

高压脉冲电场对  $\beta$ -乳球蛋白结构和抗原性的影响涂宗财<sup>1,2\*</sup>, 李雪<sup>1</sup>, 王辉<sup>1</sup>, 杨文华<sup>1</sup>, 田明<sup>1</sup>, 马达<sup>1</sup>

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** 采用电泳、圆二色谱、荧光光谱及酶联免疫吸附法, 研究不同高压脉冲电场(pulsed electric fields, PEF)处理条件对  $\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -lactoglobulin,  $\beta$ -Lg)结构和抗原性的影响。结果表明: PEF 处理对  $\beta$ -Lg 分子质量无明显影响, 但对其二级结构、三级结构和抗原性有显著影响, 且其抗原性变化与结构变化密切相关。 $\beta$ -Lg 的  $\beta$ -折叠含量、内源性荧光强度、表面疏水性和抗原性均随处理时间的延长呈先增加后降低的趋势, 且均在 25kV/cm 处理 30 $\mu$ s 的条件下达到最大值, 此时抗原性为 1 344 $\mu$ g/mL。同时, 当处理时间为 210 $\mu$ s 时,  $\beta$ -Lg 的抗原性降低了约 58%。这表明, PEF 为制备低过敏性  $\beta$ -Lg 提供了一种潜在的新方法。

**关键词** 脉冲电场;  $\beta$ -乳球蛋白; 抗原性; 酶联免疫吸附法; 结构

$\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -lactoglobulin,  $\beta$ -Lg)是牛乳中一种优质的蛋白质, 约占牛乳清蛋白含量的 50%, 由于其具有最佳的氨基酸比例, 能够与脂溶性维生素和脂肪酸结合, 因此可以作为  $V_A$  等脂溶性营养物质的载体应用于低脂或无脂食品中<sup>[1]</sup>。但  $\beta$ -Lg 是引起牛乳过敏(cow's milk allergy, CMA)的主要过敏原, 约 82% 的 CMA 患者对  $\beta$ -Lg 过敏<sup>[2]</sup>。对于以牛乳为主要食物的婴幼儿来说,  $\beta$ -Lg 过敏会严重影响婴幼儿对牛乳中营养成分的吸收, 导致婴幼儿生长发育不良。

近年来, 国内外学者采用多种加工方法对牛乳过敏原  $\beta$ -Lg 的抗原性进行研究。STANIC 等<sup>[3]</sup>研究了高强度超声波对  $\beta$ -Lg 过敏原性和结构的影响, 发现超声波处理不会增加  $\beta$ -Lg 的过敏原性, 是一种安全的处理手段。GRAR 等<sup>[4]</sup>采用微波辐射技术对  $\beta$ -Lg 进行改性, 并研究不同 pH 条件下微波辐射对  $\beta$ -Lg 抗原性的影响, 研究表明在 pH 4.6 时  $\beta$ -Lg 具有最低的抗原性。ZHONG 等<sup>[5]</sup>研究发现动态高压微射流技术(0.1 ~ 160MPa)会不同程度的增加  $\beta$ -Lg 的抗原性。以上研究表明, 食品加工方法会不同程度的影响  $\beta$ -Lg 的抗原性。

高压脉冲电场(pulsed electric fields, PEF)是一种新型的非热食品加工技术, 具有处理温度低、能耗

少、污染小等特点, 同时能最大程度的保持食品中固有的营养成分、色泽、质构以及新鲜度<sup>[6]</sup>, 因此, PEF 技术引起了人们越来越多的关注。目前, PEF 在食品加工领域的研究主要包括杀菌、钝酶、物质提取、酒类催陈、农药残留降解等<sup>[7-11]</sup>。然而, PEF 技术对食品中蛋白质的研究主要集中在其功能性质(如胶凝性<sup>[12]</sup>、起泡性<sup>[13]</sup>、乳化性<sup>[14]</sup>和流变性<sup>[15]</sup>等)的研究, 对过敏原蛋白抗原性方面的研究甚少。JOHNSON 等报道<sup>[16]</sup>, PEF 处理会导致食品中过敏原蛋白结构发生一系列的变化, 而过敏原蛋白的空间结构变化可能会影响其免疫特性的改变, 因此本文以  $\beta$ -Lg 为研究对象, 探究不同 PEF 处理条件对  $\beta$ -Lg 空间结构和抗原性的影响, 并且研究了  $\beta$ -Lg 抗原性变化与其结构变化之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

