

$^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照对卵清蛋白糖基化体系结构和糖基化产物的影响

卞中悦¹, 涂宗财^{1,2,3}, 王辉¹, 刘光宪^{4*}

¹南昌大学食品科学与技术国家重点实验室 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 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发中心 南昌 330022

⁴江西省农业科学院 南昌 330299)

摘要 为探究 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照对糖基化体系结构和糖基化产物的影响,以卵清蛋白(OVA)-葡萄糖体系为研究对象,经 0,25,50,75,100 kGy 的 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照后,采用 SDS-PAGE、荧光光谱、圆二色谱测定其分子质量、三级结构及二级结构的变化。借助高效液相色谱法、紫外光谱法测定其体系内产生的有害糖基化产物(果糖胺、丙烯酰胺、荧光性 AGEs、戊糖素、类黑精)的含量。OVA 分子质量和表面疏水性的增加、内源荧光强度和 α -螺旋含量的降低、 β -结构(β -折叠和 β -转角)含量的增加表明, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照呈剂量依赖性,促进了 OVA 与葡萄糖的糖基化反应。此外, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照后体系内产生的果糖胺、丙烯酰胺的含量呈现先上升后下降的趋势,在辐照剂量为 50 kGy 时达到最大值。荧光性 AGEs、戊糖素、类黑精的含量以剂量依赖性方式增加。综合来看,为了减少辐照加工过程中蛋制品内有害糖基化产物的含量,提高其安全性,需将 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照的剂量控制在 25 kGy 以内。本研究结果为未来扩展食品辐照技术在蛋制品方面的应用提供一定的科学依据。

关键词 卵清蛋白; $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照; 糖基化体系; 结构; 糖基化产物

文章编号 1009-7848(2024)03-0017-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.002

$^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照是指食品或原材料受到由 ^{60}Co 放射源产生的高能和高穿透性 γ 射线照射,导致其成分发生物理或化学反应的过程^[1]。相较于低温等离子体、高压脉冲、超声波等非热加工技术, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照因操作简单、污染少、能效高、适合工业化连续性生产等优点而成为提高食品质量和安全的优选方法^[2]。就辐照食品的安全性而言,1997 年,联合国粮食及农业组织(The Food and Agriculture Organization,FAO)、原子能机构(The International Atomic Energy Agency,IAEA)、世界卫生组织(The World Health Organization,WHO)委员会联合组报告,只要技术和设备可以满足要求,食品可接受任何剂量的辐照处理,即使达到 75 kGy 剂量处理的食物也可以食用,无需规定剂量上限^[3]。然而,辐照对食品体系的安全性仍是影响辐照食品销量的原因之一^[4]。

美拉德反应(maillard reaction,MR)是食品贮

藏过程中最有可能发生的一种非酶褐变反应,该反应是食品体系中蛋白质的氨基化合物与还原糖的羰基化合物之间自发进行的复杂反应。据报道,作为美拉德反应前期阶段的糖基化反应可以诱导蛋白质的颜色、功能和营养价值发生变化^[5-6]。然而,单独的糖基化反应不能很好地满足人们的需求。部分国内外学者开展了复合法即物理方法结合糖基化对食品体系的相关研究,结果发现超声波、辐照等物理方法可促进食品体系中的糖基化反应,从而影响蛋白质的结构和功能。如 Shao 等^[7]研究表明,0~150 W/cm² 的超声波通过促进 β -乳球蛋白与半乳糖的反应来降低其致敏性。Liu 等^[8]发现 0~25 kGy 的辐照会以剂量依赖性促进糖化卵清蛋白分子结构的改变。然而,糖基化反应的加速进行会不可避免地导致一些中期产物(丙烯酰胺、果糖胺等)和晚期产物(AGEs、类黑精、戊糖素等)的产生。这些结构复杂的物质不仅对食品的风味与表观产生消极影响,还会造成人类疾病的发生。研究表明,糖基化反应产物在体内积累达到一定浓度时会严重影响细胞与组织的正常功能,导致阿尔兹海默症、心血管疾病、视网膜病变等疾病^[9]。近年来,关于辐照影响蛋白质糖基化体系功

收稿日期: 2023-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060525);江西省博士后科研择优项目(2020)

第一作者: 卞中悦,女,硕士生

通信作者: 刘光宪 E-mail: liugx178@163.com

能的报道日益增多。Wang 等^[10]研究表明,与原始的大豆分离蛋白相比,2.5~12.5 kGy 伽马射线辐照下制备的大豆分离蛋白-麦芽糖复合体系的功能特性(溶解性能、乳化性能、吸水性能、吸脂性能、发泡性能)明显提高,蛋白表面由光滑结构变为具有许多小空隙高度连接的网络结构。Chawla 等^[11]发现乳清蛋白-乳糖复合物经 0~100 kGy 伽马射线辐照处理后,其抗氧化活性呈剂量依赖性增加。而在辐照处理过程中,随着蛋白质糖基化反应的进行,体系内产生的糖基化产物尚不明确,关于此类研究鲜有报道。

作为鸡蛋蛋清的主要成分,卵清蛋白(Ovalbumin,OVA)是一种分子质量为 45 ku 的球状蛋白质,其具有制备方便、纯化简单、结构清晰的特点,常被视为研究蛋白质结构及特性的模型蛋白。本文以 OVA-葡萄糖作为糖基化体系模型,研究⁶⁰Co- γ 辐照对 OVA 糖基化体系结构和糖基化产物的影响,为未来扩展食品辐照技术的应用提供一定的理论参考,同时为增加消费者对辐照食品的可接受度提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

