表位, 与文献^[20]的结论相似。

2.3 扫描电镜

由图 3 可知, 天然的 β -Lg 为平整的片状颗粒, 有裂纹; 经超声糖基化修饰后变得光滑而致密, 裂纹消失, 这可能是因为糖基化反应使蛋白表面被乳糖覆盖。而胃消化后, β -Lg-N 表面出现大的孔洞, 结构变得松散; 经肠消化后进一步分解成颗粒和纤维絮状, 但结构变得密集。而 β -Lg-Lac-300 经胃消化后形成的颗粒状结构大于 β -Lg-N 的, 表面未出现大的孔洞; 经肠消化后表面出现孔洞, 颗粒状结构仍大于 β -Lg-N 的, 说明超声波辅助糖基化诱导的蛋白质聚集增加了 β -Lg 的胃肠消化抗性, 与致



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 1 β -Lg-N 和 β -Lg-Lac-300 的消化率变化

Figure 1 Digestibility of β -Lg-N and β -Lg-Lac-300 under different digestion times

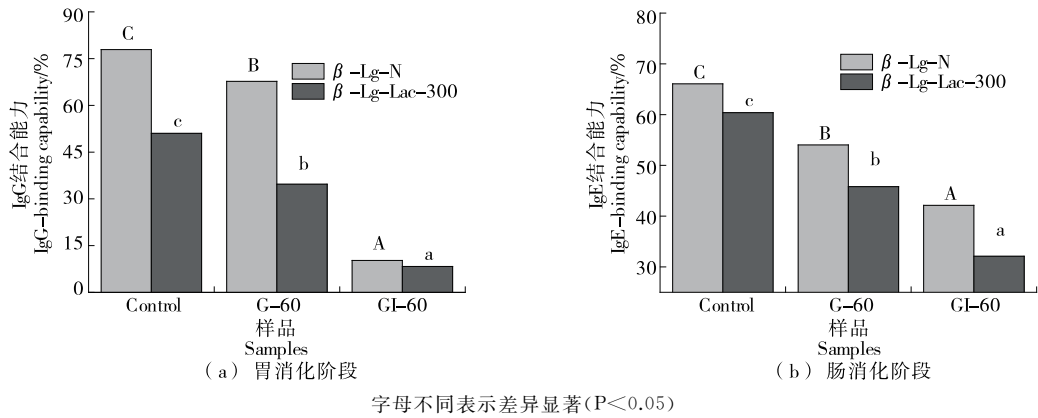


图2 β -Lg-N 和 β -Lg-Lac-300 的 IgG/IgE 结合能力

Figure 2 The IgG/IgE binding capacity of digested products of β -Lg-N and β -Lg-Lac-300

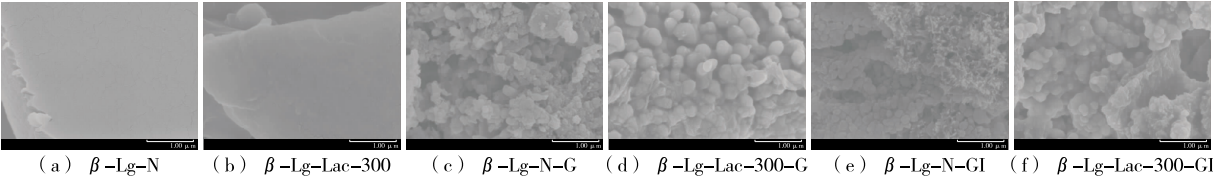


图3 β -Lg-N 和 β -Lg-Lac-300 消化产物的扫描电镜图

Figure 3 Scanning electron micrographs of digested products of β -Lg-N and β -Lg-Lac-300($\times 30\ 000$)

敏性的降低有关,与 Corzo-Martínez 等^[21]的结果相似。而糖基化过程中导致的构象破坏,可增加蛋白质的水解作用,这种明显的差异可能与蛋白种类和糖基化反应的程度有关^[22]。

