

外加旋转流场对蛋白分子空间构象的影响

潘伟春, 顾斐娜, 赵萌迪, 蔡枫桦, 温 娅, 徐海星, 牛付阁*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

摘要 目的:研究不同外加旋转流场对溶菌酶分子空间结构的影响,有利于高蛋白质含量的食品加工。方法:借助旋转流变仪在溶菌酶溶液中施加剪切流场,采用圆二色光谱、紫外吸收及二阶导数光谱、荧光发射光谱以及动态光散射技术进行表征,研究剪切流场对溶菌酶分子二级结构、三级结构的影响。结果:在剪切流场转速高于 200 s^{-1} 或持续作用时间大于 1.5 h 时,溶菌酶分子 α -螺旋结构比例降低以及无序结构比例增高,紫外吸收光谱发生蓝移,原本存在于分子内部的色氨酸残基极性增强。这种变化是不可逆的且随着剪切流场的转速增大、作用时间的延长和溶菌酶分子的浓度降低表现得更为显著。结论:剪切流场会对溶菌酶分子造成不可逆的构象改变,且剪切速率越大,作用时间越长,构象改变越显著。

关键词 剪切流场; 溶菌酶; 二级结构; 三级结构

文章编号 1009-7848(2024)12-0048-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.12.005

在运动的流体系统中,由于黏性的存在,流体分子与固体表面分子之间的相互作用产生剪切应力。蛋白质是人体必需的营养物质,蛋白质分子结构变化直接影响富含蛋白质食品的品质和特性,以及蛋白质分子在人体内的消化吸收^[1]。由于决定蛋白质分子结构的相互作用比较弱,外界环境条件(如温度、pH 值、压力、溶剂组成或机械应力)的变化都能破坏这些作用力,进而改变蛋白分子的构象^[2-3]。对于流场中的剪切应力对蛋白分子构象的影响,国外学者的研究结果不一致,甚至是矛盾的^[4-7],而国内鲜见研究报道。在食品加工过程中,伴随着物料输送和混合搅拌的剪切流场是不可避免的。然而,许多食品工作者受限于“剪切变流场中蛋白分子构象变化可以或略不计”的这一观点,被 Charm 等^[8]的研究成果所否定;他们发现剪切速率和时间的乘积才是决定流场中蛋白分子构象稳定的关键参数。由于短暂时间内的高剪切和长时间的低剪切是食品加工中很常见的现象,这也是开展本研究的动因之一。

关于流场对食品中蛋白分子构象影响的研

究,存在 3 个挑战。1)空间和时间维度上控制流场内的速度梯度;2)食品是一个极其复杂的体系^[9],含几十到上百种化合物,且不少是生物大分子,如蛋白质、多糖、DNA 等生物大分子,这赋予食品体系很典型的非牛顿流体^[10];3)从热力学角度而言,不少食品体系是物质分布高度不均一的非稳态体系。因此,流体内流场速度分度方程、试验条件(如试验时间、温度等)的确定,都非常困难。此外,食品中的大分子物质间往往存在各种相互作用,促进各种复合体的形成^[11],这进一步限制剪切流场对食品蛋白分子物化性质的影响研究。这些要求食品科学研究者建立一个简化的食品体系,大幅度减少体系所含的化合物种类,并能表征体系中主要成分间的相互作用。

溶菌酶是一种具有抗菌活性的酶,作为防腐剂被广泛应用于牛奶、沙拉、葡萄酒等食品中^[12]。同时它也是许多蛋类食品的重要蛋白成分。另外,鸡蛋蛋白溶菌酶是最早商业化的蛋白之一,它的分子结构和理化性质已被系统研究,因此它被作为一种理想的模型蛋白,用于蛋白质空间构象及酶学性质等方面的研究。

在受控条件下,本文选择溶菌酶作为研究模型,研究水溶液中溶菌酶分子在剪切流场作用下其蛋白分子构象变化及其机制,为合理设计食品工艺,优化加工过程,提高食品风味乃至产品质量提供参考。

收稿日期: 2023-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171713,31701650);
浙江省自然科学基金项目(LY22C200009,LY17C200004)

第一作者: 潘伟春,男,博士,教授

通信作者: 牛付阁 E-mail: niufg123@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡蛋清溶菌酶 (L6876), 40 000 U/mg, 美国 Sigma 试剂公司; 溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*), BR, 上海瑞永生物科技有限公司; 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4), AR, 杭州捷诚生物科技有限公司; 磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4), AR, 杭州捷诚生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

旋转流变仪 (MCR302), 奥地利 Anton Paar 有限公司; 荧光分光光度计 (G9800A), 美国 Agilent 公司; 紫外分光光度计 (UV2600), 日本岛津公司; 一体式激光散射仪 (ALV/CGS-3), 德国 ALV 公司; 分析天平 (ME204E), 梅特勒-托利多仪器有限公司; 实验室 pH 计 (FE20), 梅特勒-托利多仪器有限公司; 数显恒温磁力搅拌器 (85-2), 金坛市江南仪器厂; 超纯水装置 (Milli-Q), 美国 MILLIPORE 公司。

2 试验方法

2.1 蛋白样品溶液

Milli-Q 制备的超纯水溶解一定量的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠得到 10 mmol/L、pH 6.2 的磷酸盐缓冲液; 再以此缓冲液溶解一定量的溶菌酶粉末, 制备质量浓度分别为 10, 50, 100 mg/mL 的溶菌酶溶液。

