

分子动力学模拟研究壳寡糖与脂肪酶相互作用机制

杨宝燕^{1,2}, 郑敦锦¹, 何康平¹, 江文豪¹, 沈锐锋¹, 吕咏锶¹, 罗幸林¹, 罗佳伟¹, 陈胤熹¹, 郑少鹏¹,
郝锦亨¹, 陈梓诗¹, 曹诗林^{1,3,4}

(1. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东佛山 528000) (2. 暨南大学理工学院, 广东广州 510632)

(3. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(4. 可持续生物化学与合成生物工程中心, 佛山无远生物科技有限公司, 广东佛山 528000)

摘要: 壳聚糖及其衍生物在酶固定化领域有着广泛的应用。了解酶与壳聚糖衍生物在分子水平上的相互作用机制, 对相关生物催化剂的设计和应用具有重要意义。本研究采用分子动力学模拟方法研究南极假丝酵母脂肪酶 B (CaLB) 与壳寡糖 (OCTS) 的相互作用, 并对脂肪酶与催化底物进行分子对接研究脂肪酶催化活性中心和底物结合构象和结合亲和力。结果表明, 脂肪酶与 OCTS 之间的静电和 L-J 相互作用在自组装过程的初始阶段起着重要的作用。模拟过程结束后, CaLB-OCTS 组装体共包含 14 个 OCTS 分子和 1 个 CaLB 分子。CaLB 与 OCTS 之间存在静电相互作用和氢键相互作用, 在模拟过程中, L-J 势能和库仑势能分别降低了约 1480 kJ/mol 和 2324.0 kJ/mol, 两者间的平均氢键数从 0 增加到约 17, CaLB 与 OCTS 的可及面积均因为相互作用而降低了 20 nm²。二级结构表明, 与游离酶对照相比, CaLB-OCTS 的 β 折叠含量从 9.78% 增加至 12.62%, 无规卷曲 loop 从 49.21% 下降至 46.50%, CaLB-OCTS 的 β 折叠的含量更高, 而无规卷曲含量更低。此外, CaLB-OCTS 保留了其原有的蛋白骨架结构以及活性位点口袋的构象。

关键词: 南极假丝酵母脂肪酶; 壳寡糖; 分子动力学模拟; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2021)06-72-81

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.0902

A Molecular Dynamics Simulation Study on the Mechanism Underlying the Interaction between Chitooligosaccharides and Lipase

YANG Bao-yan^{1,2}, ZHENG Dun-jin¹, HE Kang-ping¹, JIANG Wen-hao¹, SHEN Rui-feng¹, LYU Yong-si¹, LUO Xing-lin¹, LUO Jia-wei¹, CHEN Yin-xi¹, ZHENG Shao-peng¹, HAO Jin-heng¹, CHEN Zi-shi¹, CAO Shi-lin^{1,3,4}

(1.School of Food Science and Technology, Foshan University, Foshan 528000, China) (2.College of Institute of Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China) (3.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 5105640, China) (4.Sustainable Biochemical & Biosynthetic Engineering Center, Foshan Wu-yuan Biotechnology Co. Ltd., Guangdong Biomedical Industrial Base, Foshan 528000, China)

Abstract: Chitosan and its derivatives have a wide range of applications in the field of enzyme immobilization. Understanding the mechanism of the interaction between enzymes and chitosan derivatives at the molecular level is of great significance to the design and application of related biocatalysts. In this study, molecular dynamics simulation was used to investigate the interaction of Candida Antarctica Lipase B (CaLB) and oligo-chitosan (OCTS), and molecular docking of lipase and catalytic substrate was conducted to study the binding conformation and affinity for the catalytically active centre of CaLB and substrate. The results showed that both electrostatic and L-J interactions

引文格式:

杨宝燕,郑敦锦,何康平,等.分子动力学模拟研究壳寡糖与脂肪酶相互作用机制[J].现代食品科技,2021,37(6):72-81

YANG Bao-yan, ZHENG Dun-jin, HE Kang-ping, et al. A Molecular dynamics simulation study on the mechanism underlying the interaction between chitooligosaccharides and lipase [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 72-81