Ovalbumin(OVA)、葡萄糖、8-苯胺-1-萘磺酸(8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid,ANS),美国 Sigma 公司;丙烯酰胺标准品,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;果糖胺(GSP)试剂盒,南京建成科技有限公司;其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Chemidoc MP 凝胶成像系统,美国 Bio-Red 公司;Synergy HT 多功能酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;Ultimate 3000RSLCnano 液相色谱仪,美国 Thermo-Fisher 公司;U-2910 紫外分光光度计,日本 Hitachi 公司;F-7000 荧光光度计,日本 Hitachi 公司;Bio-Logic MOS 450 圆二色谱仪,法国 Bio-Logic 公司;LGJ-80 冷冻干燥机,中国亚泰科隆有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备 用超纯水将质量比为 1:1 的 OVA 与葡萄糖充分溶解,48 h 冻干。常温下,利用中国上海东能辐照有限公司提供的设计装源量

15 万居里的⁶⁰Co 静态辐照装置以 16 kGy/s 的剂量率对冻干后的样品进行 γ -射线辐照处理,剂量分别为 0,25,50,75,100 kGy,结束后立即冰浴以终止反应。用超纯水复溶后超滤并冻干,-20℃冰箱保存备用。不同辐照剂量处理的样品分别命名为 OVA-G-0、OVA-G-25、OVA-G-50、OVA-G-75、OVA-G-100。

1.3.2 结构分析

1.3.2.1 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 配制 12%的分离胶和 5%的浓缩胶于电泳玻璃板内,待其凝固后,将样品(1.0 mg/mL)与上样缓冲液 3:1 混合煮沸后上样。在 110 V 的电压下条带进行分离,之后用考马斯亮蓝 R-250 溶液染色 12 min,用 5%甲醇及 7.5%乙酸混合液脱色约 12 h。成像后通过 Image Lab 和 Image J 软件分析其相对分子质量、迁移率与灰度值。

1.3.2.2 内源荧光光谱 用荧光光度计获得样品溶液(1.0 mg/mL)的内源荧光光谱图。具体参数设置如下:激发波长:287 nm;发射光谱范围:250~400 nm;扫描速度:1 200 nm/min;狭缝宽度:5 nm。

1.3.2.3 表面疏水性(H_0) 根据 Chen 等^[12]的方法并做出适当修改,将每个样品分别配制成 0.125,0.25,0.5,1.0 mg/mL 4 个浓度。不同浓度的样品溶液与 8-苯胺-1-萘磺酸(ANS,8 mmol/L,pH 7.4)以 150:1 的体积比充分混合,避光条件下反应 3 min 后立即使用荧光光度计(发射波长 470 nm、激发波长 390 nm)测定其荧光强度。

1.3.2.4 圆二色谱 根据 Yang 等^[13]的方法稍作修改,将样品配成 0.2 mg/mL 的溶液,在氮气充足和室温环境下,采用圆二色谱仪扫描比色皿中的样品溶液,狭缝宽度、扫描范围、扫描速度分别为 1 nm、190~250 nm、10 nm/min。使用 Dichro Web 在线网站分析样品的二级结构含量。

1.3.3 糖基化产物测定

1.3.3.1 果糖胺(GSP)的测定 将样品配置成 20 mg/mL 的溶液,采用 GSP 试剂盒测定不同辐照剂量下样品的 GSP 含量。其中,空白溶液、标准溶液及标准空白溶液按照试剂盒的步骤进行配制。样品中 GSP 含量的计算公式如下:

$$\text{GSP 含量}(\text{mmol/L}) = \frac{A_s - A_b}{A_{ss} - A_{sb}} \times c_{ss} \quad (1)$$

式中: A_s 、 A_b 、 A_{ss} 、 A_{sb} ——分别为样品、空白、标准及标准空白溶液在 530 nm 处的吸光值; c_{ss} ——标准品的浓度, 2 mmol/L。

1.3.3.2 丙烯酰胺的测定 根据李军等^[14]的方法稍作修改, 分别将丙烯酰胺配置成 0, 2, 4, 12, 16, 24, 36, 54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品溶液用于制备标准曲线。将质量浓度为 20 mg/mL 的样品溶液、超纯水、20%三氯乙酸以 1:8:1 的体积比充分混匀, 封口沸水煮 15 min 后, 8 000 r/min 离心 15 min。所有溶液过 0.22 μm 滤膜后上样。液相色谱检测参数设置如下: 色谱柱为安捷伦 C18 长柱 (PN880975-902); 流动相为 5% 的甲醇水溶液; 检测波长为 210 nm; 检测时间为 50 min; 进样量为 10 μL ; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。以丙烯酰胺的质量浓度、峰面积分别作为横坐标、纵坐标, 得出标准曲线回归方程: $Y = 307.635X - 176.315 (R^2 = 0.9980)$, 该方程线性关系良好, 可用于样品中丙烯酰胺含量的计算。

1.3.3.3 荧光性 AGEs 的测定 分别取质量浓度为 2 mg/mL 的样品溶液 200 μL 注入 96 孔黑色酶标板中, 利用酶标仪 (激发波长 370 nm、发射波长 440 nm) 测定其荧光性 AGEs 的含量。

1.3.3.4 戊糖素的测定 将 200 μL 质量浓度为 2 mg/mL 的样品溶液注入黑色酶标板中, 利用酶标仪 (激发波长 335 nm、发射波长 385 nm) 测定其戊糖素的含量。

