

微波处理条件对蛋清结构和 IgG 结合能力的影响

陈红兵^{1,2} 杨 峰^{1,3} 高金燕³ 佟 平¹

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047; 2. 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047;

3. 南昌大学食品学院, 南昌 330031)

摘要: 为探究降低蛋清致敏性的新方法,在不同的微波条件下处理蛋清蛋白,通过 SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)分析分子量变化、圆二色光谱分析二级结构变化、紫外光谱分析三级结构变化、外源性荧光光谱分析疏水性变化、间接 ELISA(酶联免疫吸附试验)分析 IgG(免疫球蛋白 G)结合能力的变化,研究微波对蛋清的影响。研究证实,微波处理降低蛋清蛋白的潜在致敏性,其中 400 W/30 s 处理后的蛋白显示出最低的 IgG 结合能力,所有条件下处理后的蛋清蛋白的二、三级结构均发生显著改变。80 W 的微波功率下,蛋白质的结构先折叠,该条件下处理 30 s 后,蛋白结构又展开;当微波功率达到 640 W 时,处理时间较长的蛋白分子产生堆叠。蛋白质分子的结构变化导致了其抗原性的变化。

关键词: 蛋清;微波处理;致敏性;IgG 结合能力

中图分类号: TS253 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2019)07-0355-07

Effects of Microwave Treatment on Structure of Egg White and IgG Binding Capacity

CHEN Hongbing^{1,2} YANG Hao^{1,3} GAO Jinyan³ TONG Ping¹

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

2. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China

3. College of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Aiming to explore a new way to reduce the allergenicity of egg allergens. The influence of different microwave treatments on egg white was demonstrated by SDS-PAGE, circular dichroism spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, exogenous fluorescence spectroscopy and indirect ELISA to analyze molecular weight changes, secondary structure, tertiary structure, hydrophobic changes and changes in IgG binding capacity, respectively. Results showed that the microwave treatment reduced the potential allergenicity of egg white proteins, and the IgG binding capacity of egg white was the lowest when it was treated under 400 W for 30 s. The secondary and tertiary structure of protein were obviously changed by microwave treatment. Under 80 W, the structure of egg white proteins was folded, however, when treatment time was more than 30 s, the structure of egg white proteins was unfolded again. When the power of microwave treatment was increased to 640 W, part of egg white proteins was aggregated. Changes in the structure could induce changes in potential allergenicity of egg white proteins, however, the relationship of structure and potential allergenicity of egg white proteins under microwave treatment should be further analyzed.

Key words: egg white; microwave treatment; potential allergenicity; IgG binding capacity

0 引言

鸡蛋是众多食品的原材料来源之一,同时它也

被认定为第二大食物过敏原^[1]。鸡蛋过敏是儿童早期常见的食物过敏形式之一,它会引起皮肤病变、腹痛和腹泻等症状,甚至可能会引起患者死亡。已

收稿日期: 2019-01-05 修回日期: 2019-03-12

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0400304)和国家自然科学基金项目(31660436)

作者简介: 陈红兵(1967—),男,教授,主要从事食品安全研究,E-mail: chenhongbing@ncu.edu.cn

通信作者: 佟平(1984—),女,副研究员,博士,主要从事食品营养与安全研究,E-mail: tongping@ncu.edu.cn

有研究表明,造成鸡蛋过敏的主要过敏原有卵类粘蛋白、卵白蛋白、卵转铁蛋白和溶菌酶^[2-3]。鸡蛋过敏严重影响着特殊人群的身体健 康,已经成为人类公共营养和食品安全问题。

目前,超声波、水浴加热和恒温箱加热等加工处理方式已被广泛应用于降低蛋清致敏性,而微波处理对蛋清致敏性影响的研究则相对较少。微波是一种波长在 1~1 000 mm 之间的电磁波,介于红外线和无线电波之间^[4]。微波辐射在众多工业和商业领域已经应用 60 多年^[5-6]。相比其他加工处理方式,微波具有快速高效、节能环保、操作简便等优点^[7-9],另外,微波的能量消耗较少,也被广泛应用于食品工业中干燥、加热和杀菌等环节^[10]。除此之外,在蛋白质加工方面,微波也可应用于辅助水解、萃取和改性等^[11-13]。

近年来,利用微波处理技术控制食物的致敏性已开展了一些研究,文献[14]利用微波处理虾过敏蛋白,结果表明加工后的过敏蛋白致敏性降低。文献[15]采用微波处理拟穴青蟹蟹肉,分析原肌球蛋白(TM)的消化稳定性及过敏原性,结果显示,与未经处理的样品相比,微波处理后的 TM 消化稳定性及过敏原性没有明显变化。文献[16]研究发现,微波辅助木瓜蛋白酶水解乳清蛋白,有助于提高乳清蛋白的水解度和降低乳清蛋白中 β -乳球蛋白的致敏性。文献[17]研究表明,微波处理可降低其抗原性,且抗原性的改变与蛋白结构的展开和蛋白的变性有关。综上,微波处理可改变食物过敏蛋白的致敏性。然而,目前关于微波处理对蛋清致敏性和结构的影响的研究相对较少。因此,开展微波处理蛋清研究对于改变蛋清致敏性和结构具有实际意义。