2.2 剪切流场处理方法

在室温条件下, 用安东帕旋转流变仪 (MCR302, 奥地利), 选用同轴圆筒双间隙 (型号: DG26.7) 转子系统, 在溶菌酶溶液中形成同心圆运动的流场, 样品体积为 3.5 mL。选择静态剪切模式, 剪切速率: 50, 200, 500 和 1 000 s^{-1} ; 剪切时间: 0.5, 1.5, 2.5 和 3.5 h; 每次测试重复进行 3 次。

2.3 溶菌酶二级结构的分析方法

2.3.1 远紫外区圆二色谱 (CD) 光谱的测定 CD 色谱仪 (J-815 型, 日本 JASCO 公司) 和 0.1 cm 石英 CD 比色管在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下记录远紫外范围 (250~200 nm) 的 CD 光谱, 所有样品的蛋白质量浓度保持在 0.1 mg/mL; 不含蛋白的相应溶液作为空白。扫描速率、响应时间和灵敏度分别设置为 50 nm/min、0.25 s、1.0 nm 和 0.1 $^{\circ}$, 每个样品平行测试 3 次。采

用 Jasco J-815 色谱仪提供的蛋白质二级结构估计程序^[13]进行分析, 取蛋白平均残基浓度 MRW 为 110 g/mol。

2.3.2 溶菌酶活性的测定 磷酸缓冲液溶解壁微球菌粉末得到最终质量浓度为 20 mg/mL 的底物溶液, 同时溶菌酶溶液用磷酸缓冲液稀释至 0.1 mg/mL。以底物溶液在 450 nm 处的 OD 值 (OD_{450}) 作为零时读数, 在 2.3 mL 底物溶液加入 0.1 mg/mL 溶菌酶溶液 0.3 mL 并使其均匀分布, 间隔 60 s 读取 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, 平行测试 3 次以上。在本试验中, 酶活力单位定义为每分钟 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值下降 0.001 为一个酶活单位, 每毫升溶菌酶溶液的酶活力 (U/mL) = $(\Delta\text{OD}_{450\text{nm}}/\text{min}) \times 10^3 / 0.3$ 。

2.4 溶菌酶三级结构的分析方法

2.4.1 紫外吸收及二阶导数光谱的测定 以磷酸盐缓冲液为空白液, 将剪切处理前后的溶菌酶溶液用磷酸盐缓冲液稀释到 0.1 mg/mL, 用 UV-2600 紫外分光光度计 (UV2600, 日本岛津公司) 进行扫描, 扫描波长范围为 190~400 nm, 扫描速度为 50 nm/min, 试验设置温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.2 荧光发射光谱的测定 以磷酸盐缓冲液为空白液, 将溶菌酶溶液浓度稀释到 0.1 mg/mL, 用荧光分光光度计 (G9800A, 美国 Agilent 公司) 测定剪切处理前后溶菌酶的荧光光谱。为避免溶菌酶分子内部酪氨酸的贡献, 以 295 nm 为激发波长 (专一地激发色氨酸残基), 扫描发射波长范围为 300~500 nm, 扫描速度为 1 000 nm/min, 激发和发射狭缝宽分别为 2.5 nm 和 5.0 nm, 试验温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.3 动态光散射测定 利用激光光散射仪 (ALV/CGS-3, 德国 ALV 公司) 对剪切处理前后的溶菌酶粒径进行分析。将剪切处理前后的溶菌酶溶液稀释至合适浓度, 装入丙酮淋洗过的光散射专用试管, 测试角度选择 90 $^{\circ}$, 温度设为 25 $^{\circ}\text{C}$, 每次测试 60 s, 每个样品至少重复测 3 次^[14]。

3 结果与讨论

3.1 剪切流场对溶菌酶二级结构的影响

如图 1 所示, 剪切处理前的溶菌酶在波长低于 240 nm 的区域有比较明显的吸收, 并且在 208 nm 和 222 nm 处出现两个显著的负吸收峰, 是 α -

螺旋结构的特征峰,这一结果与 Ashrafi 等^[15]研究结果相一致。由图 1a 可知,对比未经剪切流场处理的样品,当剪切时间不变时,随着剪切速率的递增,溶菌酶在 208 nm 和 222 nm 两处的吸收峰强度降低,并在 220~230 nm 的波长范围内出现相反方向的吸收峰。以上结果表明,随着剪切速率的递增,溶液中溶菌酶分子的 α -螺旋结构比例降低以及无序结构比例增高。在图 1b 中,随着剪切时间的增长,剪切流场对于蛋白质的影响不断积累,且与图 1a 剪切速率的影响相似,即在剪切速率不变的情况下,剪切时间越长,溶菌酶分子二级结构的变化越明显。这一结果也进一步验证了 Charm 等^[8]的研究成果。蛋白质分子从 α -螺旋结构向其它二级结构变化时,该事件的变化概率遵循波尔兹曼分布,流场剪切的存在,降低了这一变化的能垒,剪切速率越大,该变化的能垒降低的越多,因此,大剪切速率导致更多的 α -螺旋结构被破坏。同

时,长时间的剪切处理意味着溶液中更多蛋白分子的二级结构被破坏因为该结果决定于波尔兹曼分布预测的变化概率乘以处理时间。此外,组成 α -螺旋结构的肽键偶极矩相互叠加,形成定向偶极矩。外加剪切流场与定向偶极矩之间可以发生耦合作用而破坏 α -螺旋结构^[16]。

在图 1c 中,相同条件的外加流场作用于不同浓度的溶菌酶溶液, α -螺旋结构的特征峰均有不同程度的降低,高浓度的溶菌酶溶液在维持其二级结构方面占据优势。造成以上维持二级结构能力差距的原因可能是来自于拥挤效应(Crowding effect)^[17-19]。蛋白质分子发生变性时,其分子在溶液中所占据的体积变大,高浓度的蛋白分子显然不利于这一变化。