$\beta$ -Lg(L3908)、鱼皮明胶和羊抗兔酶标二抗, 购于美国 Sigma 公司; 兔抗  $\beta$ -Lg 血清, 为实验室自制; 8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB, 2HCl)和电泳 Marker(14.4-97.4kDa)等, 购于阿拉丁试剂有限公司。

### 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; HF2000 酶标分析仪, 北京华安麦科; Bio-Logic MOS 450 CD 圆二色谱仪, 法国 Bio-

第一作者: 博士, 教授(本文通讯作者, E-mail: tuzc\_mail@aliyun.com)。

基金项目: 非热加工控制食物过敏原蛋白致敏性的脱敏制备关键技术(2013AA102205)国家 863 项目子课题

收稿日期: 2015-09-22, 改回日期: 2015-10-27

Logic 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 PEF 处理

将  $\beta$ -Lg 用 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PBS) 配成 1 mg/mL 的溶液, 在 PEF 电场强度为 25 kV/cm 下分别处理 0、30、90、150、210  $\mu$ s。波形为单极性方波, 每种处理条件下取 3 个平行样。电场强度  $E$  和总处理时间  $t$  的计算方法<sup>[17]</sup> 见公式:

$$E = \frac{U}{d} \quad (1)$$

$$t = \frac{n \times V \times f \times W}{v} \quad (2)$$

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,  $\mu$ s;  $v$ , 流速, mL/s。

#### 1.3.2 分子质量分析

参照 ZHANG 等<sup>[18]</sup> 的方法, 采用 12% 的分离胶, 5% 的浓缩胶, 4  $\times$  上样缓冲液 (含  $\beta$ -巯基乙醇), 上样量为 8  $\mu$ L, 低分子质量 Marker (14.4 ~ 97.4 kDa)。实验初始电流为 8 mA/板, 进入分离胶后, 调整为 16 mA/板, 分离后取出, 用考马斯亮蓝 G250 染色 30 min, 然后于 7% 的冰乙酸中进行脱色, 直至背景清晰。

#### 1.3.3 圆二色谱分析

$\beta$ -Lg 的二级结构采用 Bio-Logic MOS 450 圆二色谱仪进行测定。用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 稀释不同条件 PEF 处理的  $\beta$ -Lg 至 0.2 mg/mL。参照 LUCIA 等<sup>[19]</sup> 的方法, 测定条件: 光径 0.1 cm 样品池, 扫描速度 100 nm/min, 扫描范围 190 ~ 250 nm, 带宽 1.0 nm。每个样品测量 3 次, 圆二色谱的测量值用椭圆率表示 ( $\theta$ ; degree.  $\text{cm}^2/\text{dmol}$ ), 最终结果通过圆二在线分析软件 dichroweb 进行分析 (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>)。

#### 1.3.4 内源性荧光测定

用 F-7000 荧光光谱仪测定不同处理时间对  $\beta$ -Lg 荧光强度的影响。参照 LUCIA 等<sup>[19]</sup> 的方法, 测定条件: 激发波长为 280 nm, 扫描发射波长范围为 300 ~ 450 nm, 激发和发射的狭缝宽度均为 5 nm, 扫描速度为 1 200 nm/min, 电压为 400 V。

#### 1.3.5 表面疏水性测定

采用 ANS 荧光探针法测定不同 PEF 处理条件下  $\beta$ -Lg 表面疏水性的变化。将蛋白样品用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 倍比稀释成 1、0.5、0.25 mg/mL, 取 4 mL

稀释后的蛋白样品与 20  $\mu$ L 8 mmol/L ANS 溶液 (0.01 mol/L, pH 7.4) 混合后, 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 1 200 nm/min, 激发和发射的狭缝宽度均为 10 nm, 电压为 400 V。以蛋白浓度 (mg/mL) 为横坐标, 荧光强度为纵坐标作图, 采用线性回归分析进行曲线拟合, 曲线的斜率即为蛋白样品的表面疏水性 ( $H_0$ )<sup>[20]</sup>。

