

## 电子束辐照对氨基酸与蛋白质结构的影响

顾可飞<sup>1,2,3</sup> 陈志军<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>(上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所 上海 201403)

<sup>2</sup>(农业部食用菌监督检验与测试中心 上海 201403)

<sup>3</sup>(农业部风险评估实验室 上海 201403)

<sup>4</sup>(上海市农业科学院作物科学研究所 上海 201403)

<sup>5</sup>(上海束能辐照技术有限公司 上海 201403)

**摘要** 为探索辐照处理对农产品蛋白质及氨基酸营养价值的影响,应用质谱及十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术分析电子束辐照后17种氨基酸及牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)结构的变化。结果发现,电子束辐照对8种必需氨基酸中的蛋氨酸影响较大,当吸收剂量为1 kGy时,蛋氨酸质量浓度降低了65%;随着吸收剂量的增加,BSA水溶液发生混浊;SDS-PAGE电泳实验结果发现,辐照处理下BSA同时发生交联和降解反应;质谱分析发现电子束辐照对BSA的二级结构无规则卷曲、弯曲、转角及链内二硫键影响较大。结果表明,蛋氨酸及蛋白质特定的二级结构对电子束辐照相对敏感。

**关键词** 氨基酸,牛血清白蛋白,电子束辐照,结构

**中图分类号** TR699, TL99

**DOI:** 10.11889/j.1000-3436.2019.rj.37.020401

## Influence of electron-beam irradiation on amino acids and protein structure

GU Kefei<sup>1,2,3</sup> CHEN Zhijun<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>(Institute for Agri-food Quality Standards and Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

<sup>2</sup>(Agricultural Products Quality and Safety Risk Assessment Laboratory Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Shanghai 201403, China)

<sup>3</sup>(Supervision and Testing Center for Edible Fungi Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Shanghai 201403, China)

<sup>4</sup>(Institute of Crop Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

<sup>5</sup>(Shanghai SN Irradiation Technology Co., Ltd. Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

基金资助:农业部国家农产品质量安全风险评估项目“食用菌产品特质性营养品质评价与关键控制点评估(GJFP201700604)”、上海市科技兴农项目“电子束辐照在食品病原菌控制中的作用及机制研究”(沪农科攻字2016第6-3-4号)资助

第一作者:顾可飞,女,1977年10月出生,2007年于中国农业科学院研究生院获硕士学位,目前为上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所助理研究员,主要从事食品营养与安全控制,E-mail:xyz694@163.com

通信作者:陈志军,硕士,副研究员,E-mail:13764023962@126.com

收稿日期:初稿2018-09-12;修回2018-11-20

Supported by the Risk of National Ministry of Agriculture of Agricultural Products Quality Safety Evaluation Project "edible fungi products nutrient and quality assessment and critical control point (GJFP201700604)", the Shanghai Municipal Agricultural Commission, P. R. China "Study on the Role and Mechanism of Electron Beam Irradiation in the Control of Food Pathogens" (2016 Hu Nong Ke Gong Zi No.6-3-4)

First author: GU Kefei (female) was born in October 1977, and received her master's degree from Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences in 2007. Now she works at Institute for Agri-food Quality Standards and Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences as an assistant professor, focusing on food nutrition and safety control. E-mail: xyz694@163.com

Corresponding author: CHEN Zhijun, associate professor, E-mail: 13764023962@126.com

Received 12 September 2018; accepted 20 November 2018

**ABSTRACT** In order to explore the influence of irradiation on the nutritional value of protein and amino acids in agricultural products, the effect of electron-beam irradiation on the structure of 17 amino acids contained within bovine serum albumin (BSA) was analyzed by mass spectrometry and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Electron-beam irradiation of BSA significantly influenced content of methionine and of the other 8 essential amino acids. An absorbed dose of 1 kGy decreased the mass concentration of methionine by 65%. Turbidity of aqueous BSA solution increased concomitantly with increasing absorbed dose. This was due to irradiation-induced BSA cross-linking and degradation, as demonstrated by SDS-PAGE. Mass spectrometry analysis revealed various secondary BSA structures (irregular, curl, bend, and corner) and demonstrated susceptibility of two sulfur bonds in the amino acid chain to radiation.