图 1d 展示了在保持溶菌酶浓度以及剪切条件相同的情况下,将经剪切处理的溶菌酶溶液贮存于 4 °C 避光环境中,并在不同贮存时间点测量

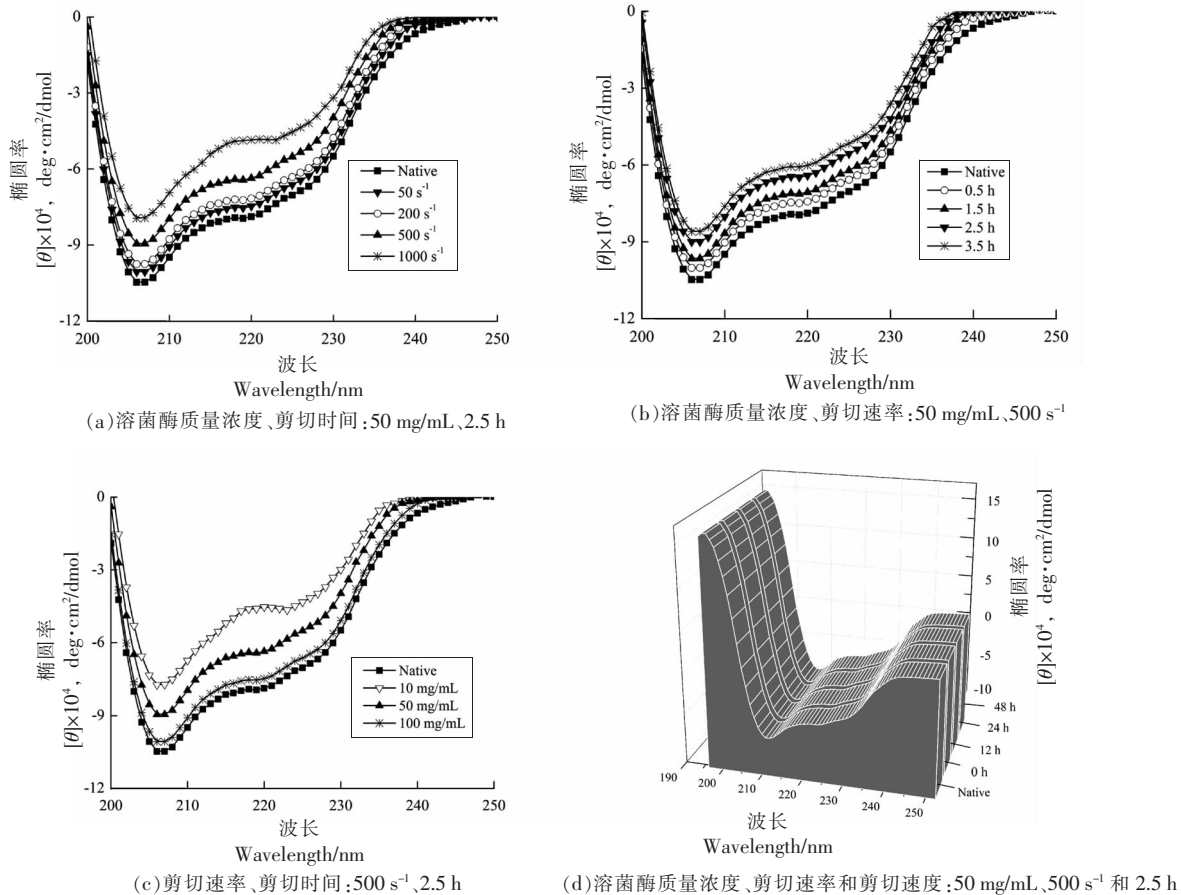


图 1 不同剪切条件下溶菌酶远紫外区 CD 光谱

Fig.1 The lysozyme far-ultraviolet CD spectrum under different shear conditions

溶菌酶 CD 色谱,在各个选取的时间点中,圆二色谱均没有发生显著改变,说明随着贮存时间的延长溶菌酶的二级结构没有发生改变,即剪切流场对于蛋白质二级结构的改变是不可逆的。

3.2 剪切流场对溶菌酶三级结构的影响

3.2.1 紫外吸收二阶导数光谱分析 根据图 2a、图 3a 所示,溶菌酶水溶液经剪切流场处理后,溶菌酶分子在 190~400 nm 范围内的紫外吸收光谱均发生了显著蓝移,且偏移量随剪切速率的增大和作用时间的延长而变大,即剪切流场对溶菌酶分子的三级结构的影响越大^[20],这和对二级结构的影响相一致。图 4a 中 3 种不同浓度的溶菌酶溶液经过相同的剪切处理后,其紫外吸收光谱也发生了蓝移,且浓度越小,蓝移越明显,由于色氨酸、

酪氨酸和苯丙氨酸在 280 nm 附近均有特征谱峰,并且谱峰信号相互叠加而难以分辨,通过对紫外吸收光谱进行二阶导数光谱分析以获得更多有关溶菌酶结构的信息^[21]。Ragone 等^[16]通过计算波峰和波谷的距离来专一的判断酪氨酸残基所处微环境的极性变化。