收稿日期: 2020-09-27

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金佛山市联合基金(粤佛联合基金)青年基金项目(2019A1515110621); 广东普通高校青年创新人才项目(自然科学类)(2017KQNCX217); 佛山科学技术学院高层次人才启动项目(GG07016); 大学生创新创业训练计划项目(201911847023; S201911847097; S201911847091; XJ2019213; S202011847068; S202011847086; XJ2020219; XJ2020220); 广东省科技创新战略专项资金(大学生科技创新培育)项目(pdjh2020b0627)

作者简介: 杨宝燕(1998-), 女, 本科, 研究方向: 生物合成与生物转化

通讯作者: 曹诗林(1987-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 生物合成与生物转化

between CaLB and OCTS play important roles in the initial stage of the self-assembly process. After the simulation process, the CaLB-OCTS assembly contained 14 OCTS molecules and 1 CaLB molecule. The electrostatic interaction and hydrogen bond interaction existed between CaLB and OCTS. During the simulation, the L-J potential energy and Coulomb potential energy decreased by about 1480 KJ/mol and 2324.0 KJ/mol, respectively, with the average number of hydrogen bonds between CaLB and OCTS increasing from 0 to about 17, and the accessible area of both CaLB and OCTS reducing by 20 nm² due to the interactions. The analysis of secondary structure showed that compared to the free enzyme, the beta-sheet content of CaLB-OCTS increased from 9.78% to 12.62%, and the content of random coil loop decreased from 49.21% to 46.50%. Moreover, the CaLB-OCTS retained its original protein skeleton structure and the conformation of the active site pocket.

Key words: *Candida antarctica* lipase; oligo-chitosan; molecular dynamics simulation; molecular docking

近年来,蛋白质-多糖相互作用的研究引起了人们的关注。多糖可以通过共价交联^[1]和非共价相互作用^[2]包裹蛋白质。多糖可作为蛋白质和酶的载体,促进蛋白质药物治疗^[3]和提高酶的催化性能^[4]。

壳聚糖是由 D-glucosamine (D-氨基葡萄糖) 为单位,以 β -(1-4) 连接组成的一种阳离子多糖,并广泛应用于生物医学和生物催化。但由于其结构特点,传统壳聚糖的溶解需要溶解在稀酸水溶液中,因此其进一步的应用受到限制。壳聚糖低聚物 (OCTS) 是由 2~50 个残基组成,具有良好的水溶性。南极假丝酵母脂肪酶 B (CaLB) 是应用最广泛的脂肪酶之一。CaLB 具有很多特性,例如,有比较严格的底物选择性、底物特异性,较宽的 pH 稳定范围等特点。该酶在生物合成^[5]、生物柴油^[6]、生物制药^[7]等领域具有广阔的应用前景。游离脂肪酶不稳定,易失活。研究表明壳聚糖和甲壳素类材料作为载体固定化酶可以提高酶的稳定性和催化性能^[8,9]。了解酶与壳聚糖的相互作用对设计高性能的酶-壳聚糖生物催化剂具有重要意义。目前,酶与壳聚糖衍生物相互作用的研究主要集中在实验领域,仍然缺乏在原子水平上的相互作用机制研究。分子动力学模拟是以经典力学、量子学为基础,利用计算机得到分子轨迹的过程,并分析其结构性质,简单来说,分子动力学模拟是将肉眼可见宏观上的生物大分子变成动态,由此我们可以观察到分子在不同时间分子里的变化过程,同时能够提供生物大分子动态变化的数据。分子动力学模拟是研究分子间相互作用的有效方法。然而,对壳聚糖与蛋白质相互作用的分子动力学模拟,特别是对壳聚糖与酶相互作用的分子动力学模拟研究较少。

本文通过分子模拟研究了南极假丝酵母脂肪酶 B (CaLB) 与壳聚糖低聚物 (OCTS) 装配体的结构与构象,考察 CaLB 与 OCTS 之间的相互作用对脂肪酶结构的影响规律。CaLB-OCTS 与底物分子 (4-硝基苯对棕榈酸酯) 进行分子对接分析,根据酶与底物的反应机理结合形成酶-底物复合物,对该复合物进行构象评分,获得构象较合理的对接模型,分析比较合理的

对接结果中酶蛋白与底物相互作用力,从而更加深入地了解酶蛋白与催化底物的结合方式。本文所建立的模拟方法,不仅可以用于酶与壳聚糖衍生物的相互作用研究,也可蛋白质-多糖相互作用研究提供更多的借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 结构数据