2.4 粒径和 ζ -电位

由表 2 可知,经超声糖基化处理后, β -Lg 的平均直径从 533 nm 增加到 578 nm,粒径分布系数增大,但其电位绝对值减小;证明超声糖基化处理改变了 β -Lg 的结构,降低了其分散性,这可能与糖基化导致的 β -Lg 结构的卷曲有关^[15]。经胃肠消化后, β -Lg 和 β -Lg-Lac-300 的直径均先减小后增大, β -Lg-Lac-300 的胃消化产物粒子直径大于 β -Lg-N 的;肠消化后 β -Lg-Lac-300 粒子直径异常增大,PDI 达到 0.928;而 β -Lg-Lac-300 的电位绝对值均小于 β -Lg-N 的。综上,胃消化后的产物经肠消化后发生聚集,超声糖基化对蛋白水解作用的抑制使 β -Lg-Lac-300 以更大的粒径存在,分散性变差,可能是因为肠消化液的弱碱性环境,诱导这些带正电荷的碎片与周围带负电荷的环境发生非共价键聚合^[23]。且糖基化增加了粒子之间的静电引力,蛋白质分子间静电引力的增加会减弱粒子间的疏水相互作用^[24],与扫描电镜的结果一致。因此,超声波辅助糖基化修饰最有可能是通过改变蛋白质聚集体的结构,而不是通过阻断酶促反应的切割位点来降低胃消化阶段 β -Lg 的消化率和致敏性^[25]。同时,由超声波辅助糖基化修饰引起的空间位阻和静电相互作用的增加,可能不仅阻碍了蛋白质的聚集过程,而且还阻碍了胃蛋

表 2 β -Lg-N 和 β -Lg-Lac-300 消化产物的粒径分布和 ζ -电位

Table 2 The particle size distribution and ζ -potential of digested products in β -Lg-N and β -Lg-Lac-300

样品	平均粒径/nm	PDI	ζ -电位/mV
β -Lg-N	533.3 $\pm$ 22.5	0.57 $\pm$ 0.11	-34.50 $\pm$ 0.57
β -Lg-N-G	101.0 $\pm$ 2.12	0.24 $\pm$ 0.01	-28.90 $\pm$ 3.00
β -Lg-N-GI	413.7 $\pm$ 56.4	0.43 $\pm$ 0.10	-8.31 $\pm$ 0.38
β -Lg-Lac-300	577.8 $\pm$ 97.7	0.62 $\pm$ 0.23	-7.42 $\pm$ 3.64
β -Lg-Lac-300-G	154.1 $\pm$ 32.7	0.35 $\pm$ 0.07	-28.50 $\pm$ 2.84
β -Lg-Lac-300-GI	2 756.0 $\pm$ 121.0	0.93 $\pm$ 0.13	-2.54 $\pm$ 0.76

白酶和胰蛋白酶活性中心与消化底物之间的结合方式,从而影响机体对过敏位点的识别^[26]。

2.5 荧光光谱

由图 4 可知,与 β -Lg-N 相比, β -Lg-Lac-300 的荧光强度峰值降低,最大发射波长发生红移,从 342 nm 处移至 366 nm 处。胃肠消化后,荧光强度峰值呈先升高后降低的趋势,其中 β -Lg-N 肠消化后荧光强度峰值最低,且均出现红移,但红移程度不及 β -Lg-Lac-300 样品。这表明糖基化后 β -Lg 的 Tyr 残基所处微环境的亲水性增加,消化过程中 β -Lg-N 与 β -Lg-Lac-300 肽链的结构展开,内部的 Trp 残基逐渐暴露,消化产物的 Tyr 残基的疏水性增加,肽段的重新聚合又使 Trp 残基逐渐被掩埋^[27]。说明

β -Lg-Lac-300 致敏性下降主要是因为乳糖对其线性表位的修饰,而随消化时间的延长,构象表位被破坏,其线性表位也不断减少,但在消化末期仍保持一定致敏性,说明小分子短肽的特殊序列依然会使机体对蛋白过敏。

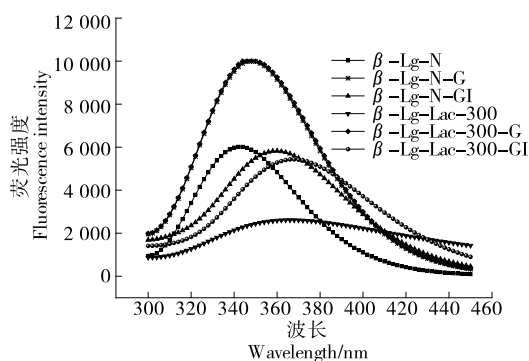


图 4 β -Lg-N 和 β -Lg-Lac-300 消化产物的内源荧光光谱
Figure 4 Intrinsic fluorescence spectra of digestive products in β -Lg-N and β -Lg-Lac-300