#### 1.3.6 抗原性评估

采用间接竞争酶联免疫吸附法测定样品的抗原性。在 96 酶标板中每孔包被 100  $\mu$ L 2  $\mu$ g/mL 的  $\beta$ -Lg 标准品, 4  $^{\circ}\text{C}$  12 h。加入质量分数为 1% 的鱼皮明胶封闭液, 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 1 h。依次加入 50  $\mu$ L 不同浓度的  $\beta$ -Lg 标准品以及 50  $\mu$ L 15  $\mu$ g/mL 不同条件 PEF 处理的样品, 再加入 50  $\mu$ L 兔抗  $\beta$ -Lg 血清 (血清稀释度为 1:50 000), 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 1 h。每孔加入 100  $\mu$ L 羊抗兔酶标二抗 (酶标二抗稀释度为 1:10 000), 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 1 h, 每步操作之后均用 PBST 溶液 (含 0.05% 吐温-20 的 pH 7.4 0.01 mol/L PBS) 洗板 3 次并扣干。用 TMB 底物显色, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光反应 15 min, 最后用 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液终止反应, 于 450 nm 处测其吸光值<sup>[5,21]</sup>。以  $\beta$ -Lg 标准品浓度 (0.5 ~ 64  $\mu$ 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  $\beta$ -Lg 样品的抗原性 ( $\mu$ g/mL)。

#### 1.3.7 数据统计与分析

本实验所有实验重复 3 次, 所得实验数据采用 Origin 7.5 软件作图, SPSS 17.0 软件进行显著性分析 ( $P < 0.05$ )。

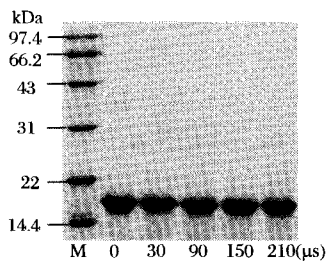
## 2 结果与分析

### 2.1 分子质量分析

过敏原蛋白经过许多物理手段 (如热处理、辐射等) 处理后, 其分子质量可能会发生改变<sup>[22-23]</sup>。 $\beta$ -Lg 单体由 162 个氨基酸组成, 分子质量为 18.4 kDa, 图 1 为 PEF 处理对  $\beta$ -Lg 分子质量的影响。根据图 1 的标准蛋白电泳图可以看出, 与未处理的  $\beta$ -Lg 相比, 经 PEF 处理的样品电泳条带无明显变化, 说明在 PEF 25 kV/cm 处理 0 ~ 210  $\mu$ s 的条件下,  $\beta$ -Lg 的分子质量不会发生改变。

### 2.2 圆二色谱分析

圆二色谱可以用来检测过敏原蛋白的二级结构, 解析 PEF 对过敏原蛋白二级结构的影响。表 1 所示

图1 PEF处理对 $\beta$ -Lg分子质量的影响Fig. 1 Effects of PEF on the molecular weight of  $\beta$ -Lg

是通过 Bio-Logic MOS 450 圆二色谱仪测定的不同 PEF 处理对  $\beta$ -Lg 二级结构各组分含量的影响。由表 1 可以看出, PEF 处理对  $\beta$ -Lg 二级结构的各组分含量有显著影响, 其中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠随处理时间的延长呈先增加后降低的趋势, 而  $\beta$ -转角和无规则卷曲呈先降低后增加的趋势。过敏原  $\beta$ -Lg 是以  $\beta$ -折叠为主的高度结构化的球蛋白, 在其三维结构中包含

表1 PEF处理对 $\beta$ -Lg二级结构各组分含量的影响Table 1 Effect of PEF on the content (%) of  $\beta$ -Lg secondary structure