**KEYWORDS** Amino acids, Bovine serum albumin, Electron-beam irradiation, Structure

**CLC** TR699, TL99

$\gamma$ 射线、电子束及X射线辐照作为冷杀菌食品贮藏保鲜技术,受到国内外学者的广泛关注。目前,国内应用最广泛的是以 $^{60}\text{Co}$ 为放射源的 $\gamma$ 射线及高能电子束辐照技术。电子束辐照加工技术无放射性污染等安全问题,是一种理想的辐照技术<sup>[1]</sup>。中国“十一五”、“十二五”期间对食品电子束辐照研究加大支持力度。辐照加工技术对辐照食品品质存在正负两方面的影响,有研究表明,高剂量辐照可使肉的颜色改变,加速脂肪氧化等<sup>[2]</sup>;也有相当多的研究报道,辐照对食品的营养成分及营养价值影响不大,且可提高营养成分的利用率<sup>[3-11]</sup>;而有关辐照对氨基酸和蛋白质结构及营养价值的影响报道比较少见。耿胜荣等<sup>[12]</sup>研究表明,经射线和电子束辐照后,牛血清蛋白的二级结构发生变化,螺旋含量先升后降,折叠含量先降后升,无规则卷曲含量始终呈上升趋势,同时发现,牛血清蛋白质发生交联和降解反应。本文以氨基酸标准品及牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)为研究对象,初步分析辐照作用下氨基酸及蛋白质不同二级结构对辐照的敏感性以及剂量效应关系,为改进电子束辐照技术对食品感官品质的影响提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与材料

ESS-010-03型电子直线加速器,射线能量为10 MeV,功率10 kW,日本IHI公司;L-8900氨基酸自动分析仪,日本IHI公司;5800 MALDI-TOF/TOF, AB Sciex;紫外分光光度仪,UV-2100型,尤尼柯(上海)仪器有限公司;DYY-6C型电泳仪、DYCZ-24D型垂直电泳仪,北京六一仪器

厂。 $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_3$ ,分析纯,北京化学试剂有限公司;丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠、巯基乙醇、低相对分子质量标准蛋白质,美国Sigma公司;牛血清白蛋白(BSA)、17种氨基酸标准品、ProteoMass Peptide & Protein MALDI-MS Calibration Kit、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA),美国Sigma公司;样品靶,美国应用生物系统公司(AB SCIEX)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 溶液的配制

氨基酸溶液配制:取氨基酸固体,用蒸馏水配制成浓度为0.25 nmol/L的溶液(17种氨基酸:丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、天冬氨酸(Asp)、胱氨酸(Cys)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、蛋氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、酪氨酸(Tyr))。

BSA溶液配制:取适量BSA固体,用蒸馏水配制,质量浓度10 mg/mL。

#### 1.2.2 辐照处理

1.2.1节中氨基酸及BSA溶液分装于1 mL离心管,均以重铬酸银(<4 kGy)和重铬酸钾( $\geq$ 4 kGy)做化学剂量的计量跟踪剂,剂量率为5.6 kGy/h( $\leq$ 1 kGy)和16.8 kGy/h( $>$ 1 kGy),辐照设置吸收剂量0(对照组CK)、1、2、4、6、8、10 kGy,重复3次。

#### 1.2.3 氨基酸浓度的测定

氨基酸测定参考GB/T5009.124-2003《食品中氨基酸的测定》方法<sup>[13]</sup>。

### 1.2.4 SDS-PAGE 电泳实验

辐照处理后 BSA 酶液分别经质量浓度为 15% 分离胶、5% 浓缩胶和 8% 分离胶、5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳分离，具体方法参见文献 [14]。

### 1.2.5 BSA 相对分子质量测定

取 1  $\mu\text{L}$  蛋白样品点至样品靶上，自然干燥后再取 0.6  $\mu\text{L}$  的 CHCA 基质溶液点至对应靶位上并自然干燥。用相同的方法在样品靶位相邻位置点标准品。在正离子模式下选择反射方法对样品测试范围进行校准测试。校准标准物质为反射校准物质，校准范围为：1 046.542 $\pm$ 0.500、1 533.858 $\pm$ 0.500、2 465.199 $\pm$ 0.500、3 494.651 $\pm$ 0.500。在正离子模式下选择反射方法测试样品的相对分子质量。5800 MALDI-TOF/TOF 产生的原始数据及图谱由 4000 Series Explorer V3.5 软件导出。