1.3.3.5 类黑精的测定 根据李军等^[14]的方法并做出适当修改。使用超纯水将不同辐照剂量处理的样品质量浓度调整为 10 mg/mL, 采用紫外分光光度计测定其在 470 nm 处的吸光值, 以下公式用于计算其类黑精的含量。

$$C = \frac{A_{470\text{nm}} \times V}{eb} \quad (2)$$

式中: c ——类黑精的含量, mmol/L; $A_{470\text{nm}}$ ——样品在 470 nm 处的吸光值; V ——样品体积, mL; e ——摩尔消光系数, 282 L/(mol·cm); b ——比色皿的厚度, 1 cm。

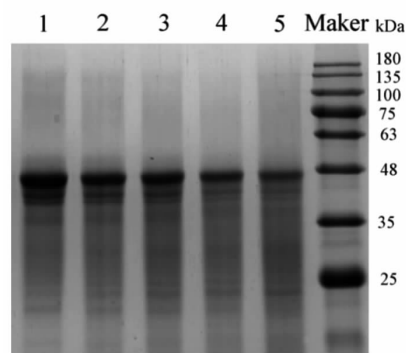
1.4 数据处理

所有试验重复进行 3 次。试验数据统一以平均值 \pm 标准偏差表示。使用 SPSS 26.0 软件评估样品平均值之间的显著性差异 ($P < 0.05$)。用 Origin 2019 软件作图以便分析试验结果。

2 结果与分析

2.1 结构变化分析

2.1.1 SDS-PAGE 不同辐照剂量下的糖基化反应对 OVA 相对分子质量、迁移率与灰度值的变化如图 1 和表 1 所示。与未经过辐照的样品 (泳道 1) 相比, 在 25, 50, 75, 100 kGy 的剂量下, 样品条带 (泳道 2~5) 的迁移率 (浓缩胶与分离胶分界处至条带的相对距离) 逐渐下降, 相对分子质量由 44.8 ku 依次增加至 45.3, 45.7, 46.1, 46.4 ku, 条带发生了明显上移, 这表明 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照促进了 OVA 与葡萄糖之间的共价交联, OVA 的一级蛋白序列被修饰, 从而增加了 OVA 的分子质量。Yang 等^[13]发现, OVA 由于在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温和干热条件下与不同还原糖之间发生的糖基化反应而导致了其分子质量的增加。此外, 随着辐照剂量的增加, 样品条带明显变窄, 条带灰度值呈剂量依赖性下降, 这可能是由于 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照在促进其糖基化反应的同时, OVA 分子发生了一定程度的降解。在辐照处理过程中, γ 射线使样品中水分子电离产生自由基, 这些自由基能够攻击蛋白质分子中的谷氨酸和脯氨酸残基导致肽键受到不同程度的破坏^[15]。OVA 分子中包含约 8.5% 的谷氨酸和 3.1% 的脯氨酸, 当 OVA 分子暴露于 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照过程时, 其中的谷氨酸和脯氨酸残基很可能受到自由基的攻击, 并产生丙酮酸和 2-吡咯烷酮衍生物, 最终导致 OVA 分子的降解。



注: 条带 1~5 分别代表 OVA-G-0、OVA-G-25、OVA-G-50、OVA-G-75 及 OVA-G-100。

图 1 不同辐照剂量下的糖基化反应对 OVA 分子质量的影响

Fig.1 Effects of glycation under various irradiation doses on the molecular weight of ovalbumin

表1 不同辐照剂量下的糖基化反应对 OVA 条带相对分子质量、迁移率、灰度值的影响

Table 1 Effects of glycation under various irradiation doses on the relative molecular weight, mobility and gray value of ovalbumin band

泳道	样品	相对分子质量/ku	迁移率	灰度值
1	OVA-G-0	44.8	0.429	32 562.104
2	OVA-G-25	45.3	0.425	28 356.439
3	OVA-G-50	45.7	0.423	25 885.054
4	OVA-G-75	46.1	0.418	22 921.054
5	OVA-G-100	46.4	0.414	21 406.518

2.1.2 内源荧光光谱分析 每种蛋白质分子中都含有荧光性的基团,在 OVA 分子中具有这种特性的基团是色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)及苯丙氨酸(Phe),因为这些含有苯环结构的芳香族氨基酸可与其他具有 π 电子结构的基团形成平面共轭体系而具有荧光性,所以 OVA 分子荧光峰位置与强度的改变可以体现这些氨基酸残基微环境的变化,从而表明分子三维结构的改变^[16]。如图 2 所示, OVA 糖基化体系经过不同剂量的 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照后,所有样品均在 344 nm 左右处出现了一个荧光发射峰,虽然荧光峰的位置没有发生明显的变化,但是在此波长(344 nm)下的最大的荧光强度由 2 220 (OVA-G-0) 分别下降至 1 947 (OVA-G-25), 1 827(OVA-G-50), 1 801(OVA-G-75), 1 707 (OVA-G-100)。这一结果与 Yang 等^[17]的研究结果一致,表明随着辐照剂量的不断增加,糖基化 OVA 分子的荧光强度不断下降,可能是因为不同辐照剂量下的糖基化反应使 OVA 的分子结构发生了不同程度的展开,使得芳香族氨基酸残基不同程度的暴露于溶剂中,葡萄糖链的接入可进一步屏蔽分子中芳香族氨基酸残基的区域,增加了蛋白质分子的空间位阻,从而使荧光强度下降。