蛋白质的氨基酸组成和序列、空间结构、净电荷及其分布、表面疏水性等均会影响蛋白质功能性质。本文采用微波加工技术,通过控制功率和时间,利用 SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)、圆二色光谱分析、内源性荧光光谱分析、外源性荧光光谱法等方法对经微波处理前后的蛋清样品进行结构表征。同时,采用间接 ELISA(酶联免疫吸附试验)法对其 IgG(免疫球蛋白 G)结合能力进行分析,从而探究微波处理条件对蛋清蛋白结构和致敏性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白壳鸡蛋购于南昌市青山湖区天虹商场。考马斯亮蓝 G250、牛血清白蛋白(BSA)标准品、十二烷基磺酸钠(SDS)、0.4 g/mL 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰

胺(体积比 29:1)、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(AP)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、 β -巯基乙醇,生工生物工程(上海)股份有限公司;预染蛋白 marker,德国 Fermentas 公司;考马斯亮蓝 R250,上海化学试剂公司分装厂;溴酚蓝,上海化学试剂总厂试剂二厂。

1.2 仪器与设备

Lambda25 型紫外可见分光光度计,美国 PerkinElmer 公司;J-810 型圆二色光谱仪,日本分光公司;F-4600 型荧光分光光度计,日本日立公司;Mode1860 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;Milli-Q 型超纯水系统,美国密理博公司;高速冷冻离心机,美国 ThermoScientific 公司;迷你型蛋白垂直电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;PB-10 型 pH 计,德国赛多利斯公司;HJ-A6 型恒温磁力搅拌水浴锅,常州万顺仪器制造有限公司。

1.3 分析方法

1.3.1 蛋清的分离和微波处理

手工分离鲜鸡蛋蛋清,高速分散机 4 200 r/min 搅拌 55 min,再 8 000 r/min 离心 30 min,取上清于 4℃ 备用。随后分别采用 0、80、240、400、640 W 的微波功率,对样本进行 0、10、20、30、40 s 的处理后于 4℃ 保存。

1.3.2 蛋清蛋白质量浓度的测定

参照 Bradford 法测定鸡蛋中蛋清主要蛋白质量浓度。使用不同质量浓度的 BSA 作为标准溶液,绘制蛋白质量浓度的标准曲线,通过标准曲线得出样品的质量浓度。

1.3.3 SDS-PAGE 分析

制备 10% 的分离胶和 4% 的浓缩胶,将蛋白样品与上样缓冲液按料液比 1 g/mL 混合后煮沸加热 5 min,然后 1 000 r/min 离心 3 min。样品上样量为 10 μ L。电泳条件浓缩胶:12 mA,30 min;分离胶:24 mA,90 min。电泳完毕后,首先采用考马斯亮蓝 G250 对胶染色 15 min,然后脱色至有清晰条带出现。拍摄蛋白胶观察蛋清体系中蛋白质分子量的变化。

1.3.4 蛋清蛋白与 IgG 结合能力检测

将不同微波处理下(微波功率 80、240、400、640 W,处理时间 10、20、30、40 s)后的样品以 1.25 μ g/mL 的质量浓度包被于 96 孔酶标板中,空白组为 PBS(磷酸盐缓冲液);阳性对照组为未处理的蛋清蛋白。1:20 000 稀释的抗蛋清兔血清池作为第一抗体,1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 作为第二抗体。邻苯二胺(OPD)作为显色剂。反应结束后在 490 nm 处测量其光密度

(OD 值)。根据不同微波条件处理下 OD 值的大小判定蛋清蛋白的 IgG 结合能力强弱。

1.3.5 圆二色光谱分析

采用圆二色光谱分析不同微波条件处理前后蛋清蛋白二级结构变化。蛋清蛋白质量浓度 0.5 mg/mL, 条件设定:远紫外波长扫描范围 190 ~ 240 nm, 扫描速度 100 nm/min, 光径 0.1 cm, 间隔 0.1 nm, 带宽 0.1 nm。平行测 3 次。结果以平均摩尔椭圆率表示,单位为(°)·cm²/dmol。

1.3.6 紫外光谱分析

采用紫外可见分光光度计检测微波处理前后蛋清蛋白结构展开情况。蛋清蛋白质量浓度 0.1 mg/mL, 条件设定:波长扫描范围 250 ~ 350 nm, 波长间隔 1.0 nm, 扫描速度中等, 带宽 2.0 nm, 响应时间 0.2 s。