### 1.2.6 数据分析

氨基酸溶液测定所得数据由 SAS 8.2 软件通过一般线性模型 (General linear model, GLM) 进行显著性分析，分析方法为邓肯多重范围检验 (Duncan' smultiple range tests)，显著性水平为  $p < 0.05$ 。BSA 相对分子质量、二级结构及氨基酸序列分析通过 DNASTar 软件 Protean 进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 辐照后氨基酸的浓度变化及分析

辐照氨基酸的质量浓度变化见图 1。由图 1 可知，当吸收剂量为 1 kGy 时，胱氨酸和蛋氨酸质量浓度分别降低了 65% 和 52%，酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、脯氨酸质量浓度均略有下降，其它氨基酸在低剂量 ( $\leq 4$  kGy) 辐照处理下浓度变化不大。当吸收剂量为 10 kGy 时，胱氨酸质量浓度降低了 80%，蛋氨酸未检出，酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、脯氨酸质量浓度也大幅度降低，其它氨基酸质量浓度均有不同程度降低。以上结果分析认为 (详见图 2 中 (a) 和 (b))，胱氨酸和蛋氨酸均含有 C-S 键，此键可能对辐照比较敏感，在辐照作用下容易发生断裂或重组，而酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、脯氨酸结构中均含有环状结构，环状结构在辐照作用下也不稳定。有研究表明<sup>[15-17]</sup>：羟基自由基 (电子束辐照产生主要自由基之一，是辐照间接作用因子) 氧化可使蛋白质的总巯基及活性巯基的含量都有着不同程度地减少；使表面疏水性和羰基含量均随着氧化剂浓度的增加和氧化时间的延长而增加；使蛋白质的二级结构也发生了改变。结果表明，低剂量电子束辐照 ( $\leq 4$  kGy) 对必需氨基酸蛋氨酸的影响较大，对其它必需氨基酸影响不大 (色氨酸未测)。