2.1.3 表面疏水性分析 蛋白质分子间疏水相互作用是维持蛋白质三级结构的作用力之一。具体而言,位于蛋白质内部的疏水性氨基酸(丙氨酸、亮氨酸、色氨酸等)会由于外部条件刺激而随着结构展开转移至分子表面,从而改变 H_0 的大小^[18]。如图 3 所示,不同剂量的 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照处理后,糖基化 OVA 的 H_0 以剂量依赖性显著上升 ($P<0.05$)。在 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线的照射下,蛋白质分子间的作用力遭到了破坏,分子发生了去折叠,荧光探针(ANS)与之前埋藏在分子内部的疏水区域相结合的几率

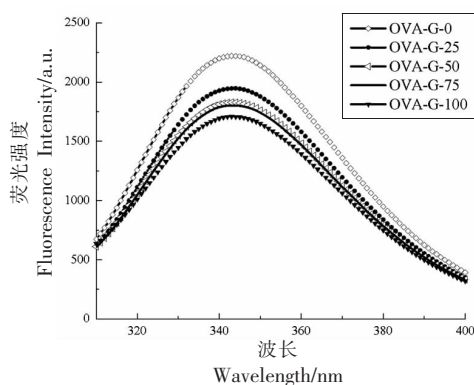


图2 不同辐照剂量下的糖基化反应对 OVA 的内源荧光光谱的影响

Fig.2 Effects of glycation under various irradiation doses on intrinsic fluorescence spectrum of ovalbumin

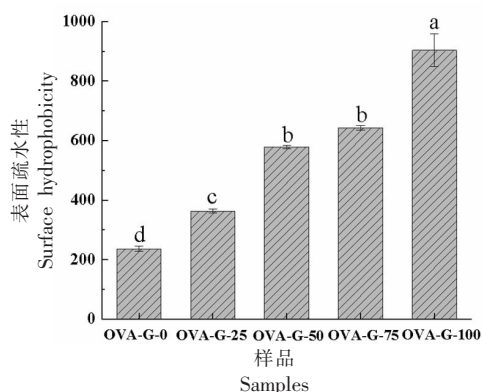
注:不同小写字母(a-e)表示差异显著($P<0.05$)(下同)。

图3 不同辐照剂量下的糖基化反应对 OVA 的表面疏水性的影响

Fig.3 Effects of glycation under various irradiation doses on surface hydrophobicity of ovalbumin

大大增加,这可能是 OVA 分子的 H_0 得以上升的原因。不同剂量辐照处理后 OVA 分子结构的展开与之前内源荧光光谱的结论一致。然而卜单等^[19]

报道,糖基化会由于连接在氨基酸残基上的糖导致部分疏水基团的空间位阻增加从而降低 OVA 分子的 H_0 , 本研究 H_0 上升的趋势可能是因为 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照条件下, OVA 的去折叠程度大于其糖基化修饰效应,从而增加了 OVA 分子的 H_0 。

2.1.4 二级结构分析 如图 4 和表 2 所示, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照处理的糖基化 OVA 的二级结构含量发生了明显的变化。未经辐照处理的 OVA 复合体系具有 20.13% 的 α -螺旋、24.87% 的 β -折叠、21.54% 的 β -转角、33.47% 的无规则转角。OVA-葡萄糖体系经过不同剂量的 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照处理后, OVA 的 α -螺旋含量显著下降 ($P < 0.05$), β -结构 (β -折叠和 β -转角) 含量增加。Fu 等^[20]的研究结果表明,还原糖与蛋白质的糖基化反应会导致其 α -螺旋结构的减少,用于维持分子结构有序性的 α -螺旋含量的下降象征着蛋白质结构发生了去折叠,在此过程中维持蛋白质分子高级结构的静电相互作用、范德华力等次级键被破坏并伴随着 β -折叠与 β -

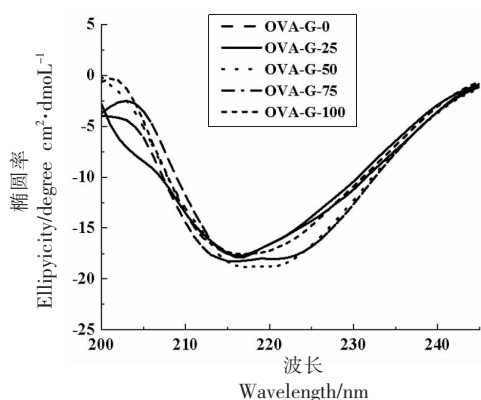


图 4 不同辐照剂量下的糖基化反应对 OVA 的二级结构的影响

Fig.4 Effects of glycation under various irradiation doses on secondary structure of ovalbumin

转角的发生。因此, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照以剂量依赖性促进 OVA 与葡萄糖的糖基化反应,这使得 OVA 分子发生了一定程度的展开,二级结构由有序结构(α -螺旋)逐渐向无序结构(β -结构)转变。

表 2 不同辐照剂量下的糖基化反应对 OVA 二级结构含量的影响

Table 2 Effects of glycation under various irradiation doses on secondary structure content of ovalbumin

样品	二级结构含量 / %			
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无序转角
OVA-G-0	20.13 \pm 0.12 ^a	24.87 \pm 0.27 ^c	21.54 \pm 0.30 ^b	33.47 \pm 0.55 ^e
OVA-G-25	18.03 \pm 0.44 ^b	28.24 \pm 0.53 ^b	22.58 \pm 0.63 ^b	31.15 \pm 0.20 ^d
OVA-G-50	16.76 \pm 0.08 ^c	36.21 \pm 0.74 ^a	19.80 \pm 0.17 ^c	27.13 \pm 0.99 ^e
OVA-G-75	14.76 \pm 0.04 ^d	27.08 \pm 0.23 ^b	22.22 \pm 0.40 ^b	35.89 \pm 0.66 ^b
OVA-G-100	12.35 \pm 0.65 ^e	21.73 \pm 0.48 ^d	24.03 \pm 0.55 ^a	42.38 \pm 1.43 ^a