南极假丝酵母脂肪酶: 来源于 Protein Data Bank 数据库 (ID: 1TCA), 壳寡糖、4-硝基对棕榈酸酯: 通过作图软件获得。

1.1.2 分子动力学模拟工具以及分析工具

Gromacs 4.5.3^[10,11]、Pymol (三维结构显示软件)、Autodock-Vina^[12] (酶分子与底物分子进行分子对接)、蛋白质配体相互作用分析器 (Protein-ligand Interaction Profiler, PLIP)^[13]。其中 AutodockVina 与 PLIP 模块经本课题组二次开发,分别部署在 <https://atomevo.com/autodock-vina> 与 <https://atomevo.com/plip>^[18]。以上两个模块均免费开放给公众使用。

1.2 试验设计

南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* Lipase B, CaLB) 的 FASTA 序列来源于蛋白数据库 (PDB 代码: 1TCA)。

使用 Gromacs 4.5.3 软件包进行分子动力学模拟^[10,11]。在分子动力学模拟过程中,将 1TCA 置于一个立方体盒的中心,其中 1TCA 与 OCTS 距离盒边缘 1 nm。体系中含有 1 个 1TCA 脂肪酶分子和一定数量的 OCTS。首先,将整个系统在 303.15 K 下进行 50000 步的能量最小化 (EM)。然后,通过位置约束的 MD 模拟,通过 NVT 系综 (粒子数量、体积和温度恒定),再通过 NPT 系综 (粒子数量、压力和温度恒定) 来平衡溶剂和蛋白脂肪酶分子周围的离子。经过平衡后,在 303.15 K 下进行 40 ns 的分子动力学模拟,模拟后

输出数据进行分析。

1.3 数据处理

1.3.1 南极假丝酵母脂肪酶 (CaLB) 与低聚壳聚糖组装 (OCTS) 分析

势能分析:分析了 0~40 ns 模拟中 CaLB 与 OCTS 之间的库仑相互作用和 L-J 相互作用。**氢键分析:**对 0~40 ns 范围内的 CaLB-溶剂对和 CaLB-OCTS 对进行氢键数分析,并分别计算了 CaLB-溶剂对和 CaLB-OCTS 组装体在前 0.10 ns 和后 0.10 ns 的平均氢键数。**溶剂可达面积 (SASA) 分析:**计算 0~40 ns 时 CaLB 和 CaLB-OCTS 的疏水性、亲水性和总溶剂可达面积。**CaLB 与 14 个 OCTS 分子质心 (COM) 的平均距离分析:**首先计算各 OCTS 分子质心与 CaLB 在 0~40 ns 模拟时间内的距离,然后计算平均值。

1.3.2 南极假丝酵母脂肪酶总体构象变化

均方根波动 (RMSF) 分析:对 CaLB 和 CaLB-OCTS 的每个残基对计算平均 RMSF。**均方根 (Root-mean-square deviation, RMSD) 分析:**计算部分区域的 RMSD,包括 helix 区域 (Lys13-Gly19), (Val139-Leu147), (Gly226-Arg242), loop 区域 (Gly95-Pro100), (Gly217-Ala225)。用 Pymol 软件计算了 CaLB 和 CaLB-OCTS 的二级结构。然后分别计算游离 CaLB 和 CaLB-OCTS 中 α -helix、Sheet 和 loop 的数量。

1.3.3 CaLB 和 OCTS 之间接触位点分析

用 Pymol 法计算并鉴定了与 OCTS 结合的 CaLB 的氨基酸组成和残基数。

1.3.4 CaLB 活性位点 OCTS 分析

活性中心入口开放状态分析:0~40 ns 计算片段质心 (Val139-Leu147) 与片段质心 (Leu277-Gly288) 之间的距离。**活性口袋结构分析:**分别测定 Ser105 残基与中结合口袋 (Gly39、Thr42、Ser47、Trp104、Ala225)、大结合口袋 (Ala141、Leu144、Val154、Ile285、Pro289、Lys290) 和酰基结合口袋 (Asp134、Thr138、Gln157、Ile189、Val190) 之间的距离。并在此基础上,研究了游离 CaLB 和 CaLB-OCTS 口袋结构的差异。