1.3.7 内源性荧光光谱分析

采用内源性荧光光谱分析微波处理蛋清蛋白质构象的变化。蛋清蛋白质量浓度 0.1 mg/mL, 条件设定:激发波长 350 nm, 发射波长 300 ~ 400 nm, 应答时间 4 s, 狭缝宽度 5.0 nm, 电压 400 V。

1.3.8 外源性荧光光谱分析

采用外源性荧光光谱分析微波处理蛋清蛋白质表面疏水性的变化。取 5 mL 质量浓度 0.1 mg/mL 的蛋清样品, 加入 30 μL 5 mmol/L 的 ANS(8-苯胺-1-萘磺酸)溶液, 混匀(20℃)下避光反应 1 h 后进行荧光色谱分析。条件设定:激发波长 390 nm, 发射波长 400 ~ 700 nm, 扫描速度 1 200 nm/min, 光径 1.0 cm, 狭缝宽度 5.0 nm, 电压 700 V。

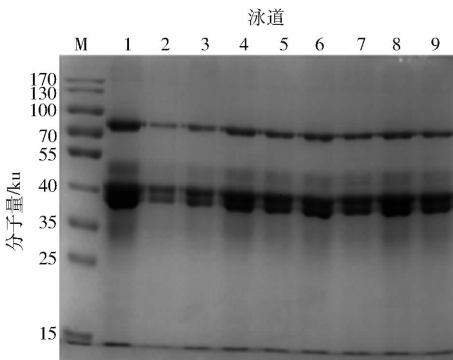
1.3.9 统计分析

采用 Origin 8.0 对数据进行处理, 采用 SPSS 19.0 统计软件对试验数据进行 one-way ANOVA 分析, 当 $p < 0.05$ 时, 差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 蛋清蛋白质量浓度的确定

Bradford 法测定蛋白质量浓度后绘制的标准曲线



如图 1 所示,待测样品质量浓度按 $(\bar{A}_{595} - 0.3455) n / (0.002 \times 1\,000)$ 计算,其中 $\bar{A}_{595}$ 表示 595 nm 处的吸光度, n 表示稀释倍数,本实验中蛋清蛋白质量浓度为 23.8 mg/mL。

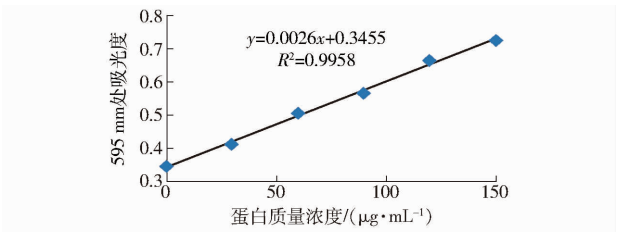


图 1 Bradford 法测定蛋白质量浓度的标准曲线

Fig.1 Standard determination curve of protein mass concentration by using Bradford method

2.2 SDS - PAGE 分析

图 2 中的泳道 M 代表预染蛋白 Marker。泳道 1 ~ 17 分别表示:1, 未处理蛋清;2 ~ 5, 80 W/10 s、80 W/20 s、80 W/30 s、80 W/40 s;6 ~ 9, 240 W/10 s、240 W/20 s、240 W/30 s、240 W/40 s;10 ~ 13, 400 W/10 s、400 W/20 s、400 W/30 s、400 W/40 s;14 ~ 17, 640 W/10 s、640 W/20 s、640 W/30 s、640 W/40 s 等微波处理条件下蛋清蛋白。利用 SDS - PAGE 对经微波处理的蛋清样品分子量进行分析。图 2 显示,与未经微波处理的蛋清样品(泳道 1)相比,经微波处理后的蛋清样品条带均变浅。这表明蛋清蛋白质的浓度发生了不同程度的降低。其中,经 80 W/10 s(泳道 2)和 80 W/20 s(泳道 3)处理的样品后与其他微波条件处理下的蛋清样品相比蛋清蛋白条带颜色更浅,这可能与短时间的微波处理使得蛋清蛋白快速变性沉淀导致浓度下降有关。经 640 W/40 s(泳道 17)处理后的蛋清样品条带最浅,这与长时间的大功率微波处理导致大部分蛋清蛋白变性有关。该结果与文献[18]的研究结果接近。

2.3 圆二色光谱分析

利用圆二色光谱检测经微波处理前后蛋清样品二级结构的变化,圆二色光谱(Circular dichroism, CD)是研究偏振光对不对称分子作用

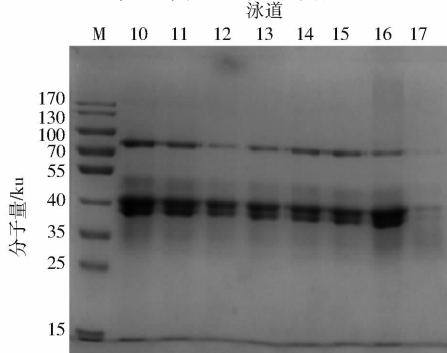


图 2 不同微波处理条件下蛋清蛋白质的 SDS - PAGE

Fig.2 SDS - PAGE patterns of egg white proteins under different microwave treatment conditions