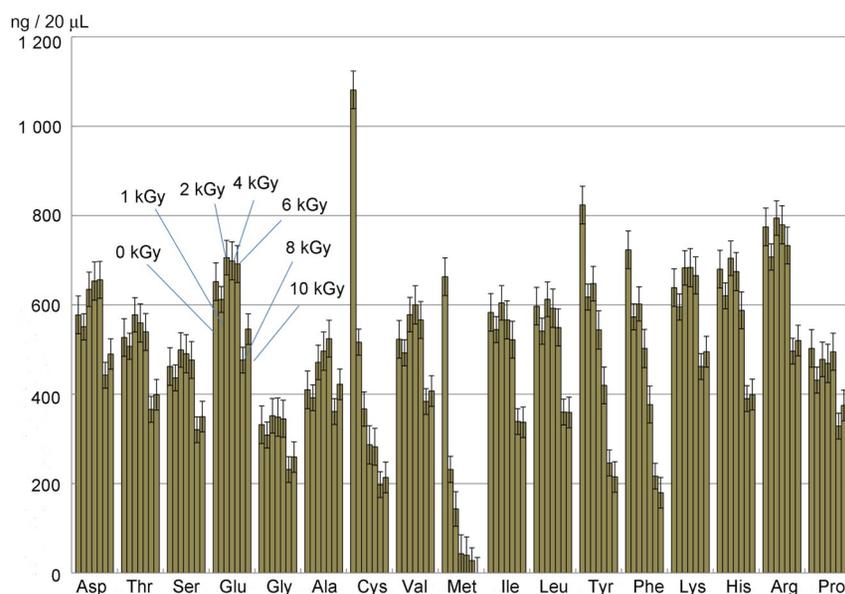


图 1 辐照后氨基酸浓度  
Fig.1 Amino acid concentrations after irradiation

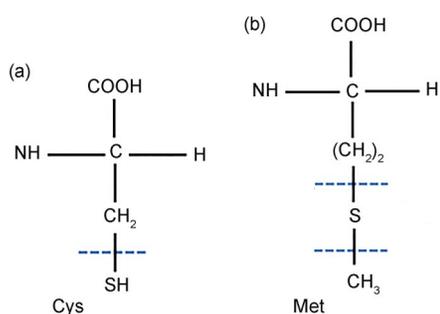


图2 半胱氨酸与蛋氨酸结构图  
Fig.2 Structures of cysteine and methionine

## 2.2 辐照对BSA溶解性的影响

辐照处理后BSA溶解性见图3。由图3可知，随着吸收剂量的增加，BSA水溶性逐渐下降，在吸收剂量为4~6 kGy时，BSA水溶液中出现微细絮状沉淀；当剂量 $\geq 8$  kGy时，出现了大量絮状沉淀，表明BSA疏水性随着吸收剂量的增加而增大。分析认为，辐照处理导致BSA的蛋白质立体结构及二级结构发生改变，疏水键外露，或是聚合反应以及发生一级结构肽键断裂等所致。

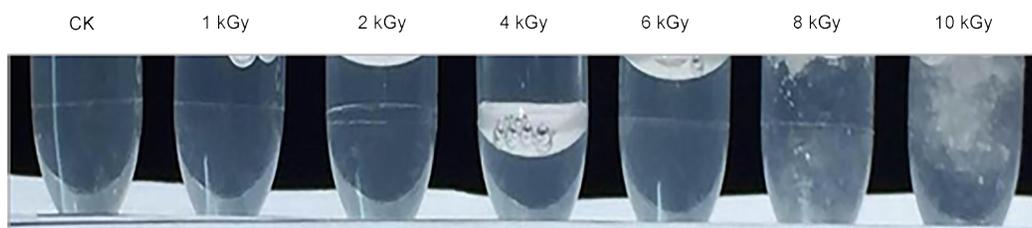