1.3.5 CaLB 与底物 4-硝基苯对棕榈酸酯分子对接分析

通过阅读文献找出脂肪酶的活性中心以及活性口袋,用 Pymol 软件打开经过 40 ns 模拟的 CaLB-OCTS 的 PDB,并建立活性中心盒子,记录盒子参数。用 ChemBrow 绘出脂肪酶催化反应底物 4-硝基苯对棕榈酸酯,进行能量最小化后以 PDB 文件输出,运用 Pymol 软件对其进行加氢等操作。将 CaLB

的 PDB 文件、4-硝基苯对棕榈酸酯 PDB 文件以盒子参数上传至 Autodock-Vina,以 CaLB 为受体,底物为配体进行分子对接,结合能小于 0 表示受体和配体能自由结合,分析结果显示结合能越小则表示对接得越好。对接后模型进行 XScore 评分,评分显示的结果越高表示对接越好。随后,对接后评分较好的受体-配体模型以 PDB 文件输出并上传至 PLIP,进行对接结果作用力 (氢键作用力、疏水作用力) 的分析。

1.3.6 数据分析与作图

以上所得数据使用 WPS 进行归纳汇总与分析,并使用 python 的 matplotlib 模块,编写画图脚本将所得数据作图。

2 结果与讨论

2.1 CaLB 和 OCTS 自组装过程分析

2.1.1 L-J 势能和库仑势能分析

图 1 展示了 CaLB 与 OCTS 之间库仑相互作用和 L-J 相互作用的能量变化。如图 1 所示,模拟过程的库仑势能和 L-J 势能均显著降低,在 4 ns 模拟时达到 -1200 kJ/mol 左右。随后,这两种能量继续下降,但库仑相互作用下降趋势更加明显,在 12 ns 左右达到 -2100 kJ/mol 左右,而在 6 ns 左右,L-J 势能下降到 -1400 kJ/mol 左右。在 6~40 ns 时,L-J 势能在 -1230~-1800 kJ/mol 之间变化,而在 12~40 ns 时,静电势能在 -2200~-2820 kJ/mol 之间。在 40 ns 模拟过程中,L-J 势能和库仑势能分别降低了约 1480 kJ/mol 和 2324.0 kJ/mol。这些结果表明,CaLB 和 OCTS 之间的静电和 L-J 相互作用在自组装过程的初始阶段 (0~4 ns) 起着重要的作用。随着 OCTS 接近 CaLB,静电相互作用增强,并成为组装的关键驱动力。

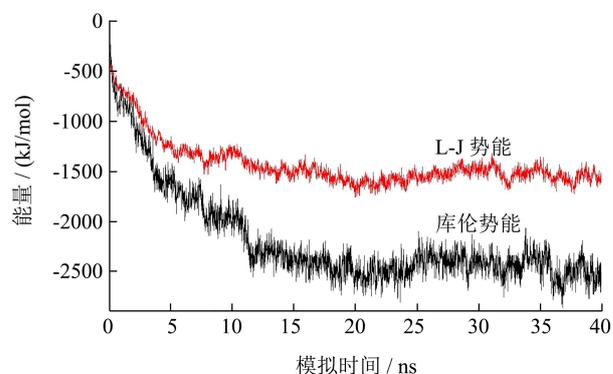


图 1 模拟过程中脂肪酶和 OCTS 相互作用的能量分析

Fig.1 Energy analysis of the interaction between lipase and OCTS during simulation

2.1.2 氢键分析

如图 2a 所示,分析 40 ns 模拟过程中的氢键数。

在前 0.10 ns 脂肪酶蛋白与溶液的初始氢键数约为 368。随后,氢键数在模拟过程中逐渐减少,在模拟结束时(后 0.10 ns),脂肪酶蛋白与溶液的氢键数约为 335。此外,在模拟期间,脂肪酶蛋白和 OCTS 之间的平均氢键数从 0 增加到约 17。这些结果表明 OCTS 可以与脂肪酶形成氢键并取代脂肪酶和溶剂之间的部分氢键。这有助于增加脂肪酶的结构稳定性。