如图 2b 所示,对溶菌酶溶液分别施加 200, 500 s^{-1} 和 1 000 s^{-1} 的剪切流场时,a/b 的值从 0.52 分别减少到 0.50,0.47 和 0.42;在图 3b 中可以得到相似的现象:溶菌酶经过 1.5,2.5 h 和 3.5 h 的剪切流场分别持续作用后,a/b 的值从 0.52 分别减少到 0.51,0.47 和 0.45。说明经过剪切流场的作用,溶菌酶的三维构象发生改变,原本处于溶菌酶分子内部的酪氨酸残基裸露于蛋白质表面,酪氨

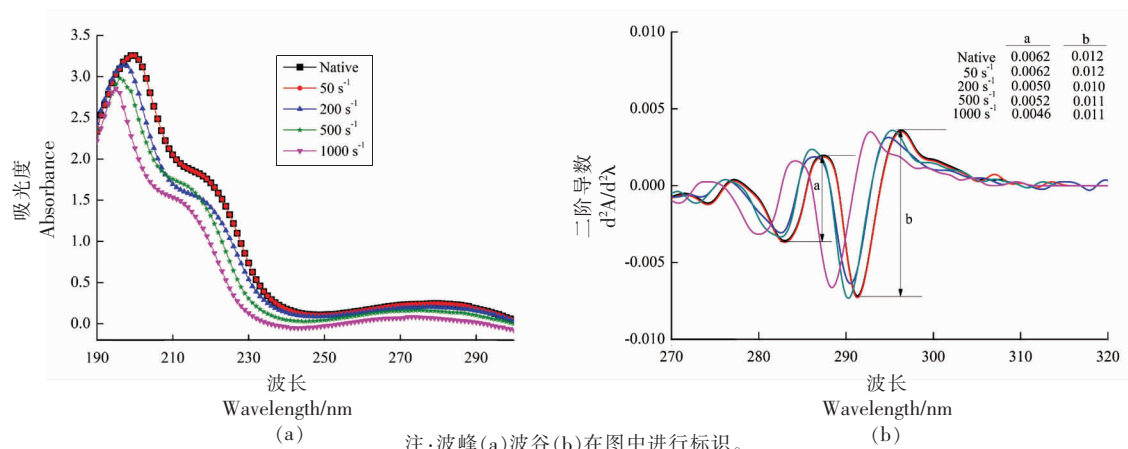


图 2 剪切流场持续作用 2.5 h 前后溶菌酶溶液的紫外吸收光谱 (a)、二阶导数光谱 (b)

Fig.2 UV absorption spectrum (a), second derivative spectrum (b) of lysozyme solution before and after 2.5 h continuous application of shear flow field

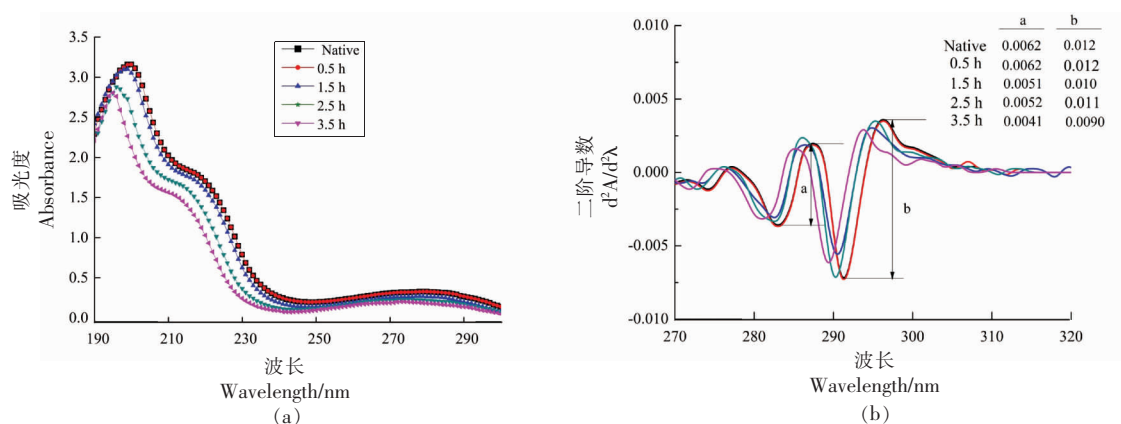


图 3 剪切流场持续作用不同时间前后溶菌酶溶液的紫外吸收光谱 (a) 和二阶导数光谱 (b)

Fig.3 UV absorption spectrum (a) and second derivative spectrum (b) of lysozyme solution before and after continuous application of shear flow field for different times

酸残基所处微环境变得更为疏水。但在图 2b 中剪切速率为 50 s^{-1} 和图 3b 中剪切流场作用时间为 0.5 h 时,二阶导数光谱相比未经处理的溶菌酶没有显著变化,可能是经这些条件处理所得的溶菌酶分子的三级结构变化较轻微,低于此检测方法的检测限。