蛋白样品	二级结构组成/%			
	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规则卷曲
0	16.32 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	33.22 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	20.62 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	29.85 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>
25 kV/cm 30 $\mu$ s	19.40 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	39.38 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	17.40 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	23.82 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
25 kV/cm 90 $\mu$ s	19.76 $\pm$ 1.47 <sup>b</sup>	38.63 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>	17.05 $\pm$ 0.59 <sup>b</sup>	24.56 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>
25 kV/cm 150 $\mu$ s	14.02 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	36.21 $\pm$ 0.30 <sup>d</sup>	20.52 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	29.31 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
25 kV/cm 210 $\mu$ s	13.08 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>	32.93 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	22.08 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup>	31.86 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>

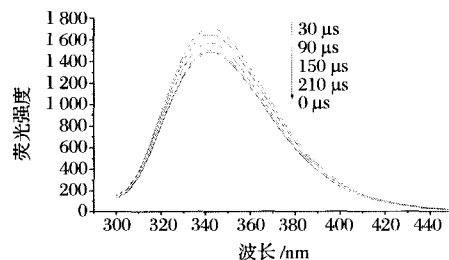
注: 实验结果以平均值  $\pm$  标准偏差表示 ( $n=3$ ), 同列不同小写字母代表具有显著性差异 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 内源性荧光分析

内源荧光光谱是检测过敏原蛋白质三级结构的常用方法。 $\beta$ -Lg 的内源荧光主要来源于色氨酸残基 (Trp), 它对微环境的变化很敏感, 因此可以用 Trp 残基作为  $\beta$ -Lg 的内源荧光探针来分析蛋白结构的变化<sup>[20]</sup>。图 2 为不同条件 PEF 处理对  $\beta$ -Lg 内源性荧光强度的影响。

由图 2 可知, PEF 处理会增加  $\beta$ -Lg 的荧光强度, 且呈先增大后降低的趋势, 在 25 kV/cm 30  $\mu$ s 时荧光强度达到最大。这可能是由于 PEF 的电场作用使蛋白质的静电相互作用、氢键、疏水相互作用等发生变化, 紧密的立体结构变得松散,  $\beta$ -Lg 中的 2 个 Trp 残基 (Trp19 和 Trp61 残基) 更多的暴露于极性环境中, 从而荧光强度增加, 并在处理时间为 30  $\mu$ s 时达到最大。而随着处理时间继续延长, 荧光强度有降低的趋势, 这可能是因为蛋白质重新通过非共价键作用使蛋白发生了部分折叠, 暴露在蛋白表面的 Trp19 和

8~10 个反平行的  $\beta$ -折叠结构和一个  $\alpha$ -螺旋结构。当处理时间为 30  $\mu$ s 时,  $\beta$ -折叠含量由 (33.22  $\pm$  0.58)% 增加到 (39.38  $\pm$  0.16)%。然而当处理时间进一步延长时,  $\beta$ -折叠含量开始下降, 无规则卷曲增加。这可能是由于短时脉冲处理, 会破坏维持过敏原蛋白高级结构的次级键 (如氢键、静电相互作用、范德华力), 从而导致结构展开,  $\beta$ -折叠含量增加。当处理时间进一步延长时, 脉冲电场处理会使蛋白分子极化, 扰乱蛋白质氨基酸残基间的电场分布和带电基团的定位, 使  $\beta$ -Lg 二级结构遭到破坏,  $\beta$ -折叠含量减少, 无规则卷曲含量增加, 使之前展开的蛋白结构重新变得致密<sup>[24]</sup>。这与 LI 等<sup>[24]</sup>研究 PEF 处理对大豆分离蛋白二级结构的影响类似, 该研究发现大豆分离蛋白的  $\beta$ -折叠含量随处理时间的延长, 呈现先增加后降低的趋势, 说明大豆分离蛋白的二级结构丢失。

图2 PEF处理对 $\beta$ -Lg内源性荧光强度的影响Fig. 2 Effects of PEF on the intrinsic fluorescence intensity of  $\beta$ -Lg

Trp61 残基再次被掩埋到分子内部。由图 2 可以看到  $\beta$ -Lg 最大发射波长并没有发生明显的红移或蓝移, 表明本实验的 PEF 处理仅使蛋白结构发生了部分的展开或者折叠, 并没有使其结构发生较大的改变<sup>[25]</sup>。