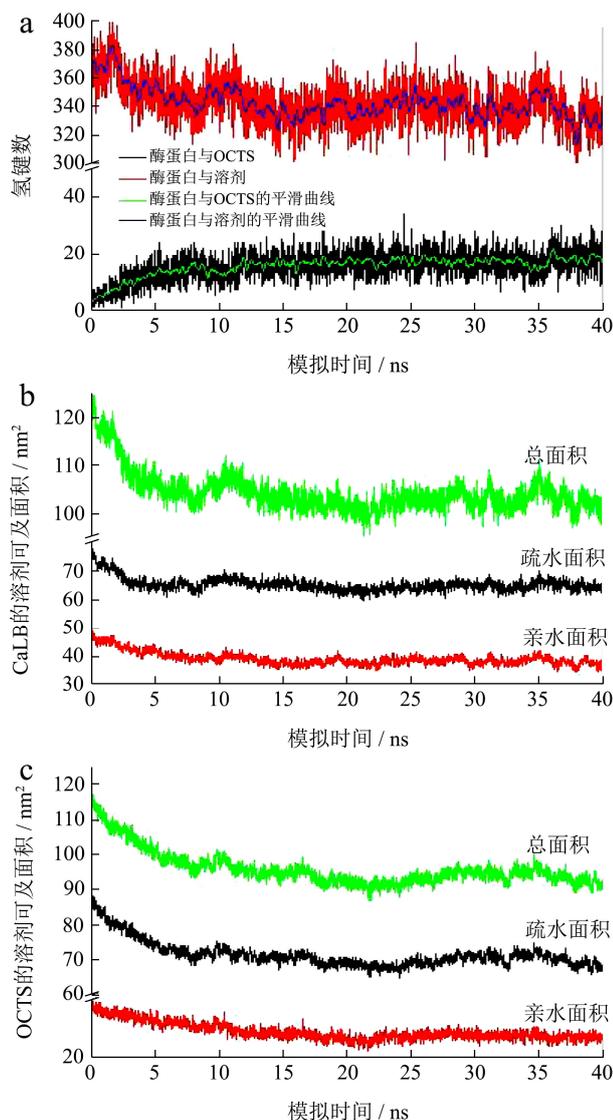


图2 模拟过程中氢键分析(图 a)、脂肪酶和 OCTS 在 40 ns 模拟过程中的溶剂可及面积分析(图 b, c)

Fig.2 Hydrogen bond analysis during simulation (a), the solvent accessible surface (SASA) analysis of CaLB and OCTS during 40 ns simulation (b, c)

2.1.3 CaLB 和 OCTS 溶剂可及面积及质心距离的分析

图 2b、c 显示了脂肪酶和 OCTS 的溶剂可及面积(SASA)分析。结果表明,在 0~4 ns 时,脂肪酶和 OCTS 的 SASA 均显著下降。脂肪酶的 SASA 从约 130 nm² 减少到约 110 nm², 而 OCTS 的 SASA 从 115 nm²

减少到 95 nm²。在 4~40 ns 期间,脂肪酶和 OCTS 的 SASA 分别在 110~100 nm² 和 100~90 nm² 之间变化。该结果同样表明,在 0~4 ns 时, OCTS 与脂肪酶相互靠近,因此 SASA 同步下降并降幅较大,而 4~40 ns 时,脂肪酶和 OCTS 主要进行自组装过程的结构调整和平衡。

为了进一步阐明这种观点,本研究对模拟时间内脂肪酶和 OCTS 分子的质心(COM)的平均距离进行了进一步分析(图 3)。该分析结果表明,在 0~4 ns 期间,COM 的平均距离显著下降了 0.50 nm。随后,在随后的 12~40 ns 期间,COM 的平均距离在 2.70 和 3.10 nm 之间波动,以进行结构重新调整。