在图 4b 中,相同的剪切流场作用于 10,50 mg/mL 和 100 mg/mL 的溶菌酶溶液,紫外二阶导

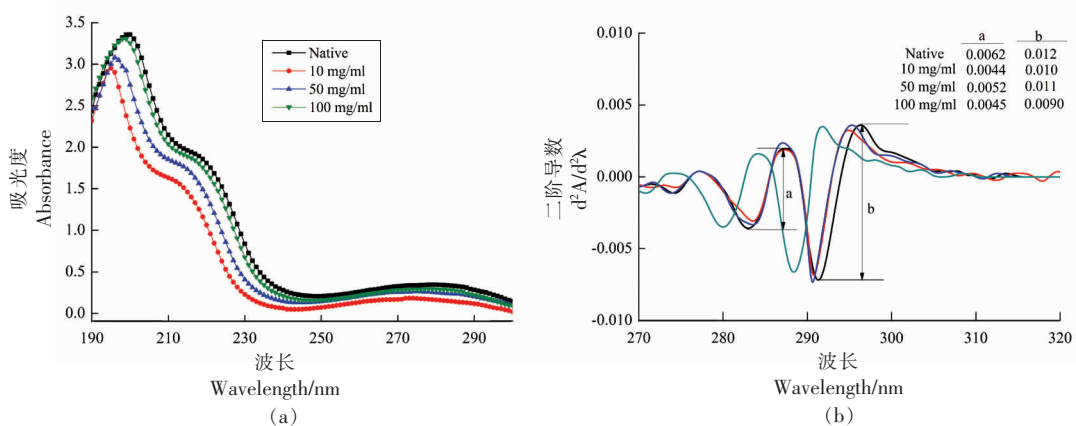


图 4 不同浓度溶菌酶溶液经剪切流场作用后的紫外吸收 (a) 及其二阶导数光谱 (b)

Fig.4 The spectrum of lysozyme solutions with different concentrations subjected to a shear flow field UV absorption (a) and second derivative spectra (b)

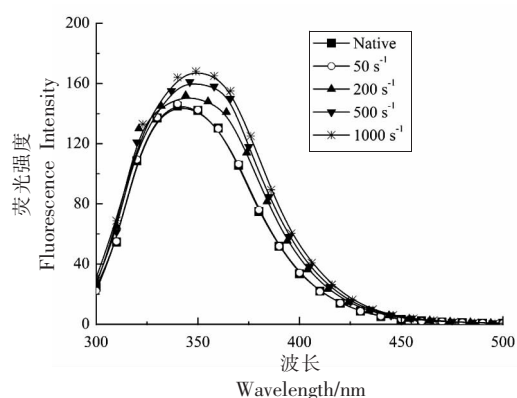
3.2.2 荧光光谱分析 天然溶菌酶分子中含有的 6 个色氨酸残基(其中 3 个在埋藏于极性环境中)^[22],色氨酸残基是否暴露于不同的微环境中,可作为表达剪切流场作用前后蛋白质结构变化的良好载体。由图 5a、5b 可知,当溶菌酶溶液经过 200,500 s^{-1} 和 1000 s^{-1} 的剪切流场处理 2.5 h 和 500 s^{-1} 分别剪切 1.5,2.5 h 和 3.5 h 后,溶菌酶溶液的最大荧光强度处的波长发生红移(未经处理的溶菌酶溶液为 340 nm),表明溶菌酶分子中的色氨酸残基所处微环境疏水性减弱;与此同时,溶菌酶的荧光强度随着剪切流场的速率增大和作用时间延长分别增强,这可能是剪切流场影响了色氨酸残基原有的空间位置^[23]。以上结果说明经剪切流场作用的溶菌酶分子的结构不同于天然溶菌酶分子,使得原有的分子结构出现一定的伸展,最终导致更多的色氨酸残基进入更为亲水的环境中,此结果与上述紫外二阶导数光谱得出的结论一致。同样由于测试方法或仪器精度限制,在荧光光谱中同样也无法检测 50 s^{-1} 和 0.5 h 处理条件下色氨酸残基

数光谱中 ab 的值分别降低了 0.08,0.05 和 0.02,此结果表明,在相同的剪切流场作用下,溶菌酶溶液的浓度越高,剪切流场所引起的溶菌酶三级结构变化越小,即有更少的酪氨酸残基进入疏水区域。引起此种现象的原因可能是由于蛋白质的拥挤效应,在高浓度情况下,蛋白质分子之间相互拥挤使得空间位阻增大,使得在相同剪切流场的作用下蛋白质能够更好的保持天然的构象^[19]。

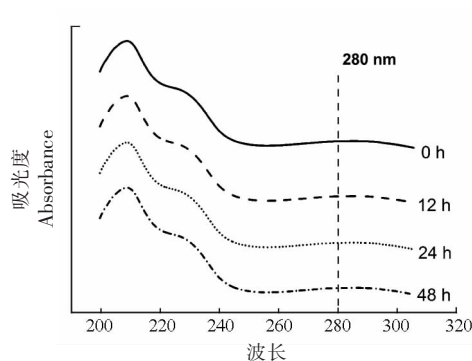
的移动。

在图 5c 中分别对质量浓度为 10,50 mg/mL 和 100 mg/mL 溶菌酶溶液持续施加 500 s^{-1} 的剪切流场 2.5 h,最大荧光强度处的波长从未经处理的 340 nm 分别红移了 10,6 nm 和 2 nm,并伴随着不同程度的发射荧光强度升高。此现象表明,溶菌酶溶液的浓度越低,溶菌酶分子的结构发生更大程度的改变,原本存在于分子内部的色氨酸残基暴露于蛋白质结构表面,即更多的色氨酸残基的极性增强。

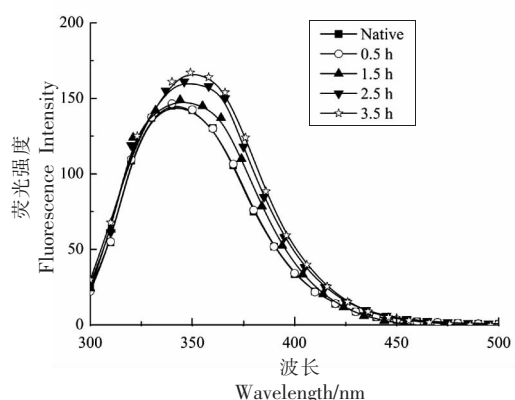
3.2.3 贮存时间对溶菌酶三级结构的影响 当溶菌酶的浓度、剪切速率和剪切时间分别为 50 mg/mL、 500 s^{-1} 和 2.5 h 时,在不同储存时间节点测定该溶菌酶溶液的紫外光谱、荧光光谱及平均水力学半径的变化。根据图 6a 可知,在各个不同的贮存时间,该溶菌酶溶液的紫外吸收光谱没有发生显著改变;图 6b 中荧光光谱的结果与紫外吸收光谱一致,峰形、峰高以及光谱谱峰所在波长(346 nm)也均未发生显著改变;图 6c 的结果显示,在贮