图3 辐照后BSA的溶解度变化  
Fig.3 Changes of BSA solubility after irradiation

## 2.3 BSA的SDS-PAGE电泳实验

辐照处理后BSA经SDS-PAGE分离，结果见图4。从图4可见，随着吸收剂量的增加出现了部分相对分子质量大于和小于BSA的蛋白质，说明BSA肽链部分发生断裂和聚合。具体从图4 (a)

可见，当吸收剂量为2~6 kGy时，出现了相对分子质量约为13、22、33 kDa以及43~66 kDa的蛋白质；从图4 (b)可见，当吸收剂量为2~4 kGy时，出现了明显的相对分子质量大的蛋白条带，表明辐照处理下，BSA发生少量聚合反应。

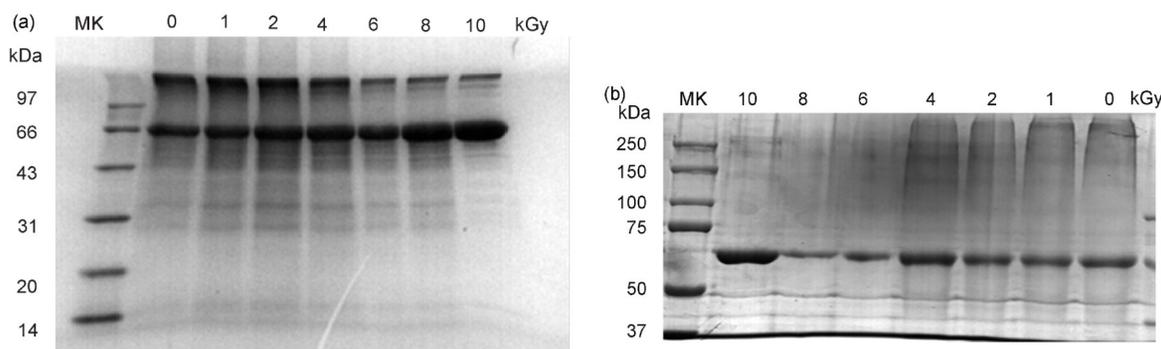


图4 辐照处理后BSA电泳结果:(a) A; (b) B  
Fig.4 BSA electrophoretic results A after irradiation: (a) A; (b) B