2.2 糖基化产物含量分析

2.2.1 果糖胺含量 果糖胺是蛋白质与还原糖的反应过程中不可避免产生的中间产物之一。它是一种与高分子酮胺结构相似的糖化蛋白。人体内过高的果糖胺水平容易导致血液及肝脏相关疾病的产生,严重损害人们的身心健康^[21]。不同辐照剂量下 OVA 糖基化体系内果糖胺的含量如图 5 所示,未经辐照处理过的样品果糖胺的含量为 14.47 mmol/L,这可能是因为 OVA 糖基化体系在真空冷冻干燥过程中不可避免的发生了糖基化反应导致了果糖胺的产生。Wang 等^[22]报道,卵清蛋白与核糖的交联反应随真空冷冻干燥时间(6~48 h)的增加而增强。随着辐照剂量的提升,果糖胺含量

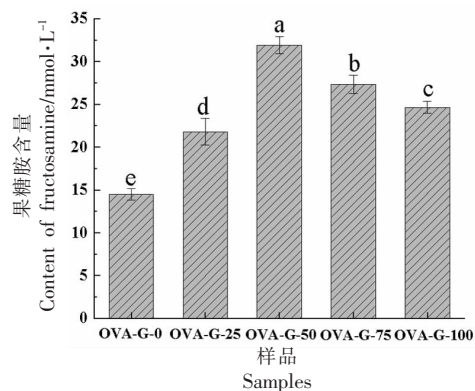


图 5 不同辐照剂量下 OVA-葡萄糖体系中果糖胺含量的变化

Fig.5 The change in the content of fructosamine of ovalbumin-glucose system at various irradiation doses

先增加后降低($P<0.05$),在 50 kGy 的剂量下,其含量达到最大值(31.94 mmol/L)。糖基化反应初期,蛋白质中的游离氨基与还原糖中的游离羧基发生缩合生成席夫碱即亚胺衍生物,该衍生物会环化成葡糖胺(*N*-葡糖糖基胺),其经过内部基团相互转化形成果糖胺,这可能是样品中果糖胺含量增加的缘由^[23]。当剂量进一步增加时,其含量明显下降($P<0.05$),原因可能是随着糖基化反应的进一步加深,体系中产生的果糖胺聚合形成了糖基化晚期产物类黑精^[24]。因此,在未来鸡蛋制品的辐照加工中,将辐照剂量控制在 25 kGy 以内,可以有效控制加工过程中果糖胺的形成。

2.2.2 丙烯酰胺含量 与果糖胺类似,丙烯酰胺是糖基化反应的早期产物之一,蛋白质与糖反应后形成的二羰基化合物会促进天门冬酰胺发生 Strecker 降解产生丙烯酰胺。人们若长期服用丙烯酰胺会导致神经系统损伤、生殖能力减弱,正常细胞癌变等情况的发生^[25]。如图 6 所示,高剂量辐照处理后,样品中均产生了丙烯酰胺,其含量变化与果糖胺变化趋势一致。结果显示,剂量小于 50 kGy 时,体系中丙烯酰胺的含量随其增加而明显上升($P<0.05$),增加了将近 3 倍(7.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 27.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$),这可能是因为 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照促进了 OVA-葡萄糖体系的糖基化反应导致丙烯酰胺的积累。当剂量大于 50 kGy 时,丙烯酰胺的含量呈现降低的趋势。原因可能有两个,一是过大的辐照剂量使样品中积累的丙烯酰胺与其它物质相互作用

形成类黑精^[26];二是丙烯酰胺中的碳碳双键会在 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线照射下发生均裂形成单体自由基活性中心,这些带有电子的活性中心与体系中存在的丙烯酰胺单体聚合转变为无毒的聚丙烯酰胺^[27]。据食品添加剂联合专家委员会报告显示,一般人群丙烯酰胺的平均摄入量为 1~4 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$,由此看来,即使样品处于 0~100 kGy 的高剂量辐照下,丙烯酰胺的产生量均在人们的可接受范围内,但为了降低食品体系中丙烯酰胺的出现,辐照剂量最好保持在 25 kGy 以内。

2.2.3 荧光性 AGEs 含量 糖基化反应初期产生的丙酮酸、乙二醛等二羰基化合物与精氨酸、赖氨酸等氨基酸残基发生一系列的复杂反应形成 AGEs^[28]。AGEs 是一类结构复杂且稳定的共价化合物的总称,包括羟甲基赖氨酸、羟乙基赖氨酸等非荧光性 AGEs 和吡咯素、精氨嘧啶等荧光性 AGEs。目前,荧光性 AGEs 是综合评价体系中 AGEs 含量的常用指标。研究表明,AGEs 是糖尿病、心脏病、尿毒症等多种疾病的致病因子,因此,监测并控制食品体系中 AGEs 的含量对保护人类健康尤为重要^[29]。如图 7 所示,荧光性 AGEs 的荧光值以剂量依赖性显著上升,相比于未辐照的样品,当辐照剂量为 25,50,75,100 kGy 时,荧光性 AGEs 分别增加了 34.75%,72.77%,87.01%,119.25%($P<0.05$)。这表明随着 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照的进行,OVA 与葡萄糖之间的反应程度不断加深,导致糖基化产物的显著增加,这与电泳的分析结果