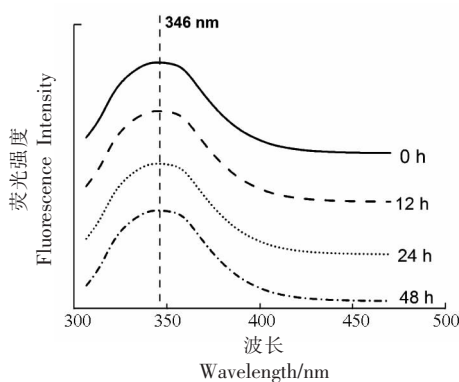
(a) 溶菌酶质量浓度、剪切时间: 50 mg/mL, 2.5 h



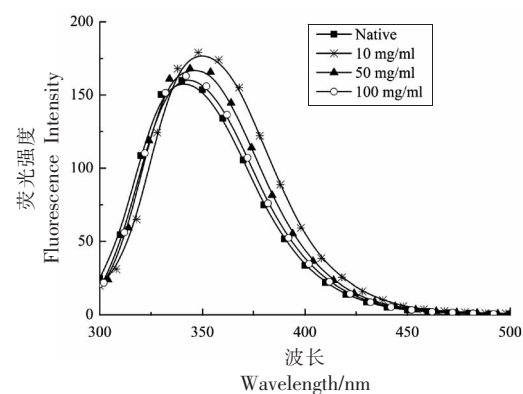
(a) 紫外吸收光谱



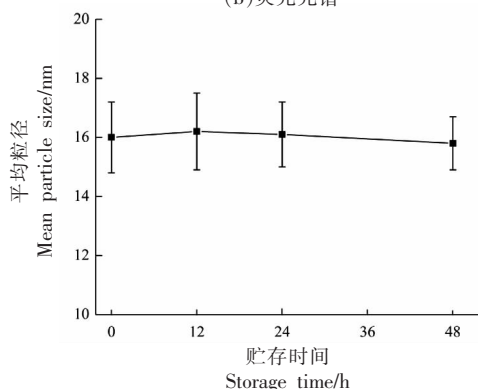
(b) 溶菌酶质量浓度、剪切速率: 50 mg/mL, 500 s⁻¹



(b) 荧光光谱



(c) 剪切速率、剪切时间: 500 s⁻¹, 2.5 h



(c) 分子平均粒径变化

图 5 不同剪切流场作用下的溶菌酶溶液的荧光光谱
Fig.5 Fluorescence spectra of lysozyme solution under different shear flow fields

图 6 经剪切流场作用后不同贮存时间的溶菌酶溶液
Fig.6 The spectrum of lysozyme solution with different storage time after shear flow field action

藏 0, 12, 24 h 和 48 h 后, 该蛋白质分子/聚集体的平均粒径变化不显著 ($P < 0.05$)。上述结果说明经此条件处理后的溶菌酶分子发生了不可逆转的三级结构改变。

3.3 溶菌酶溶液粒径的变化

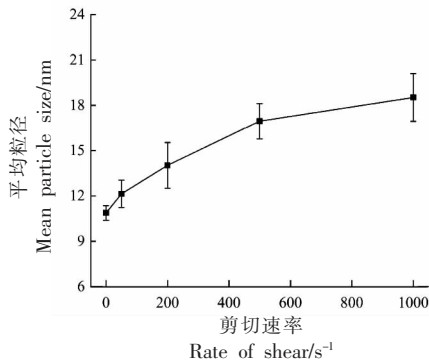
由图 7a、7b 可知, 剪切流场的剪切速率以及

持续作用时间对溶菌酶分子的空间结构与/或聚集状态有显著的影响 ($P < 0.05$)。经剪切流场作用后的溶菌酶分子的水力学半径均有不同程度的增加, 且随着剪切速率的递增、剪切流场作用时间的延长, 粒径随之增大。原因可能来自于溶菌酶分子去折叠时疏水基团的暴露导致蛋白分子间的相互

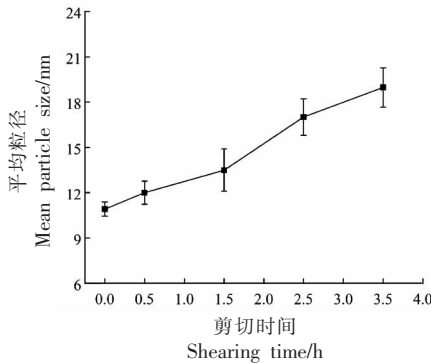
聚集。同时,高浓度的蛋白溶液能更好地抵御剪切带来的蛋白构象变化,并抑制蛋白分子的聚集(图7c)。