的一种技术^[19],当分子对左、右圆偏振光的吸收不同时就可以观察到圆二色光谱,其中蛋白质的250 nm 以下的圆二色光谱是由肽键中氨基生色团决定的^[20],在190~240 nm 的波长范围内,圆二色光谱可灵敏地检测出蛋白质二级结构的变

化情况,结果如图3所示。从圆二色光谱图可知,与未处理的蛋清相比,经相同微波功率处理,摩尔椭圆率为零时的波长减小,正峰峰值降低,负峰峰值增大,表明微波使蛋清蛋白的二级结构发生了改变。

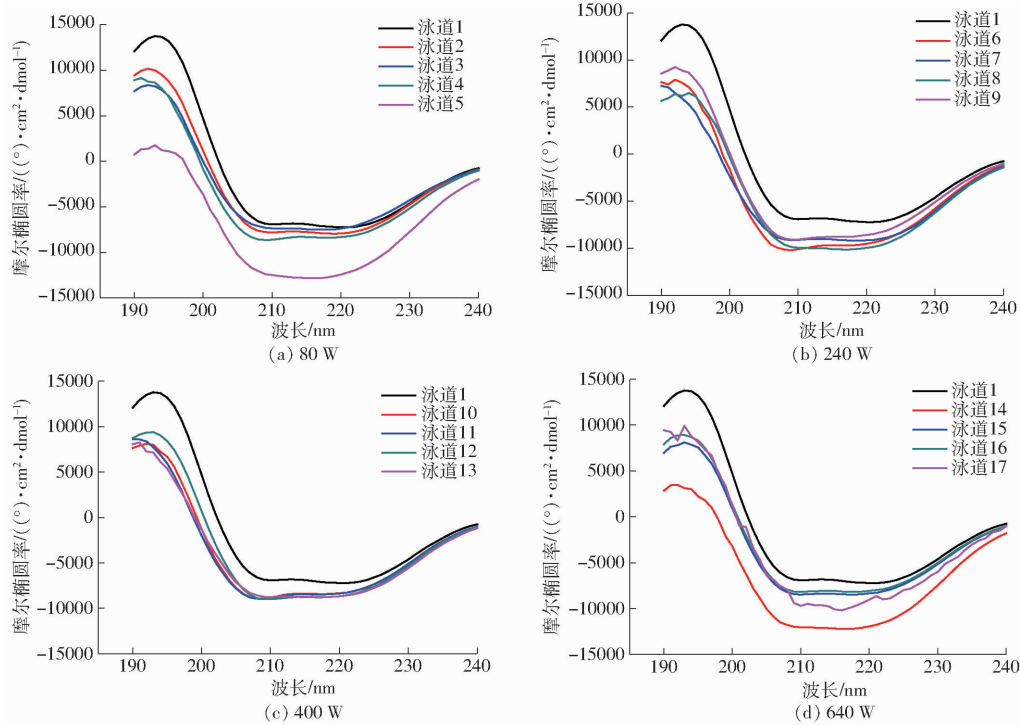


图3 不同微波功率处理下的蛋清蛋白圆二色谱图
Fig. 3 Circular dichroisms of egg white protein under different microwave powers

从图3a可知,所有蛋清样品在190 nm 附近均有一个正峰,208 nm 和222 nm 处均有负峰,表明未经微波处理的蛋清样品和微波处理10、20、30 s 的样品均具有典型的α-螺旋结构;微波处理40 s 的蛋清样品在190~200 nm 处有一个正峰,216 nm 处有一个较强的负峰,表明该蛋清样品具有典型的β-折叠结构。综上,当微波功率为80 W 时,处理时间越长对蛋白的二级结构影响越大。

从图3b中可明显看出,处理时间不同的蛋清样品均具有典型的α-螺旋结构,虽与未处理蛋清相比变化程度不同,但不同处理时间对蛋清蛋白二级结构的影响并不明显。

图3c显示,处理时间不同的蛋清样品的谱图近似重合,表明在微波功率为400 W 时,蛋清样品中α-螺旋结构和β-折叠结构含量与微波处理时间无明显关系。

当微波处理功率为640 W 时(图3d),处理10 s 的蛋清样品图谱变化最大,此时对二级结构的影响最大,随着时间延长,图谱又慢慢向未处理蛋清样品方向偏移,40 s 时其样品中已不含有可以发生偏振的结构。

2.4 紫外光谱分析

蛋白质的紫外吸收光谱,主要是由于蛋白质中的芳香族氨基酸(色氨酸和酪氨酸)残基侧链对紫外光的吸收而产生的^[21]。因此,可以根据蛋白质对紫外光谱吸收的变化来推断溶液中蛋白质三级结构的改变,具体变化见图4。