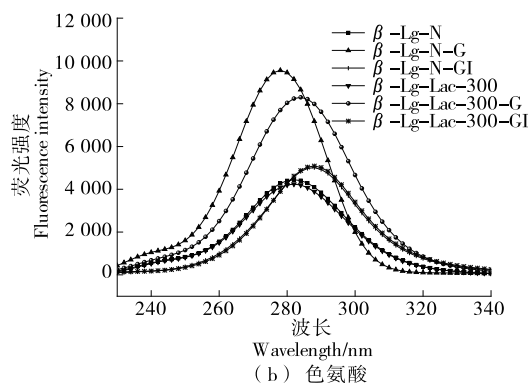
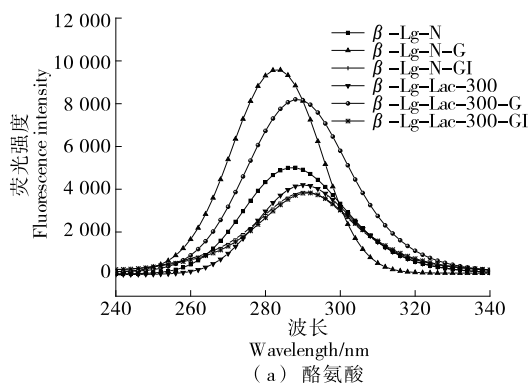


图 5 β -Lg-N 和 β -Lg-Lac-300 消化产物的同步荧光光谱

Figure 5 Synchronous fluorescence spectra of digestive products in β -Lg-N and β -Lg-Lac-300

3 结论

试验表明,超声波结合糖基化处理对 β -Lg 肠胃消化性及消化过程中的致敏产生了显著影响。胃消化 60 min 后产物的 IgG/IgE 结合能力迅速降低,且在胃肠消化 120 min 时最低,其胃肠消化的水解度也降低。被修饰的 β -Lg 经胃消化形成了更大的颗粒结构,并在肠消化后期发生聚集;其荧光强度呈先升高后降低的趋势并伴有红移。综上,超声波结合糖基化改性可有效降低 β -Lg 在消化过程中的致敏性, β -Lg 致敏性的变化与超声波辅助糖基化修饰对其结构的改变有关。后续应利用蛋白质组学、质谱学、细胞学等技术,鉴别超声波辅助糖基化 β -Lg 的糖基化位点以及消化后的致敏肽段,以期实现该技术的工业化应用。

参考文献

[1] CARRARD A, RIZZUTI D, SOKOLLIK C. Update on food

同步荧光光谱中, $\Delta\lambda$ 为 15 nm 时表征的是酪氨酸的同步荧光光谱, $\Delta\lambda$ 为 60 nm 时则是色氨酸^[28]。由图 5 可知,与 β -Lg-N 相比,糖基化后 β -Lg-Lac-300 的 Tyr 荧光强度均降低并伴有红移,Trp 的荧光强度未明显改变。胃消化后,两者的 Tyr 和 Trp 荧光强度升高,并出现蓝移;肠消化后,两者的荧光强度降低并出现轻微的红移。说明消化过程中,Tyr 和 Trp 微环境的疏水性先增强后逐渐减弱成亲水,并产生了从 Tyr 到 Trp 残基的能量转移^[29]。这可能是由于消化过程中蛋白质结构被破坏,暴露了最初被非极性氨基酸包围的 Tyr 和 Trp 残基,使其环境从弱极性变成强极性,而消化后期小分子肽段的聚集又使得 Tyr 和 Trp 残基被掩蔽,其极性也随之减弱^[30]。而且糖基化干预了胃蛋白酶和胰蛋白酶对 β -Lg 三级结构的破坏,与扫描电镜、粒径结果一致。说明糖基化对 β -Lg 线性表位的修饰加上消化酶对其构象表位的破坏显著降低了 β -Lg 致敏性,也进一步说明了超声波结合糖基化是降低 β -Lg 致敏性较为有效的方法。

allergy[J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2016, 70(12): 1 511-1 520.

[2] DISEASES N. Food Allergy-an overview[J]. Environmental Health Perspectives, 2012, 111(2): 223-225.

[3] HULSHOF L, SCHOEMAKER A A, PETRUS N C M, et al. Re: Oral desensitization as a useful treatment in 2-year-old children with cow's milk allergy[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2011, 41(12): 1 815-1 818.

[4] IKEUCHI T, AOKI T, YOSHIDA T, et al. Functional improvements to beta-lactoglobulin by preparing an edible conjugate with cationic saccharide using microbial transglutaminase (MTGase) [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(5): 1 227-1 234.

[5] JONATHAN O, SULLIVAN A C, BRIAN MURRAY B, et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 53: 141-154.