3.4 溶菌酶活性的分析

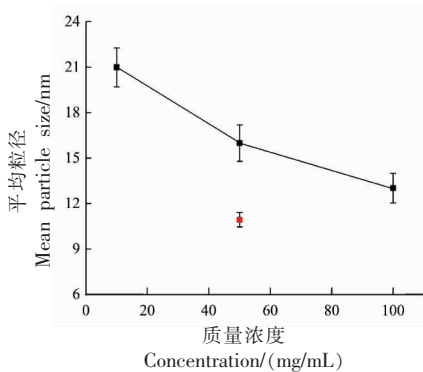
前述结果表明剪切流场导致溶菌酶分子的空间构象发生改变,同时该改变导致的蛋白分子疏水集团暴露引起蛋白分子的团聚。但这些改变如何如何影响蛋白的应用是食品研究人感兴趣的话



(a)溶菌酶质量浓度、剪切时间:50 mg/mL、2.5 h



(b)溶菌酶质量浓度、剪切速率:50 mg/mL、500 s⁻¹



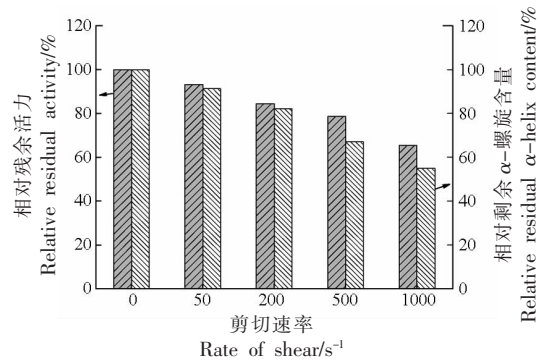
(c)剪切速率、剪切时间:500 s⁻¹、2.5 h。

注:红色点代表未经剪切流场处理的溶菌酶分子平均粒径。

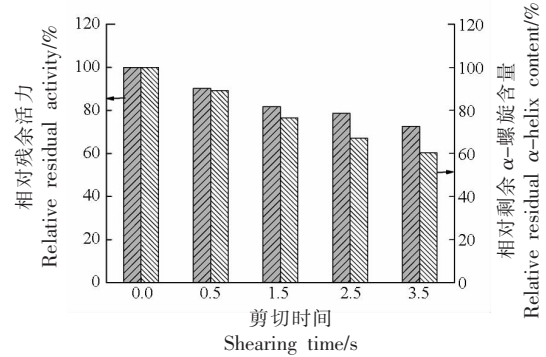
图7 不同剪切流场作用前、后溶菌酶分子的平均粒径变化

Fig.7 Average particle size changes of lysozyme molecules before and after different shear flow fields

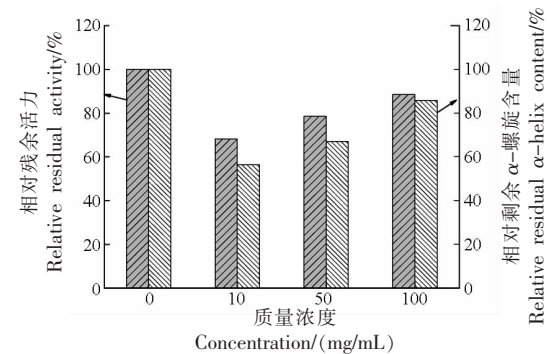
题。介于溶菌酶在食品中能作为抑菌剂,经不同剪切处理后的样品,它们的生物活性通过浊度法被测定,计算剪切流场处理后溶菌酶的相对残存活力与其相对剩余 α -螺旋的含量。图8a、8b显示,在保持其它条件相同的情况下,单独改变剪切流场的速率或作用时间,随着剪切速率的增大或作用时间的延长,均会引起溶菌酶溶液中相对残余活力的降低。图8c中在保持剪切速率和作用时间



(a)溶菌酶质量浓度、剪切时间:50 mg/mL、2.5 h



(b)溶菌酶质量浓度、剪切速率:50 mg/mL、500 s⁻¹



(c)剪切速率、剪切时间:500 s⁻¹、2.5 h

注:RRA表示相对残余活力,RHC表示相对剩余 α -螺旋含量。

图8 不同剪切条件下溶菌酶的相对残存活力与其相对剩余 α -螺旋的含量

Fig.8 Residual activity and relative residual α -helix content of different shear conditions treated lysozyme

相同的前提下,随着溶液中溶菌酶浓度的增大,得到与图 1c 相似的结果,剪切流场对于溶菌酶溶液二级结构的影响随着浓度的递增而削弱。以上结果表明,溶菌酶的二级结构会因剪切流场的存在而部分丧失。同时,溶菌酶的相对残存活力与剩余 α -螺旋相对含量成正相关(图 8a、8b、8c)。

4 结论

对溶菌酶溶液施加较长时间的剪切流场会引发溶菌酶分子的二级结构和三级结构发生不可逆转的改变,且此改变会随剪切速率的增大、作用时间的延长以及溶菌酶溶液浓度的降低有一定程度的变大。具体表现为溶菌酶分子中 α -螺旋含量逐渐降低,酪氨酸和色氨酸残基所处的微环境极性发生更大程度的变化,溶菌酶溶液中蛋白质分子/聚集体的平均粒径呈现逐渐增大的趋势。但当在较低剪切速率(50 s^{-1})和剪切时间较短(0.5 h)时,本试验所进行的检测因三维构象变化较为微弱/仪器检测精度限制,不能观测到显著的差异。将在溶菌酶溶液中赋予剪切流场作用后,进行不同时间的贮藏,溶菌酶因剪切流场所发生的构象变化没有减弱。本研究说明剪切流场对于溶菌酶溶液可造成不可逆的蛋白质空间结构变化。