在微波处理功率为80 W 和240 W (图4a、4b)时,样本的紫外吸收光谱降低,且随着时间延长,吸光度逐渐升高。这表明当处理时间为10 s 时,蛋白分子聚集,芳香族氨基酸被掩埋,紫外吸光度降低;但随着时间的延长,蛋白受热后其空间结构打开,芳香族氨基酸暴露,吸光度升高。

从图4c、4d可以看出,微波处理功率为400 W 和640 W 时,除处理时间为30 s 的样本外,其余样本随时间的延长紫外吸光度均逐渐降低,即在这两种微波功率下,处理时间越长,蛋白分子聚集的程度可能越大。经400 W/30 s、400 W/40 s 和640 W 处理的蛋清样品其特征吸收峰均发生了较小程度的红移,表明溶液中酪氨酸和色氨酸残基附近的微环境已经发生了改变。

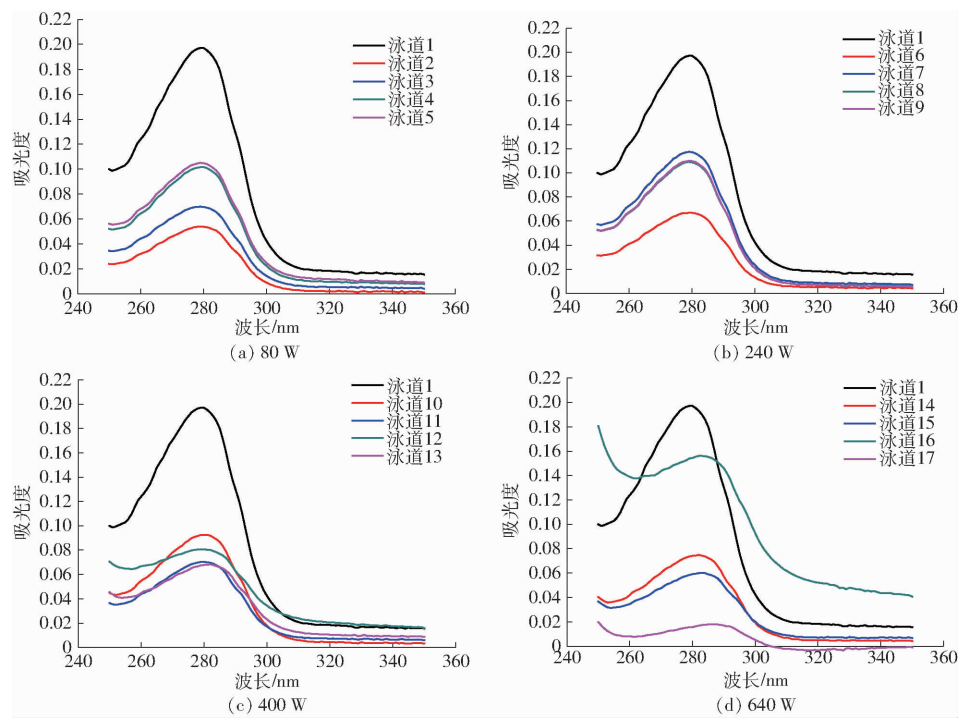


图 4 不同微波功率处理的蛋清蛋白紫外光谱图

Fig. 4 UV chromatograms of egg white protein under different microwave powers

2.5 内源性荧光光谱分析

蛋白质的内源性荧光主要是由色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 以及苯丙氨酸 (Phe) 发射产生的, 主要以色氨酸为基准来研究蛋白质三级结构的改变^[22]。

图 5a 显示, 与未处理的蛋清样品相比, 经过微波处理的蛋清样品荧光强度明显降低, 其中处理时间 40 s 的样品荧光强度降低最明显。所有样本最大吸收波长 $\lambda_{\max}$ 并没有发生明显的变化, 这可能是

由于蛋白质发生了折叠, 部分生色基团被破坏或者掩埋。

当微波功率为 240 W 和 400 W (图 5b、5c) 时, 相比于未处理的蛋清样品, 经微波处理 30 s 和 40 s 的样品的荧光强度稍有升高, 而处理 10 s 和 20 s 的样品的荧光强度均降低, 但相较于 80 W 条件下的蛋清样品, 其荧光强度均增大。不同微波处理时间下蛋清样品的最大吸收波长 $\lambda_{\max}$ 并没有发生明显的