### 2.4 表面疏水性分析

蛋白质的表面疏水性是蛋白质表面与极性水溶

液环境接触的疏水基团的参数,是维持蛋白质三级结构的重要作用力之一,对蛋白质分子结构的研究具有重要意义。图3为通过ANS荧光探针法测定的不同条件PEF处理对 $\beta$ -Lg表面疏水性的影响,ANS荧光探针与 $\beta$ -Lg芳香族氨基酸残基结合在激发波长370 nm发射波长485 nm处有最大吸收。从图3可以看出,PEF处理对 $\beta$ -Lg的表面疏水性有显著性影响,与原样相比均有不同程度的增加,并且随处理时间的延长呈先增加后降低的趋势。在处理时间为30  $\mu$ s时,表面疏水性达到最大值( $H_0 = 1040$ ),说明 $\beta$ -Lg有更多的疏水性基团与ANS荧光探针结合。这主要是由于PEF处理使蛋白结构展开,从而使更多的ANS荧光探针进入到 $\beta$ -Lg的疏水空腔内并与之结合。当PEF继续作用 $\beta$ -Lg溶液时,蛋白的表面疏水性开始下降,这可能是因为PEF的电击作用影响了蛋白质分子内部的电荷分布,使 $\beta$ -Lg内部基团相互靠近,蛋白部分折叠,疏水基团重新掩埋到分子内部,从而ANS荧光探针更难与 $\beta$ -Lg的疏水性基团结合,导致表面疏水性下降<sup>[25-26]</sup>。这与赵伟等<sup>[27]</sup>研究结果类似,其研究了PEF处理对蛋清蛋白表面疏水性的影响,结果表明随PEF处理时间的延长蛋清蛋白的表面疏水性表现出先增强然后有所减弱的趋势。

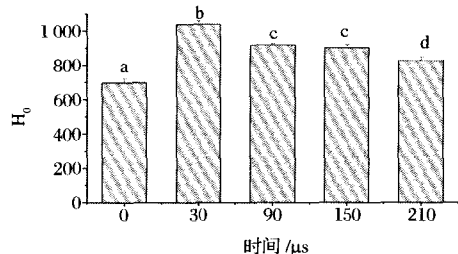


图3 PEF处理对 $\beta$ -Lg表面疏水性的影响

Fig.3 Effects of PEF on the surface hydrophobicity of  $\beta$ -Lg

注:小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),图4同。

## 2.5 抗原性分析

图4所示为不同PEF处理对 $\beta$ -Lg抗原性的影响。由图4可知,当电场强度为25 kV/cm时,随着PEF处理时间的延长, $\beta$ -Lg抗原性呈先增加后降低的趋势,在时间为30  $\mu$ s时抗原性达到最大,为1344  $\mu$ g/mL,是未处理样品的1.25倍。随着处理时间的进一步延长,抗原性显著降低,在210  $\mu$ s时,抗原性降为最低,为453  $\mu$ g/mL,是未处理样品的42%。

在天然状态下,过敏原蛋白有90%以上的表位为构象性表位,而且有些线性表位是构象性表位的组成部分,这说明过敏原蛋白的空间结构与抗原性密切

相关。另外, $\beta$ -Lg的 $\beta$ -折叠包含一些过敏表位,部分疏水性氨基酸残基的过敏表位也隐藏在 $\beta$ -Lg分子内部,如 $\beta$ -Lg的主要过敏片段AA102-124、AA41-60、AA149-162<sup>[29]</sup>,因此,二级结构中 $\beta$ -折叠的含量和表面疏水性强弱对 $\beta$ -Lg抗原性也有重要影响。在25 kV/cm 30  $\mu$ s时, $\beta$ -Lg的抗原性达到最大,结合圆二色谱、内源荧光以及表面疏水性的实验结果可知,这可能是由于 $\beta$ -Lg结构展开,表现为 $\beta$ -折叠含量增加、分子内部的Trp残基暴露以及掩埋在 $\beta$ -Lg分子内部的疏水性基团外翻等,使隐藏在蛋白分子内部的隐性表位暴露至分子表面,导致抗体更易与抗原表位进行特异性结合, $\beta$ -Lg的抗原性显著增加。当处理时间继续延长, $\beta$ -Lg结构发生部分折叠,表现为 $\beta$ -折叠含量降低,内源性荧光强度和表面疏水性也下降,蛋白分子表面的抗原表位重新掩埋到分子内部,使抗体不能与这些掩埋在分子内部的抗原表位结合,导致抗原性降低至453  $\mu$ g/mL<sup>[28-29]</sup>。故 $\beta$ -Lg抗原性的变化与其结构的变化密切相关。