参 考 文 献

- [1] 阚建全. 食品化学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 44-89.
KAN J Q. Food chemistry[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2008: 44-89.
- [2] PAN W, CAO Y, GU F, et al. Interaction between potassium iodide and bovine serum albumin, ovalbumin and lysozyme under different temperature induction[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 248: 125923.
- [3] YAN X, JIA Y, MAN H, et al. Tracking the driving forces for the unfolding and folding of kidney bean protein isolates: Revealing mechanisms of dynamic changes in structure and function[J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134230.
- [4] JASPE J, HAGEN S J. Do protein molecules unfold in a simple shear flow? [J]. Biophysical Journal, 2006, 91(9): 3415-3424.
- [5] ASHTON L, DUSTING J, IMOMOH E, et al. Shear-induced unfolding of lysozyme monitored in situ[J]. Biophysical Journal, 2009, 96(10): 4231-4236.
- [6] BYINGTON M C, SAFARI M S, CONRAD J C, et al. Protein conformational flexibility enables the formation of dense liquid clusters: tests using solution shear[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2016, 7(13): 2339-2345.
- [7] BYINGTON M C, SAFARI M S, CONRAD J C, et al. Shear flow suppresses the volume of the nucleation precursor clusters in lysozyme solutions [J]. Journal of Crystal Growth, 2017, 468: 493-501.
- [8] CHARM S, LAI C. Comparison of ultrafiltration systems for concentration of biologicals[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1971, 13(2): 185-202.
- [9] 赵新淮. 食品蛋白质: 结构, 性质与功能[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 97-102.
ZHAO X H. Food proteins: Structure, properties and function[M]. Beijing: Science Press, 2009: 97-102.
- [10] MEZZENGA R. Equilibrium and non-equilibrium structures in complex food systems[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(5/6): 674-682.
- [11] MOHAMED I O. Interaction of starch with some food macromolecules during the extrusion process and its effect on modulating physicochemical and digestible properties. A review[J]. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 2023, 5: 100294.
- [12] NIU X, ZHU L, XI L, et al. An antimicrobial agent prepared by N-succinyl chitosan immobilized lysozyme and its application in strawberry preservation[J]. Food Control, 2020, 108: 106829.
- [13] SHARMA A, KESAMSETTY D, DEBNATH J, et al. Inhibition of lysozyme amyloid fibrillation by curcumin-conjugated silver nanoparticles: A multispectroscopic molecular level study[J]. Journal of Molecular Liquids, 2023, 372: 121156.
- [14] NIU F G, GU F A, ZHAO M D, et al. Aggregation and growth mechanism of ovalbumin and sodium carboxymethylcellulose colloidal particles under thermal induction[J]. Biomacromolecules, 2023, 24(3): 1532-1543.
- [15] ASHRAFI N, SHAREGHI B, FARHADIAN S, et al. A comparative study of the interaction of naringenin with lysozyme by multi-spectroscopic methods,

- activity comparisons, and molecular modeling procedures[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 271: 120931.
- [16] RAGONE R, COLONNA G, BALESTRIERI C, et al. Determination of tyrosine exposure in proteins by second-derivative spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 1984, 23(8): 1871-1875.
- [17] MINTON A P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(14): 10577-10580.
- [18] YOKOTA A, IZUTANI K, TAKAI M, et al. The transition state in the folding-unfolding reaction of four species of three-disulfide variant of hen lysozyme: The role of each disulfide bridge[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 295(5): 1275-1288.
- [19] JOSHI A, KISHORE N. Macromolecular crowding and preferential exclusion counteract the effect of protein denaturant: Biophysical aspects[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 360: 119429.
- [20] ASHRAFI N, SHAREGHI B, FARHADIAN S, et al. The effect of putrescine on the lysozyme activity and structure: Spectroscopic approaches and molecular dynamic simulation[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2022, 213: 112402.
- [21] ZHAO W, YANG R. The effect of pulsed electric fields on the inactivation and structure of lysozyme[J]. *Food Chemistry*, 2008, 110(2): 334-343.
- [22] GLICKSON J, MCDONALD C, PHILLIPS W. Assignment of tryptophan indole NH proton resonances of lysozyme[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1969, 35(4): 492-498.
- [23] GOOVAERTS V, STROOBANTS K, ABSILLIS G, et al. Eu (III) luminescence and tryptophan fluorescence spectroscopy as a tool for understanding interactions between hen egg white lysozyme and metal-substituted Keggin type polyoxometalates[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2015, 150: 72-80.

Effect of An Applied Rotational Flow Field on the Spatial Conformation of Protein Molecules

Pan Weichun, Gu Feina, Zhao Mengdi, Cai Fengye, Wen Ya, Xu Haixing, Niu Fuge*
(The School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

Abstract Objective: This paper mainly studies the influence of different applied rotating flow fields on the spatial structure of lysozyme, which can be used to guide the food processing of high protein content food. Methods: A rotational rheometer was used to apply a shear flow field in lysozyme solution. Circular dichroism spectroscopy, ultraviolet absorption and second derivative spectroscopy, fluorescence emission spectroscopy and dynamic light scattering were used to characterize the effects of shear flow field on the secondary structure and tertiary structure of lysozyme molecules. Results: When the shear flow speed was higher than 200 s^{-1} or the shear flow duration was longer than 1.5 h, the proportion of α -helix structure decreased and the proportion of disorder structure increased, the UV absorption spectrum changed blue shift, and the polarity of tryptophan residue in the molecular was enhanced. This change was irreversible and became more significant with the increase of shear speed, the extension of action time and the decrease of lysozyme concentration. Conclusion: The shear flow field can cause an impossible inverse conformational change of lysozyme, and the larger the shear rate and the longer the interaction time, the more significant the conformational change.

Keywords shear flow field; lysozyme; secondary structure; conformation