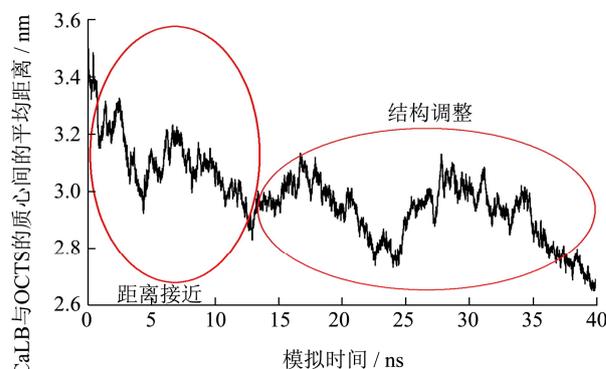


图3 脂肪酶和 OCTS 质心之间的平均距离

Fig.3 The average distance between the COM of CaLB and OCTS

酶与多寡糖之间存在非共价相互作用,包括静电相互作用、疏水相互作用、氢键相互作用等。结果表明,装配过程可以描述为: OCTS 与 CaLB 之间的距离越来越远,因此 CaLB 和 OCTS 之间的可及面积明显降低以及 CaLB-OCTS 之间的平均 COM 显著降低。除此之外, CaLB 与 OCTS 之间的氢键数量随着 CaLB 与溶剂之间氢键数量的减少而增加。在这个自组装过程的初始阶段, CaLB 和 OCTS 之间的静电和 L-J 相互作用起着重要的作用。随后,静电相互作用成为主导。以往的文献表明,当蛋白质与带电荷的多糖类相互作用时,静电作用占优势^[14]。自组装后,可以观察到 CaLB 和 OCTS 组装的结构调整过程。

2.2 CaLB 与 OCTS 组装体的整体构象

2.2.1 均方根偏差和原子波动分析

均方根偏差(RMSD)分析可以揭示 OCTS 对脂肪酶的结构稳定性的影响。CaLB-OCTS 的 RMSD 的平均值约为 0.22 nm, 脂肪酶 RMSD 的平均值约为 0.18 nm。该结果表明,在模拟期间内, OCTS 存在下脂肪酶 RMSD 无明显变化,脂肪酶与 OCTS 相互作用后保持其原始构象。

表1 脂肪酶在 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 9$ 、loop95-100、loop217-225 区域的均方根偏差 (RMSD) 分析

Table 1 The RMSD data of the helix region $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, and loop region (Gly95-Pro100), (Gly217-Ala225)

	$\alpha 1$ 区域(Lys13-Gly19)	$\alpha 5$ 区域(Val139-Leu147)	$\alpha 9$ 区域(Gly226-Arg242)	(Gly95-Pro100)	(Gly217-Ala225)
CaLB	0.12	0.31	0.14	0.17	0.21
CaLB-OCTS	0.17	0.28	0.13	0.09	0.19

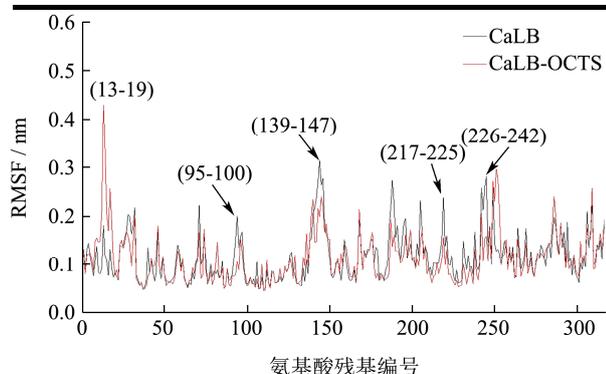


图4 脂肪酶和 CaLB-OCTS 的原子波动值 (RMSF)

Fig.4 RMSF analysis of the CaLB and CaLB-OCTS

为了考察 OCTS 对 CaLB 柔韧性的影响, 图 4 对比分析了游离 CaLB 和 CaLB-OCTS 的均方根波动 (RMSF) 分析。一般来说, 残基的 RMSF 在 CaLB 和 CaLB-OCTS 组装体中表现出相同的趋势。在有 OCTS 存在的情况下, helix (α -螺旋) 区域 (Lys13-Gly19) 的波动更大, 说明该区域在 CaLB-OCTS 组装体中比游离 CaLB 具有更大的柔韧性。此外, CaLB-OCTS 组装体的 loop (无规卷曲) 区域 (Gly95-Pro100) 和 (Gly217-Ala225) 以及 helix 区域 (Val139-Leu147) 和 (Gly226-Arg242) 比游离 CaLB 的波动更小。

研究表明, 蛋白质的稳定性与结构的柔韧性呈负相关^[15]。表 1 分析了上述区间的 RMSD。结果显示 CaLB-OCTS 组装体酶中 $\alpha 1$ 区域的平均 RMSD 为约 0.17 nm, 而游离 CaLB 的该数据为 0.12 nm。这表明 CaLB-OCTS 组装体酶中 $\alpha 1$ (13-19) 的 RMSD 值的增加归因于 RMSF 值的增加。此外, CaLB-OCTS 组装体酶的 loop (95-100)、loop (217-225)、 $\alpha 5$ (139-147)、 $\alpha 9$ (226-242) 区域的 RMSD 值都低于游离脂肪酶模拟体系。这表明这些区域 RMSF 值的降低导致了 CaLB-OCTS 组装体酶中这些结构区域的 RMSD 值的降低。