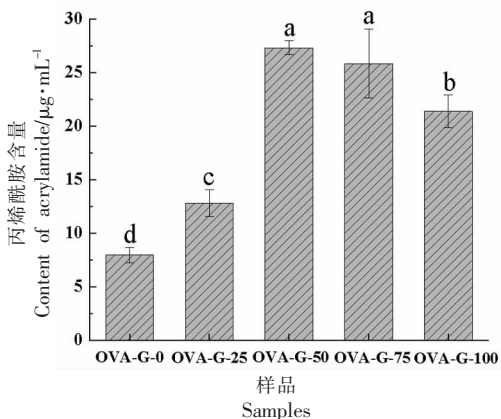


图 6 不同辐照剂量下 OVA-葡萄糖体系中丙烯酰胺含量的变化

Fig.6 The change in the content of acrylamide of ovalbumin-glucose system at various irradiation doses

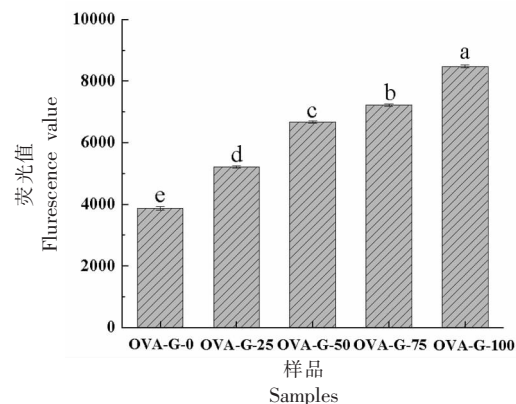


图 7 不同辐照剂量下 OVA-葡萄糖体系中荧光性 AGEs 含量的变化

Fig.7 The change in the content of fluorescent AGEs of ovalbumin-glucose system at various irradiation doses

一致。因此,蛋制品进行 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照时,将剂量控制在 25 kGy 以下可有效减少辐照食品中 AGEs 给人们带来的危害。

2.2.4 戊糖素含量 AGEs 是一类结构稳定的加成化合物的总称,并不能分析其中一种晚期糖基化终末产物含量的变化,为了具体的了解 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照对一种晚期糖基化终末产物含量的影响,本文对戊糖素的含量开展了测定。如图 8 所示,在 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照条件下,戊糖素的含量变化与荧光性 AGEs 的变化呈现正相关,均是随剂量增加而上升,辐照剂量在 25 kGy 以下时,其含量变化并无显著性差异 ($P>0.05$),但是超过 25 kGy 时,戊糖素的含量显著升高 ($P<0.05$)。相关研究表明,血清戊糖素含量越高,人体内骨强度越弱,增加人体患有骨质疏松椎体压缩性骨折的潜在风险^[30]。因此,将辐照剂量控制在 25 kGy 以内,可有效提高辐照食品的安全性。

2.2.5 类黑精含量 在美拉德反应的末期阶段,初期反应经重排、降解产生的醛类和胺类物质在一定条件下聚合最终形成一类聚合度不等且结构

复杂的棕褐色物质,这种由各种高分子化合物构成的混合体被称为类黑精^[31]。人们日常的生活饮食中,类黑精扮演了重要的角色,比如红烧肉烧制、咖啡烘焙时的香味,糕点烘制时诱人的色泽与芳香,同时具有降血压、抗氧化、抗菌等功效,然而过多的类黑精会导致食物发生严重的褐变,进而影响人们的食欲^[32]。如图 9 所示,在辐照剂量为 75 kGy 以下时,体系内类黑精的含量稍有上升但并无显著性差异 ($P>0.05$),当辐照剂量高达 100 kGy 时,其含量显著上升 ($P<0.05$),由 0.32 mmol/L 上升至 0.51 mmol/L。食品体系中丙烯酰胺与果糖胺是类黑精的前体物质,类黑精其含量的显著增加可能是因为中期产物积累到一定程度与氨基化合物聚合形成类黑精^[24]。当辐照剂量为 75 kGy 时,虽然类黑精的含量在可控的范围内,但是食品体系中的丙烯酰胺和果糖胺含量较高。因此综合考虑,将辐照剂量控制在 25 kGy 以内,可有效控制食品体系内美拉德反应产物的形成,进而增加消费者的可接受度。

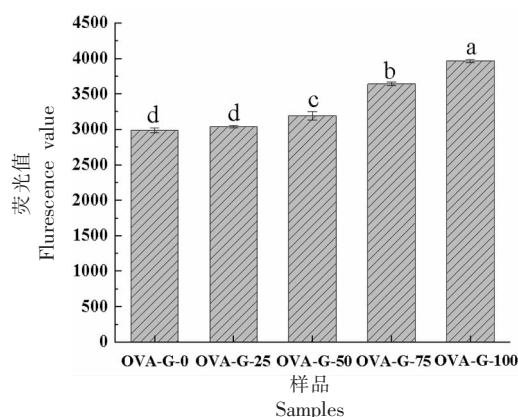


图 8 不同辐照剂量下 OVA-葡萄糖体系中戊糖素含量的变化

Fig.8 The change in the content of pentosidine of ovalbumin-glucose system at various irradiation doses

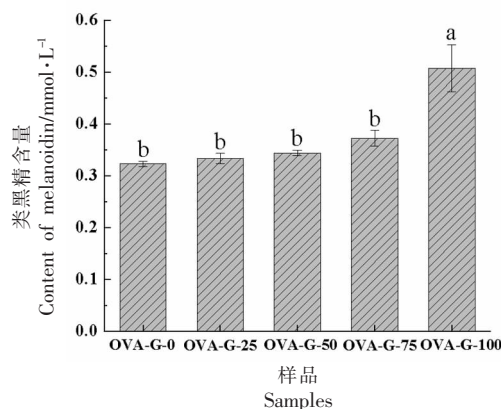


图 9 不同辐照剂量下 OVA-葡萄糖体系中类黑精含量的变化

Fig.9 The change in the content of melanoidin of ovalbumin-glucose system at various irradiation doses