## 2.4 辐照处理对BSA相对分子质量及结构的影响

BSA分子二级结构见图5，辐照处理后BSA经MALDI-TOF/TOF质谱检测结果见图6。假设BSA分子肽链发生断裂时，断裂后碎片蛋白质相对分子质量总和约为BSA相对分子质量，即当BSA断裂为2个蛋白质A和B时， $M_A + M_B \approx M_{BSA}$  ( $M$ 为相对分子质量(kDa))，断裂为更多蛋白质时以此类

推(参考2.1节适当考虑蛋氨酸和胱氨酸巯基侧链丢失)。

在此假设前提下，从图6结果可见，相对分子质量分别为13 309和53 504、22 375和43 662、33 396等3组蛋白质。通过Protean蛋白质相对分子质量与氨基酸序列关系软件分析，13 309和53 504一组蛋白质可能由肽链N端第116~117或第465~467位氨基酸附近肽链断裂产生，22 375

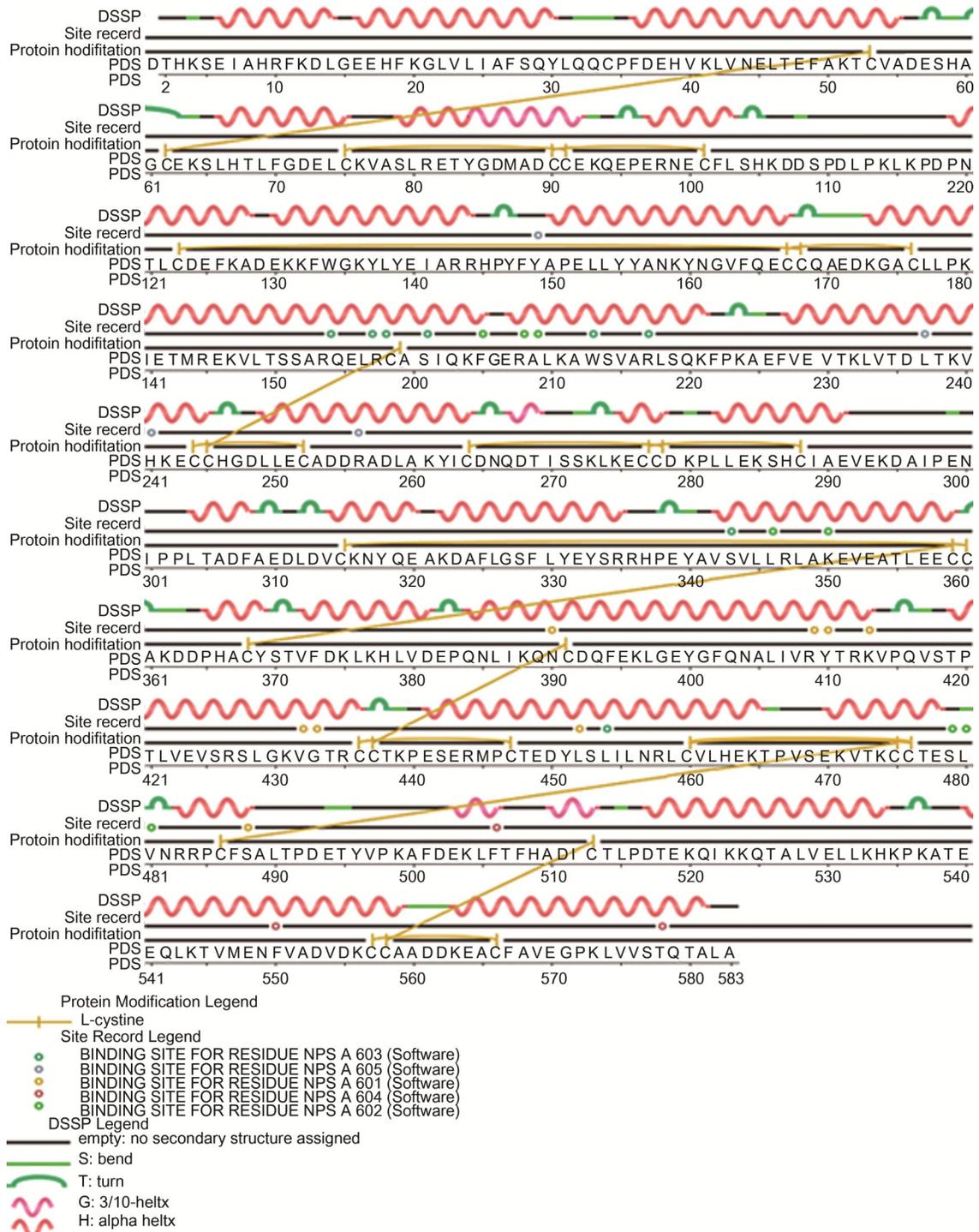


图5 BSA 二级结构(来源于 PDB ID: 4OR0)

Fig.5 Secondary structure of BSA (derived from PDB ID: 4OR0)

和 43 662 一组蛋白质可能由肽链 N 端第 193~194 或第 380~381 位氨基酸附近断裂产生, 33 396 蛋白质可能是由 BSA 肽链在 N 端第 290~291 位氨基酸附近断裂产生。参考图 5 BSA 二级结构图(适当考虑蛋氨酸和胱氨酸侧链丢失)分析, BSA 的 N 端第 116~117 位附近肽链的二级结构为无规则卷曲, 第 465~467 附近肽链二级结构为无规则卷曲或

弯曲, 193~194 附近肽链位于链内二硫键区域, 第 380~381 位附近肽链位于二级结构肽链转角区域, 第 290~291 位则为肽链无规则卷曲区域。综上分析推论, 电子束辐照后 BSA 肽链断裂多发生于 BSA 蛋白质无规则卷曲、转角及链的二硫键区域, 表明蛋白质结构中无规则卷曲、转角及二硫键等结构对辐照处理更为敏感。有研究表明, 鱼虾类过