2.2.2 CaLB-OCTS 和游离脂肪酶的二级结构分析

进行游离 CaLB 和 CaLB-OCTS 的二级结构含量分析。如图 5 所示, 脂肪酶与 OCTS 组装后, CaLB-OCTS 的 α -螺旋含量从 41.00% 略微上升至 41.32%, 而 β -折叠含量从 9.78% 增加至 12.62%, 无规卷曲 loop 从 49.21% 下降至 46.50%。对 β -折叠的进一步分析表明, 脂肪酶中的 β -折叠 Leu20-Cys22 在

CaLB-OCTS 结构中延长至 Leu20-Gln23, 同时 β -折叠 Pro33-Pro38 延长至 β -折叠 Lys32-Pro38 (图 6)。此外, CaLB-OCTS 出现了两个新的 β -折叠结构, 分别为 β -折叠 (Gly307-Thr310) 和 β -折叠 (Gly313-Val315) (图 7), 而根据 pymol 软件的分析, 游离 CaLB 在这些结构区域中未发现 β -折叠结构。

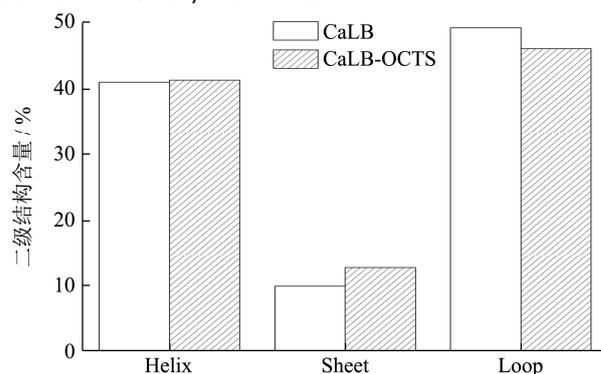


图5 CaLB-OCTS 组装体和游离 CaLB 的二级结构分析

Fig.5 Secondary structure analysis of the CaLB-OCTS and

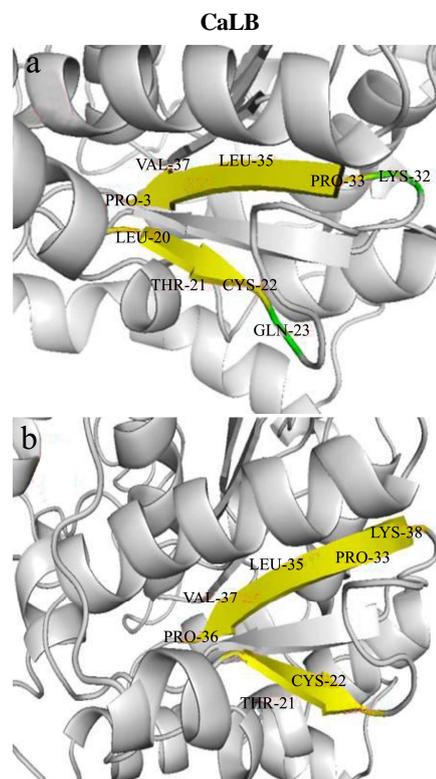


图6 CaLB-OCTS (b) 和游离 CaLB (a) 中 β -折叠 (Leu20-Cys22, Pro33-Pro38) 二级结构变化

Fig.6 Secondary structure change of the Sheet (Leu20-Cys22, Pro33-Pro38) in CaLB-OCTS (b) and CaLB (a)