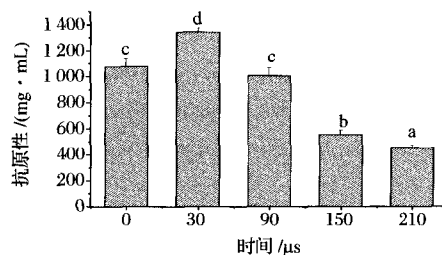


图4 PEF处理对 $\beta$ -Lg抗原性的影响

Fig.4 Effect of PEF on the allergenicity of  $\beta$ -Lg

## 3 结论

PEF处理对 $\beta$ -Lg的二、三级结构有显著影响,导致蛋白的抗原性也随之改变。随着PEF处理时间的增加, $\beta$ -Lg的空间结构呈先展开后折叠的变化,在25 kV/cm 30  $\mu$ s时,展开程度达到最大,其过敏表位暴露在蛋白质表面,导致抗原性达到最大(1344  $\mu$ g/mL)。随着处理时间进一步增加,展开的蛋白结构逐渐折叠,在25 kV/cm 210  $\mu$ s时抗原性降为最低,为未处理样品的42%。这进一步表明:不同条件PEF处理对 $\beta$ -Lg抗原性有一定影响,且长时间PEF处理能降低 $\beta$ -Lg的抗原性,这为制备低过敏性 $\beta$ -Lg提供了一种新方法,为开发低敏性乳粉提供了一条新途径,也为PEF在乳粉或者婴幼儿奶粉加工中的合理利用提供了科学依据。

## 参 考 文 献

- [1] ZIMET P, LIVNEY Y D. Beta-lactoglobulin and its nano-complexes with pectin as vehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids[J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(4): 1 120 - 1 126.
- [2] HATTORI M, MIYAKAWA S, OHAMA Y, et al. Reduced immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(14): 4 546 - 4 553.
- [3] STANIC V D, STOJADINOVIC M, ATANASKOVIC M M, et al. Structural changes and allergenic properties of  $\beta$  - lactoglobulin upon exposure to high - intensity ultrasound [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2012, 56 (12): 1 894 - 1 905.
- [4] GRAR H, KADDOURI H, GOURINE H, et al. Microwave irradiation under different pH conditions induced a decrease in  $\beta$ -lactoglobulin antigenicity [J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 229(5): 779 - 783.
- [5] ZHONG J Z, LIU W, LIU C M, et al. Aggregation and conformational changes of bovine  $\beta$ -lactoglobulin subjected to dynamic high-pressure microfluidization in relation to antigenicity[J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(8): 4 237 - 4 245.
- [6] LIU Y Y, ZENG X A, DENG Z, et al. Effect of pulsed electric field on the secondary structure and thermal properties of soy protein isolate[J]. *European Food Research and Technology*, 2011, 233(5): 841 - 850.
- [7] 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.
- [8] SCHOENBACH K H, JOSHI R P, STARK R H, et al. Bacterial decontamination of liquids with pulsed electric fields[J]. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 2000, 7(5): 637 - 645.
- [9] ZHANG R, CHENG L, WANG L, et al. Inactivation effects of PEF on horseradish peroxidase (HRP) and pectinesterase (PE) [J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2006, 34(6): 2 630 - 2 636.
- [10] CHEN J, ZHANG R, LUO W. Effects of pulsed electric fields on phenols and colour in young red wine[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, 30(1): 206 - 209.
- [11] CHEN F, ZENG L, ZHANG Y, et al. Degradation behaviour of methamidophos and chlorpyrifos in apple juice treated with pulsed electric fields [J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(4): 956 - 961.
- [12] YU L J, NGADI M, RAGHAVAN G S V. Effect of temperature and pulsed electric field treatment on rennet coagulation properties of milk [J]. *Journal of Food Engineering*, 2009, 95(1): 115 - 118.
- [13] MARCO-MOLÉS R, ROJAS-GRAÜ M A, HERNANDOI, et al. Physical and structural changes in liquid whole egg treated with high-intensity pulsed electric fields[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(2): C257 - C264.
- [14] SUI Q, ROGINSKI H, WILLIAMS R P W, et al. Effect of pulsed electric field and thermal treatment on the physicochemical and functional properties of whey protein isolate[J]. *International Dairy Journal*, 2011, 21(4): 206 - 213.
- [15] XIANG B Y, SIMPSON M V, NGADI M O, et al. Effect of pulsed electric field on the rheological and colour properties of soy milk[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2011, 62(8): 787 - 793.
- [16] JOHNSON P E, VAN DER PLANCKEN I, BALASA A, et al. High pressure, thermal and pulsed electric-field-induced structural changes in selected food allergens [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(12): 1701 - 1710.
- [17] 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.
- [18] ZHANG Q T, TU Z C, XIAOH, 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.
- [19] L DE LA HOZ, NETTO F M. Structural modifications of  $\beta$ -lactoglobulin subjected to gamma radiation [J]. *International Dairy Journal*, 2008, 18(12): 1 126 - 1 132.
- [20] 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): 1 341 - 1 348.
- [21] RAHAMAN T, VASILJEVIC T, RAMCHANDRAN L. Conformational changes of  $\beta$ -lactoglobulin induced by shear, heat, and pH—Effects on antigenicity [J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(7): 4 255 - 4 265.
- [22] MORO A, BÁEZ G D, BUSTI P A, et al. Effects of heat-treated  $\beta$ -lactoglobulin and its aggregates on foaming properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 1 009 - 1 015.
- [23] SHI Y, LI R, TU Z, et al. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the