敏原致敏活性对辐照较为敏感<sup>[18-19]</sup>,这可能是过  
敏原的抗原表位80%位于以上二或三级结构区域所

致,这一结果也同时说明辐照对不同蛋白质生物  
活性影响具有的差异性。

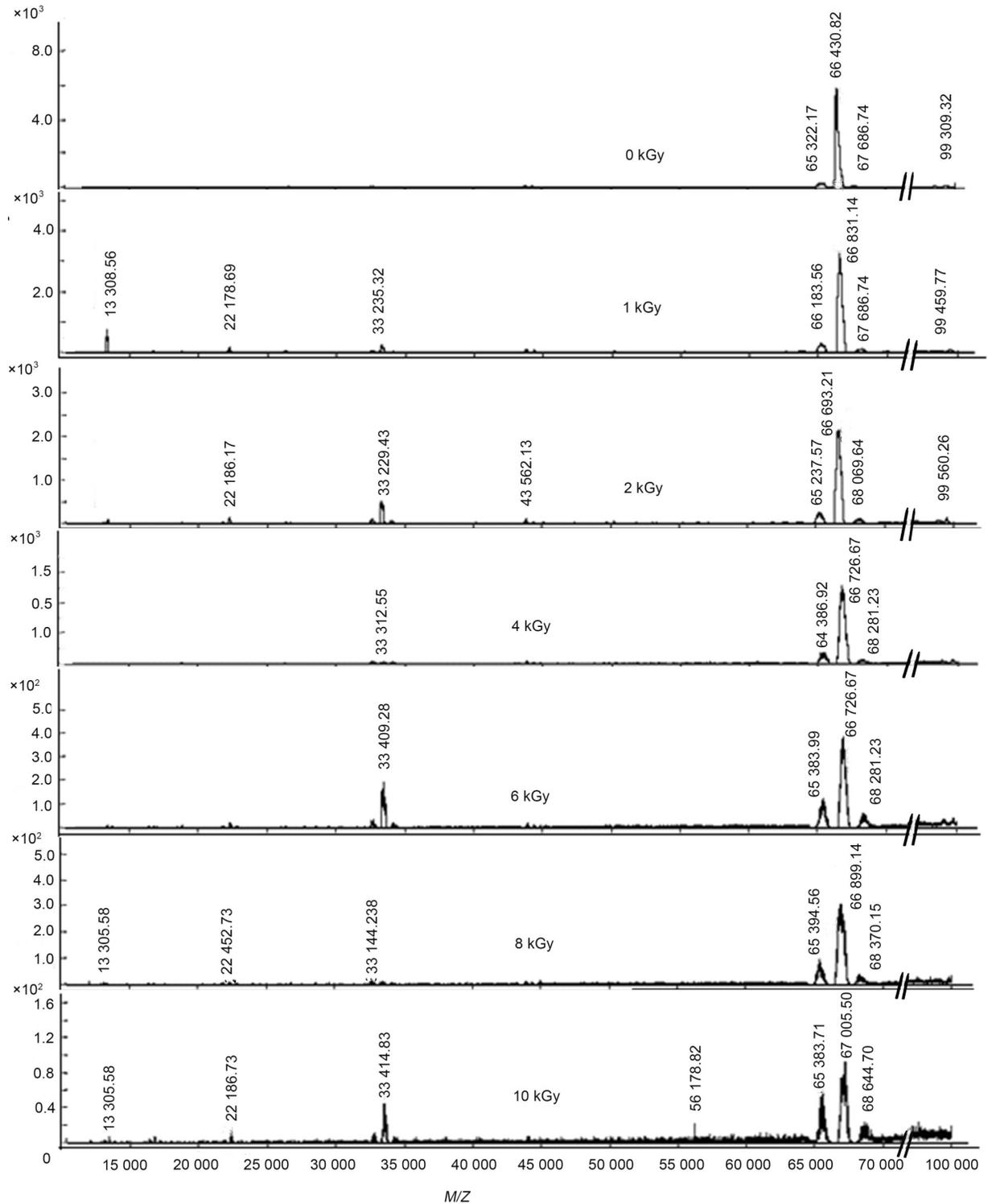


图6 辐照处理后BSA的质谱检测结果  
Fig. 6 Mass spectrometric results of BSA after irradiation

### 3 结论

电子束辐照技术在农产品保鲜领域已被广泛应用，辐照对农产品营养成分的影响也有研究，但对营养成分的营养价值及功能成分活性的影响少有报道，本文从构成蛋白质的氨基酸，特别是人体必需氨基酸及蛋白质的二级结构的角度分析了电子束辐照处理后蛋白质不同二级结构及氨基酸结构的变化，进一步分析电子束辐照对氨基酸及蛋白质营养价值的影响。实验结果表明，辐照对人体必需氨基酸蛋氨酸影响较大，因此，对含水量较大的农产品应用辐照处理时须谨慎选择保鲜技术或辐照处理的剂量。其次，蛋白质的二级结构无规则卷曲、转角及链内、甚至链间的二硫键等高级结构对辐照相对敏感，这可能对具有生理功能活性蛋白质的活性造成不同程度的影响，相关活性影响还有待于进一步的研究。综上所述，本研究对辐照技术在农产品加工领域应用的优化与完善具有一定的理论意义。