- [6] MILKOVSKA-STAMENOVA S, HOFFMANN R. Influence of storage and heating on protein glycation levels of processed lactose-free and regular bovine milk products[J]. Food Chemistry, 2017, 221(15): 489-495.
- [7] 贾本盼, 袁晓金, 范智义, 等. 面包皮中水溶性晚期糖基化终产物对人肾小管上皮细胞的氧化损伤[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 136-141.
- [8] MA Shuang, WANG Cui-na, GUO Ming-ruo. Changes in structure and antioxidant activity of beta-lactoglobulin by ultrasound and enzymatic treatment[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2018, 43: 227-236.
- [9] ZHANG Nan-hai, TU Zong-cai, WANG Hui, et al. Liquid chromatography high-Resolution mass spectrometry identifies the glycation sites of bovine serum albumin induced by d-ribose with ultrasonic treatment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(3): 563-570.
- [10] 毛积华, 王辉, 涂宗财, 等. 己糖修饰的糖基化卵清蛋白产物及其致敏性分析[J]. 食品与机械, 2020, 36(6): 11-15.
- [11] SONG Chun-li, ZHAO Xin-huai. Structure and property modification of an oligochitosan-glycosylated and crosslinked soybean protein generated by microbial transglutaminase[J]. Food Chemistry, 2014, 163(15): 114-119.
- [12] LIU Guang-xian, TU Zong-cai, YANG Wen-hua, et al. Investigation into allergenicity reduction and glycation sites of glycated beta-lactoglobulin with ultrasound pretreatment by high-resolution mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2018, 252(11): 99-107.
- [13] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food: An international consensus[J]. Food Function, 2014, 5(6): 1113-1124.
- [14] 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.
- [15] PINTO M S, LÉONIL J, HENRY G, et al. Heating and glycation of β -lactoglobulin and β -casein: Aggregation and in vitro digestion[J]. Food Research International, 2014, 55: 70-76.
- [16] KIM S B, KI K S, KHAN M A, et al. Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(9): 4043-4050.
- [17] LI Bo-wen, MO Ling, YANG Yu-hui, et al. Processing milk causes the formation of protein oxidation products which impair spatial learning and memory in rats[J]. RSC Advances, 2019, 9(39): 22161-22175.
- [18] 张敏, 涂宗财, 王辉, 等. 糖基化鳕鱼小清蛋白消化过程中的致敏性[J]. 食品与机械, 2020, 36(6): 16-22.
- [19] PERUSKO M, VAN ROEST M, STANIC-VUCINIC D, et al. Glycation of the major milk allergen beta-lactoglobulin changes its allergenicity by alterations in cellular uptake and degradation[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62(17): e1800341.
- [20] ZHAO Di, LI Lin, LE T T, et al. Digestibility of glycated milk proteins and the peptidomics of their in vitro digests[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2019, 99(6): 3069-3077.
- [21] CORZO-MARTÍNEZ M, SORIA A C, BELLOQUE J, et al. Effect of glycation on the gastrointestinal digestibility and immunoreactivity of bovine β -lactoglobulin[J]. International Dairy Journal, 2010, 20(11): 742-752.
- [22] YEBOAH F K, ALLI I, YAYLAYAN V, et al. Effect of limited solid-state glycation on the conformation of lysozyme by ESI-MS/MS peptide mapping and molecular modeling[J]. Bioconjugate Chemistry, 2004, 15(1): 27-34.
- [23] YAN Yun-feng, SEEMAN D, ZHENG Bing-qian, et al. pH-dependent aggregation and disaggregation of native β -Lactoglobulin in low salt[J]. Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids, 2013, 29(14): 4584-4593.
- [24] PERAM M R, LOVEDAY S M, YE A, et al. In vitro gastric digestion of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(1): 63-74.
- [25] MICHELE D S P, BOUHALLAB S D, DE CARVALHO A F, et al. Glucose slows down the heat-induced aggregation of β -lactoglobulin at neutral pH[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(1): 214-219.
- [26] LIU Gang, ZHONG Qi-xin. Glycation of whey protein to provide steric hindrance against thermal aggregation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(38): 9754-9762.
- [27] PALLARÈS I, VENDRELL J, AVILÉS F X, et al. Amyloid fibril formation by a partially structured intermediate state of α -chymotrypsin[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 342(1): 321-331.
- [28] REN Guo-yan, SUN He, GUO Jin-ying, et al. Molecular mechanism of the interaction between resveratrol and trypsin via spectroscopy and molecular docking[J]. Food Function, 2019, 10(6): 3291-3302.
- [29] FEYZI S, VARIDI M, ZARE F, et al. Effect of drying methods on the structure, thermo and functional properties of fenugreek (*trigonella foenum graecum*) protein isolate[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2017, 98(5): 1880-1888.
- [30] JING Jian, QU Xin, TU Zhi, et al. Spectroscopic investigations of the interaction of the antihypertension drug valsartan with human serum albumin[J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 9(6): 2191-2196.