- physicochemical properties and structure of fish myofibrillar proteins[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2015, 109: 70–72.
- [24] 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): 1 167–1 175.
- [25] 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): 1 341–1 348.
- [26] 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): 1 167–1 175.
- [27] 赵伟, 杨瑞金, 张文斌, 等. 高压脉冲电场作用下蛋清蛋白功能性质和结构的变化[J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 91–96.
- [28] KLEBER N, KRAUSE I, ILLGNER S, et al. The antigenic response of  $\beta$ -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation[J]. *European Food Research and Technology*, 2004, 219(2): 105–110.
- [29] ZHONG J, LIU C, LIU W, et al. Effect of dynamic high-pressure microfluidization at different temperatures on the antigenic response of bovine  $\beta$ -lactoglobulin[J]. *European Food Research and Technology*, 2011, 233(1): 95–102.

## Effect of pulsed electric fields on structure and antigenicity of $\beta$ -lactoglobulin

TU Zong-cai<sup>1,2\*</sup>, LI Xue<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, YANG Wen-hua<sup>1</sup>, TIAN Ming<sup>1</sup>, MA Da<sup>1</sup>

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** The aim of this study was to research the effect of pulsed electric fields (PEF) on structure and allergenicity of  $\beta$ -lactoglobulin( $\beta$ -Lg). SDS-PAGE, circular dichroism spectra, fluorescence spectra. and indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay were used to measure the structure and antigenicity, respectively. The results showed that PEF had no significant influence on the molecular weight of  $\beta$ -Lg. However, it had an significant effect on secondary structure, tertiary structure and antigenicity. Moreover, the change of antigenicity was closely related to that of the structure induced by PEF. The content of  $\beta$ -sheet, intrinsic fluorescence intensity, surface hydrophobicity and antigenicity were first increased and then decreased with the increasing of PEF treating time. The allergenicity of  $\beta$ -Lg reached up to 1344 $\mu$ g/mL when treated at 25 kV/cm for 30  $\mu$ s. And it was decreased about 58% at 210  $\mu$ s. This indicated that the PEF could be used in producing low allergic milk.

**Key words** pulsed electric fields;  $\beta$ -lactoglobulin; antigenicity; enzyme-linked immunosorbent assay; structure