### 参考文献

- 汪勋清. 食品辐照加工技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.  
WANG Xunqing. Food irradiation processing technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- Girou M, Lacroux M. Nutritional adequacy of irradiated meat—a review[J]. Food Research International, 1998 (31): 257-264. DOI: 10.1016/s0963-9969(98)00092-1.
- Bhat R, Sridhar K R. Nutritional quality evaluation of electron beam-irradiated lotus (*Neumbo nucifera*) seeds [J]. Food Chemistry, 2008(107): 174-184. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.002.
- Fan X, Niemira B A, Sokorai K J B. Sensorial nutritional and microbiological quality of fresh cilantro leaves as influenced by ionizing irradiation and storage[J]. Food Research International, 2003, 36(7): 713-719. DOI: 10.1016/s0963-9969(03)00051-6.
- Fan X, Niemira B A, Sokorai K J B. Assessment of radiation sensitivity of fresh-cut vegetables using electrocyte leakage measurement[J]. Assessment Postharvest Biololgy Technology, 2005, 36(2): 191-197. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2004.12.004.
- Goularte L, Martins C G, Morales Aizpurual I C, *et al.* Combination of minimal processing and irradiation to improve the microbiological safety of lettuce (*Lactuca satival*)[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2004, 71(1-2): 155-159. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2004.03.076.
- Johnson A M, Resurreccion A V A. Sensory profiling of electron-beam irradiated ready-to-eat poultry frankfurters [J]. LWT-Food Science and Technolog, 2009(42): 265-274. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.05.009.
- Kim H J, Yun H J, Jung S, *et al.* Effects of electron beam irradiation on pathogen inactivation, quality, and functional properties of shell egg during ambient storage [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2010, 30(4): 603-608. DOI: 10.5851 / kosfa.2010.30.4.603.
- Shawrang P, Sadeghi A A, Zareshahi H, *et al.* Study of chemical compositions, anti-nutritional contents and digestibility of electron beam irradiated sorghum grains [J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 376-379. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.010.
- Moreno M A, Castell-Perez M E, Gomes C, *et al.* Quality of electron beam irradiation of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) at medium dose levels (1.0-3.2 kGy)[J]. Swiss Society of Food Science and Technology, 2007, 40 (7): 1123-1132. DOI: 10.1016/j.lwt.2006.08.012.
- 冯晓琳, 王晓拓, 王丽芳, 等. 电子束辐照对真空包装冷鲜猪肉品质的影响[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2): 22-28. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2015.02.019.  
FENG Xiaolin, WANG Xiaotuo, WANG Lifang, *et al.* Effects of electron-beam irradiation on fresh pork quality in vacuum-packaged[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(2): 22-28. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2015.02.019.
- 耿胜荣, 程薇, 廖涛, 等. 射线和电子束辐照对牛血清蛋白结构的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(12): 331-332. DOI: 10.13982/j.msft.1673-9078.2016.12.033.  
GENG Shengrong, CHENG Wei, LIAO Tao, *et al.* Effects of  $\gamma$  rays and electron beam irradiation on bovine serum albumin structure[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(12): 331-332. DOI: 10.13982 / j.msft.1673-9078.2016.12.033.
- 中华人民共和国卫生部. 食品中氨基酸的测定: GB/T 5009.124-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. Determination of amino acids in foods: GB/T 5009.124-2003 [S]. Beijing: China Standard Press, 2004.
- 顾可飞. 辐照对虾过敏原生化性质及抗原性的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.  
GU Kefei. Effect of irradiation on bio-chemistry

- and antigenic properties of allergen in shrimp[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007.
- 15 章银良, 杨慧, 安巧云. 羟自由基诱导蛋白质氧化损伤的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2012, **31**(3): 313-318. DOI: 10.3969/j.issn.1673-1689.2012.03.015.
- ZHANG Yinliang, YANG Hui, AN Qiaoyun. Study on protein oxidation induced by hydroxyl radicals[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, **31**(3): 313-318. DOI: 10.3969/j.issn.1673-1689.2012.03.015.
- 16 牛思思, 汪建明, 贺雅欣, 等. 羟基自由基氧化对蛋清蛋白质结构的影响[J]. 食品工业科技, 2017, **3**(8): 113-117. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.014.
- NIU Sisi, WANG Jianming, HE Yaxin, *et al.* Effect of hydroxyl radical oxidation system on structure of egg white protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, **3**(8): 113-117. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.014.
- 17 张立敏. 电子束辐照技术对鱼类过敏原活性及质构的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- ZHANG Limin. Effects of electron beam irradiation on the activity and texture of fish allergen[D]. Qingdao: Chinese Marine University, 2013.
- 18 顾可飞, 高美须, 李春红, 等. 辐照对虾过敏原抗原性的影响[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, **19**(2): 102-105. DOI: 10.3969/j.issn.1004-8456.2007.02.002.
- GU Kefei, GAO Meixu, LI Chunhong, *et al.* Effect of irradiation on antigenic properties of allergen in shrimp [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2007, **19**(2): 102-105. DOI: 10.3969/j.issn.1004-8456.2007.02.002.