3 结论

本试验探究了 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照对 OVA 糖基化体系结构和糖基化产物的影响。结果表明,随着辐照剂量的增加(0~100 kGy),OVA 与葡萄糖的糖基化反应会进一步加深,从而改变了其分子质量,提高其表面疏水性,降低其内源荧光强度,同时导致

α -螺旋结构到 β -结构 (β -折叠和 β -转角)的转变。此外,糖基化产物果糖胺、丙烯酰胺含量先上升后下降,剂量为 50 kGy 时达到最大值;荧光性 AGEs、戊糖素、类黑精含量随剂量增加而上升。因此,在未来蛋制品的辐照加工中,将剂量控制在 25 kGy 以内,可有效降低 OVA-葡萄糖体系中有

害物质的产生。然而,本研究涉及的辐照剂量较高,在剂量选择上的梯度较大。综合考虑实际加工过程中成本等因素,辐照剂量在0~25 kGy范围,糖基化体系内有害产物的变化需进一步研究以确定最合适的辐照剂量。

参 考 文 献

- [1] 石彬,李咏富,何扬波,等.⁶⁰Co- γ 射线辐照对“贵长”猕猴桃储藏品质的影响[J].食品安全质量检测学报,2021,12(15):6042-6048.
SHI B, LI Y F, HE Y B. Effect of ⁶⁰Co- γ -irradiation on the storage quality of ‘Guichang’ kiwifruit [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12 (15): 6042-6048.
- [2] BARBHUIYA R, SINGH P, SINGH S. A comprehensive review on impact of non-thermal processing on the structural changes of food components [J]. Food Research International, 2021, 149: 110647.
- [3] SKOVGAARD N. High-dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 58(1): 130-131.
- [4] RAVINDRAN R, JAISWAL A K. Wholesomeness and safety aspects of irradiated foods [J]. Food Chemistry, 2019, 285(2): 363-368.
- [5] YANG Y P, LIU G X, TU Z C, et al. Insight into the mechanism of reduced IgG/IgE binding capacity in ovalbumin as induced by glycation with monose epimers through liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(22): 6065-6075.
- [6] 张翼鹏,段焰青,刘自单,等.美拉德反应在食品和生物医药产业中的应用研究进展[J].云南大学学报(自然科学版),2022,44(1):203-212.
ZHANG Y P, DUAN Y Q, LIU Z D, et al. Research progress on the application of Maillard reaction in food and biomedical industries [J]. Journal of Yunnan University (Natural Science Edition), 2022, 44(1): 203-212.
- [7] SHAO Y H, ZHANG Y, ZHU M F, et al. Glycation of β -lactoglobulin combined by sonication pretreatment reduce its allergenic potential [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164(7): 1527-1535.
- [8] LIU G X, LIU J, TU Z C, et al. Investigation of conformation change of glycated ovalbumin obtained by Co-60 gamma-ray irradiation under drying treatment [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 47(3): 286-291.
- [9] 徐正华,梁玉燊,朱克卫,等.食品中晚期糖基化中间产物及终末产物研究进展[J].食品安全质量检测学报,2020,11(5):1496-1501.
XU Z H, LIANG Y Y, ZHU K W, et al. Research progress on the intermediate and end-products of advanced glycation in foods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(5): 1496-1501.
- [10] WANG Y Y, ZHANG A Q, WANG Y X, et al. Effects of irradiation on the structure and properties of glycosylated soybean proteins [J]. Food & Function, 2020, 11(2): 1635-1646.
- [11] CHAWLA S P, CHANDER R, SHARMA A. Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins [J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 122-128.
- [12] CHEN Y, TU Z C, WANG H, et al. LC-Orbitrap MS analysis of the glycation modification effects of ovalbumin during freeze-drying with three reducing sugar additives [J]. Food Chemistry, 2018, 268(6): 171-178.
- [13] YANG Y P, LIU G X, WANG H. Investigation of the mechanism of conformational alteration in ovalbumin as induced by glycation with different monoses through conventional spectrometry and liquid chromatography high-resolution mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(11): 3096-3105.
- [14] 李军,涂宗财,沙小梅,等.反应条件对牛血清白蛋白-葡萄糖体系糖基化产物形成的影响[J].食品与发酵工业,2019,45(5):87-93.
LI J, TU Z C, SHA X M, et al. Effect of reaction conditions on the formation of glycation products of bovine serum albumin-glucose system [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(5): 87-93.
- [15] STADTMAN E R, LEVINE R L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins [J]. Amino Acids, 2003, 25(3/4): 207.
- [16] WANG Y T, ZHONG B Z, WANG H. Analysis of the structure and antigenicity in ovalbumin modified with six disaccharides through liquid chromatogra-