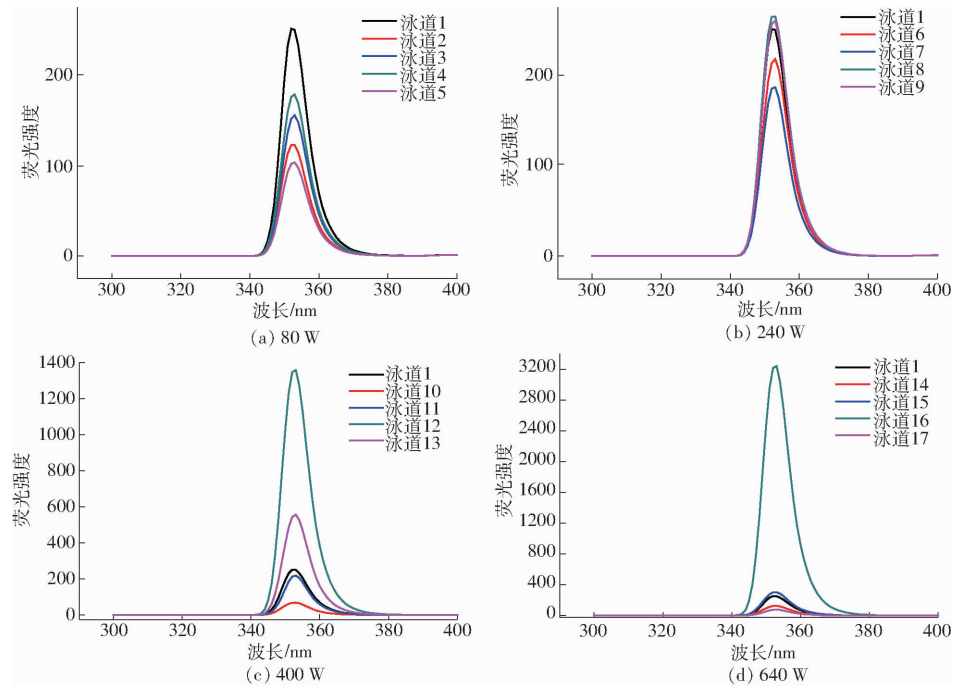


图 5 不同微波功率处理的蛋清蛋白内源性荧光光谱图

Fig. 5 Endogenous fluorescence spectra of egg white proteins under different microwave powers

变化,其中一种可能是在 240 W 和 400 W 的条件下,随着时间的延长,蛋白质分子伸展,暴露了部分生色基团;另一种可能是蛋白质分子之间发生了交联,其表面形成了新的生色基团而导致荧光强度的增加。

从图 5d 可以明显看出,相对于未处理的蛋清样品,经微波处理 30 s 的样品的荧光强度显著增大,而处理 10、20、40 s 的蛋清样品荧光强度均降低,但处理时间为 10 s 和 20 s 的样品荧光强度均较 400 W 的大,微波处理时间不同时蛋清样品的最大吸收波长 λ_{max} 没有发生明显的变化,这可能是因为随着微波处理时间的延长,蛋白质分子先展开,暴露出部分生色基团导致荧光强度增大,而后蛋白质分子发生折叠,掩埋部分生色基团致使其荧光强度减小;高功率处理蛋清蛋白使得蛋白质分子一开始就发生了交联,其表面形成了新的生色基团,荧光强度增大,随着时间的延长蛋白质分子交联程度增大,其表面虽有可能形成新的生色基团,但形成的新的生色基团远少于一开始被包埋基团,所以总体生色基团的量仍减少,致使荧光强度减小。

2.6 外源性荧光光谱分析

由于 ANS 探针与蛋白质结合显示的荧光强度和蛋白的表面疏水性呈正相关,因此,外源性荧光光谱常用于表征蛋白质分子表面疏水性的变化。

如图 6a 和图 6b 所示,与未经微波处理的样品相比,随微波处理时间延长样品的荧光强度先降低后升高,这可能是因为较短时间的处理,蛋白分子发生折叠,其疏水基被掩埋,随着处理时间的延长蛋白

质被打开,疏水基团逐渐暴露,致使其表面疏水性先减小后又增加。

如图 6c 和图 6d 所示,与未经微波处理的蛋清样品相比,微波处理后样品的荧光强度均增加,且随着时间的延长先升高后又降低。微波处理时间为 30 s 时,蛋清样品的荧光强度最大。以上可能是由于聚集使蛋白质发生相互作用,从而使蛋白质内部疏水基团被暴露,当处理时间为 40 s 时,蛋白质进一步聚集,暴露在外的内部疏水基团又被掩埋。

2.7 微波处理对蛋清蛋白 IgG 结合能力的影响

如图 7(图中不同字母表示差异性显著)所示,与未经微波处理的蛋清样品相比,经微波处理后样品的 OD 值均有一定程度的降低,表明与 IgG 结合能力下降,微波处理会在一定程度上降低蛋清蛋白的抗原性。统计分析显示,微波处理条件为 400 W/30 s 的蛋清样品与未处理样品其 IgG 结合能力存在显著性差异($p < 0.05$),表明在该处理条件对蛋白抗原性影响最大,此时抗原性最低。当微波处理功率为 640 W 时,蛋清样品的抗原性随微波处理时间的增加逐渐降低;而在 400 W 时,其样品的抗原性整体随处理时间的延长并没有发生明显变化,但处理时间为 30 s 时其 IgG 结合能力显著低于其他条件处理条件下的样品($p < 0.05$)。

结合上述结构的变化分析,蛋清样品经低功率微波处理可能使蛋白质分子发生折叠,形成的二硫键隐藏了部分 IgG 的结合表位,导致其抗原性降低,随着处理时间的延长,蛋白质分子伸展,暴露出部分

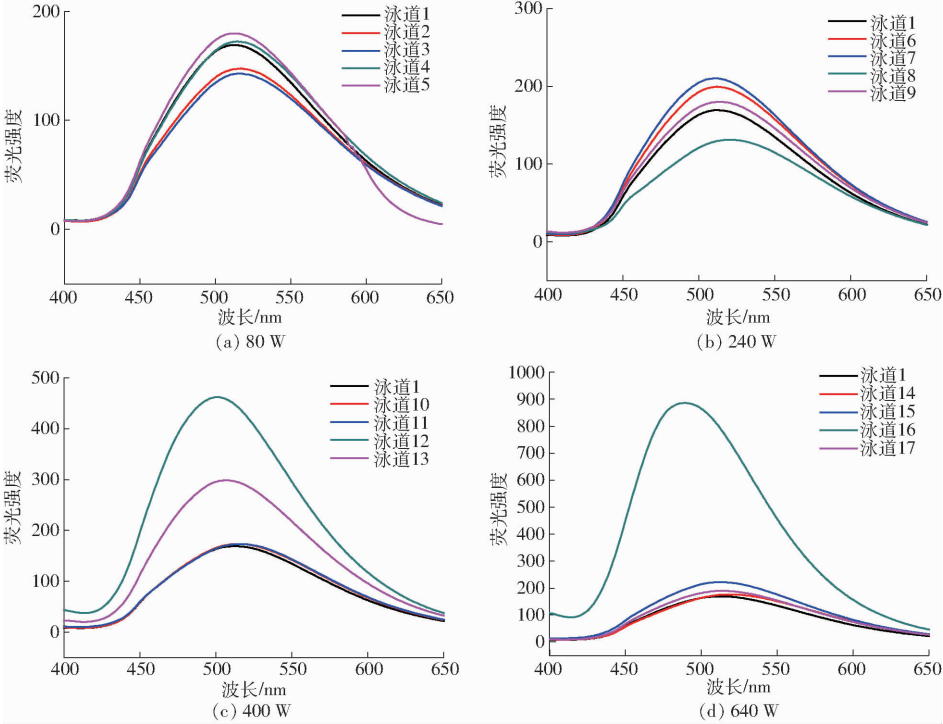


图 6 不同微波功率处理的蛋清蛋白外源性荧光光谱图

Fig. 6 Exogenous fluorescence spectra of egg white protein under different microwave powers

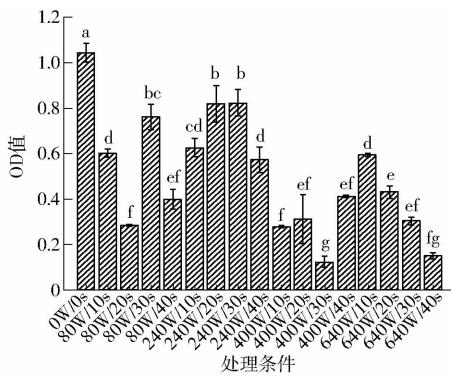


图 7 蛋清样品 IgG 结合能力的评估和不同组别之间的显著性差异 ($p < 0.05$)

Fig.7 Evaluation of IgG binding capacity of egg white samples under different microwave treatment conditions and significant differences ($p < 0.05$) between means

表位,但暴露的表位远少于被隐藏的表位,所以其抗原性仍呈降低趋势。经较大功率微波处理且延长处

理时间,蛋白质分子可能发生了分子内或分子间的聚合从而导致部分 IgG 的结合表位被隐藏或破坏,导致其抗原性降低。

3 结束语

通过 SDS - PAGE 分析、圆二色光谱分析、内源性荧光光谱分析、外源荧光光谱分析、间接 ELISA 等方法对不同条件下微波处理后的蛋清蛋白的抗原性和结构进行表征。结果发现,不同条件的微波处理会不同程度地影响蛋清蛋白的结构,80 W 的微波功率下,蛋白质的结构先折叠,该条件下处理 30 s 后,蛋白结构又展开;当微波功率达到 640 W 时,处理时间较长的蛋白分子产生堆叠。研究还发现,当功率为 400 W、处理时间为 30 s 时,其抗原性最低,其他微波处理也可以降低蛋清蛋白的抗原性,微波处理通过改变蛋清蛋白的结构进而改变其抗原性。

参 考 文 献

[1] AMO A, RODRIGUEZ-PEREZ R, BLANCO J, et al. Gal d 6 is the second allergen characterized from egg yolk[J]. J. Agric. Food. Chem., 2010, 58(12): 7453 - 7457.