- phy-high resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(10): 3096-3108.
- [17] YANG Y P, LIU G X, TU Z C, et al. Insight into the mechanism of reduced IgG/IgE binding capacity in ovalbumin as induced by glycation with monose epimers through liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(22): 6065-6075.
- [18] 李海静, 王松, 刘红玉, 等. 超声预处理对海参性腺蛋白酶解物结构特性的影响[J]. *食品科学*, 2023, 44(3): 98-104.
- LI H J, WANG S, LIU H Y, et al. Effect of ultrasonic pretreatment on the structural properties of gonadal proteolytes from sea cucumbers [J]. *Food Chemistry*, 2023, 44(3): 98-104.
- [19] 卜单, 涂宗财, 刘光宪, 等. 不同还原糖糖基化对超声波预处理 α -乳白蛋白结构和抗氧化活性的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(24): 1-10.
- BU D, TU Z C, LIU G X, et al. Effect of different reducing sugar glycation on the structure and antioxidant activity of ultrasonic pretreated α -lactalbumin[J]. *Food Chemistry*, 2022, 43(24): 1-10.
- [20] FU X, LIU Q, TANG C Q, et al. Study on structural, rheological and foaming properties of ovalbumin by ultrasound-assisted glycation with xylose[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 58: 104644.
- [21] 吴熙. 非糖尿病患者果糖胺异常升高2例报道[J]. *检验医学与临床*, 2022, 19(8): 1151-1152.
- WU X. Report of 2 cases of abnormally elevated fructosamine in non-diabetic patients [J]. *Medical Laboratory Science and Clinics*, 2022, 19(8): 1151-1152.
- [22] WANG H, SUN Q, TAN J M, et al. Conformational alteration and the glycated sites in ovalbumin during vacuum freeze-drying induced glycation: A study using conventional spectrometry and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2020, 318: 126519.
- [23] 时海波, 邹焯, 杨恒, 等. 美拉德反应产物生物活性及衍生危害物安全控制研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(22): 325-333.
- SHI H B, ZOU Y, YANG H, et al. Research progress on the safety control of biological activity and derived hazards of Maillard reaction products[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(22): 325-333.
- [24] WANG H Y, QIAN H, YAO W R. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity [J]. *Food Chemistry*, 2011, 128(3): 573-584.
- [25] 王亚君. 丙烯酰胺与类黑精生成量的相关性及其体外代谢初探[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009: 41-49.
- WANG Y J. A preliminary investigation on the correlation between acrylamide and nigrosin-like production and its metabolism in vitro [D]. Hangzhou, Zhejiang Gongshang University, 2009: 41-49.
- [26] 王倩倩. 食品中丙烯酰胺辐照消解技术研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2019: 26-28.
- WANG Q Q. Research on the irradiation ablation technique of acrylamide in foods [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2019: 26-28.
- [27] 关亚飞. 原花青素对油炸食品中丙烯酰胺的抑制作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014: 4.
- GUAN Y F. Research on the inhibitory effect of proanthocyanidins on acrylamide in fried foods [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014: 4.
- [28] 杜冠华, 孙缅恩. 晚期糖基化终产物的病理意义及其机制[J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(3): 246-249.
- DU G H, SUN M E. Pathological significance and mechanisms of end products of advanced glycation[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2002, 18(3): 246-249.
- [29] ZHANG Q Z, WANG Y B, FU L L. Dietary advanced glycation end-products: Perspectives linking food processing with health implications[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(5): 2559-2587.
- [30] 肖军, 黄振峰, 马中希. 血清戊糖素水平与骨质疏松性椎体压缩性骨折相关性研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(6): 865-868.
- XIAO J, HUANG Z F, MA Z X. Research on the correlation between serum pentosidine levels and osteoporotic vertebral compression fractures[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2020, 26(6): 865-868.
- [31] 徐清萍. 食品类黑精的功能、结构及制备研究进展[J]. *中国酿造*, 2008, 27(22): 13-15.
- XU Q P. Research progress on the function, structure and preparation of food melanoidin [J]. *China Brewing*, 2008, 27(22): 13-15.

- [32] 张余, 骆会婷. 食品类黑精的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005, 16(3): 11-13. food melanoidin[J]. China Food Additives, 2005, 16(3): 11-13.
ZHANG C, LUO H T. Research progress on the

Effect of ^{60}Co Gamma Irradiation on the Structure and Glycation Products of Ovalbumin Glycation System

Bian Zhongyue¹, Tu Zongcai^{1,2,3}, Wang Hui¹, Liu Guangxian^{4*}

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

²National R&D Center of Freshwater Fish Processing, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022

³Engineering Research Center of Freshwater Fish High-Value Utilization of Jiangxi Province, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022

⁴Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330299)

Abstract In order to explore the effect of ^{60}Co gamma irradiation on the structure and glycation products of glycation systems, the ovalbumin (OVA) -glucose system under ^{60}Co gamma irradiation at doses of 0, 25, 50, 75 and 100 kGy was regarded as the research object. The molecular weight, tertiary structure, and secondary structure were determined via SDS-PAGE, fluorescence spectroscopy, and far-ultraviolet circular dichroism spectroscopy, respectively. Meanwhile, high performance liquid chromatography and ultraviolet spectrometry were employed to measure the content of detrimental glycation products including fructosamine, acrylamide, fluorescent AGEs, pentosidine, and melanoidin. The results of increased molecular weight, surface hydrophobicity and β -structure (β -sheet and β -turn) content and decreased intensity of intrinsic fluorescence emission peak and α -helix content showed that ^{60}Co gamma irradiation promoted glycation reaction of OVA in a dose-dependent manner. In addition, the fructosamine and acrylamide in the system during irradiation treatment were increased firstly and then decreased, and the highest contents were presented at 50 kGy. Meanwhile, with the increase of dose, the fluorescent AGEs, pentosidine and melanoidin contents were increased. In short, ^{60}Co gamma irradiation dose would be controlled within 25 kGy to reduce detrimental glycation products in egg products and improve their safety during irradiation treatment. This study would provide a scientific proof for expanding the application of food irradiation technology in egg products in the future.

Keywords ovalbumin; ^{60}Co gamma irradiation; glycation system; structure; glycation products