[2] SZÉPFALUSI Z, EBNER C, PANDJAITAN R, et al. Egg yolk α -livetin (chicken serum albumin) is a cross-reactive allergen in the bird-egg syndrome[J]. J. Allergy Clin. Immunol., 1994, 93(5): 932 - 942.

[3] QUIRCE S, MARAÑÓN F, UMPIÉRREZ A, et al. Chicken serum albumin (Gal d 5*) is a partially heat-labile inhalant and food allergen implicated in the bird-egg syndrome[J]. Allergy, 2015, 56(8): 754 - 762.

[4] POZAR D M. Microwave engineering education: from field theory to circuit theory[C] // 2012 IEEE/MTT - S International Microwave Symposium Digest. IEEE, 2012: 1 - 3.

[5] JORDENS K, WILKES G L, JANZEN J, et al. The influence of molecular weight and thermal history on the thermal, rheological, and mechanical properties of metallocene-catalyzed linear polyethylenes [J]. Polymer, 2000, 41(19): 7175 - 7192.

[6] MUDGETT R E. Microwave food processing[J]. Food Technology, 1989, 52(8): 754 - 261.

[7] AYDOGDU A, SUMNU G, SAHIN S. Effects of microwave-infrared combination drying on quality of eggplants [J]. Food & Bioprocess Technology, 2015, 8(6): 1198 - 1210.

[8] XU D, MIN Z, MUJUMDAR A S, et al. Microwave freeze drying of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. Journal of Food Engineering, 2010, 96(4): 491 - 497.

[9] HORUZ E, MASKAN M. Hot air and microwave drying of pomegranate (*Punica granatum* L.) arils [J]. Journal of Food Science & Technology, 2015, 52(1): 285 - 293.

[10] GUO Q, SUN D W, CHENG J H, et al. Microwave processing techniques and their recent applications in the food industry [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 67(1): 236 - 247.

[11] MESSIA M C, FALCO T D, PANFILI G, et al. Rapid determination of collagen in meat-based foods by microwave hydrolysis of proteins and HPAEC - PAD analysis of 4-hydroxyproline [J]. Meat Science, 2008, 80(2): 401 - 409.

[12] LANDER T A, DADONAITE B, MONRO A K. Microwave drying of plant material for herbarium specimens and genetic analysis [J]. Taxon, 2013, 62(4): 790 - 797.

[13] ISMAEL R, VITTORIA B, ALEJANDROJ M. Microwave-assisted modification of starch for compatibilizing LLDPE/starch blends [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 75(2): 343 - 350.

[14] 董晓颖, 高美须, 潘家荣, 等. 不同处理方法对虾过敏蛋白分子量及抗原性的影响[J]. 核农学报, 2010, 24(3): 548 - 554.

[15] DONG Xiaoying, GAO Meixu, PAN Jiarong, et al. Effects of different treatments on molecular weight and antigenicity of shrimp allergenic protein [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2010, 24(3): 548 - 554. (in Chinese)

[16] 刘光明, 余惠琳, 黄秀秀, 等. 加工处理方式对蟹类原肌球蛋白的消化稳定性和过敏原性的影响[J]. 中国食品学报, 2011, 11(4): 14 - 22.

[17] LIU Guangming, YU Huilin, HUANG Xiuxiu, et al. Effect of processing method on digestive stability and allergenicity of crab tropomyosin [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(4): 14 - 22. (in Chinese)

[18] 卞蓉霞. 微波辅助酶解乳清蛋白的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.

[19] BIAN Rongxia. Microwave-assisted proteolysis of whey proteins[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013. (in Chinese)

[20] ACHOURI A, BOYE J I. Thermal processing, salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate [J]. Food Research International, 2013, 53(1): 240 - 251.

[21] 邢绍平. 微波处理对乳清蛋白凝胶影响的探讨[J]. 中国乳业, 2016(5): 69 - 73.

[22] XING Shaoping. The impact of microwave treatment on whey protein gel [J]. China Dairy, 2016(5): 69 - 73. (in Chinese)

[23] 林克椿. 生物物理技术: 波谱技术及其在生物学中的应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989.

[24] PELTON J T, MCLEAN L R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure [J]. Analytical Biochemistry, 2000, 277(2): 167 - 176.

[25] 肖厚荣, 施春华, 夏炳乐, 等. Cu^{2+} 与烟草多酚氧化酶相互作用研究 [J]. 无机化学学报, 2003, 19(6): 589 - 593.

[26] XIAO Hourong, SHI Chunhua, XIA Bingle, et al. Study on interaction between Cu^{2+} and tobacco polyphenol oxidase [J]. Chinese Journal of Inorganic Chemistry, 2003, 19(6): 589 - 593. (in Chinese)

[27] ZHANG T, LÜ C, YUN S, et al. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) on structure and activity of phytoferritin [J]. Food Chemistry, 2012, 130(2): 273 - 278.