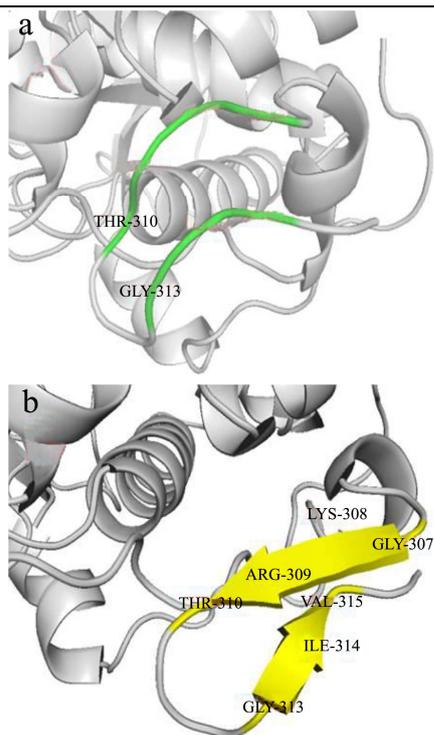


图7 CaLB-OCTS(b)和游离 CaLB(a)中 β -折叠(Gly313-Val315, Gly307-Thr310) 二级结构的变化

Fig.7 Secondary structure change of the (Gly313-Val315, Gly307-Thr310) in CaLB-OCTS (b) and CaLB (a)

该结果表明 CaLB 和 OCTS 之间的相互作用促进了无规卷曲结构向 β -折叠结构的转化。这个结果与之前的实验研究是一致的^[16]。这些研究表明,蛋白质与壳聚糖/壳聚糖衍生物之间的相互作用改变了蛋白质的二级结构,尤其是环状结构。

2.3 CaLB 与 OCTS 接触位点分析

CaLB 的 FASTA 序列表明,在脂肪酶表面存在许多酸性氨基酸残基,包括带负电荷的 4 个谷氨酸残基 (Glu81、Glu188、Glu269、Glu294) 以及 14 个天冬氨酸残基 (Asp6、Asp17、Asp49、Asp74、Asp126、Asp134、Asp145、Asp187、Asp200、Asp223、Asp252、Asp257、Asp265、Asp296)。由于 OCTS 带有正电荷,因此,脂肪酶和 OCTS 之间存在静电相互作用。分子模拟 40 ns 后,14 个 OCTS 分子与 CaLB 组装。如图 8a 所示,分析了 CaLB 与 OCTS 发生接触的氨基酸残基。有 7 个 Asp 残基和 2 个 Glu 残基分别附着在 8 个 OCTS 分子上,这些氨基酸残基与 OCTS 电荷相反。该残基分别为 Asp17、Asp134、Asp145、Asp187、Asp252、Asp257、Asp265、Glu269、Glu188。在本文中,CaLB 和 OCTS 分别带 1 个负电荷和 5 个正电荷。因此,CaLB-OCTS 组装体为 69 个带正电的净电荷。由此,CaLB-OCTS 组装体可能在溶液中是可溶的复合物。

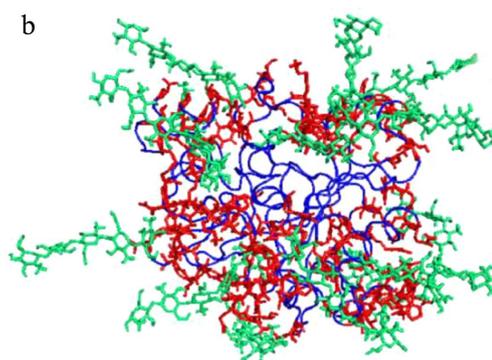
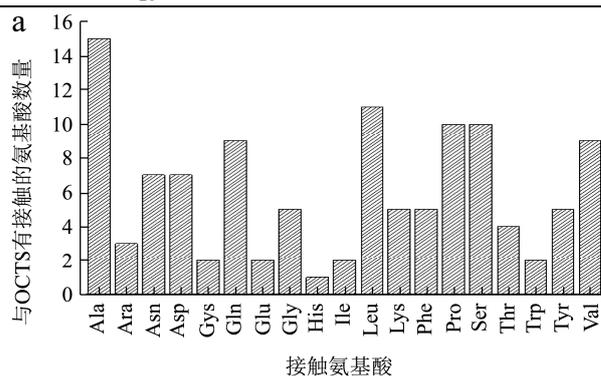


图8 CaLB 中与 OCTS 发生接触的残基数目 (a)、OCTS 与 14 个 CaLB 组装体示意图 (b)

Fig.8 The number of the residues attached with OCTS (a), The scheme of the CaLB assembled with 14 OCTS (b)

2.4 OCTS 对 CaLB 活性位点可及性的影响

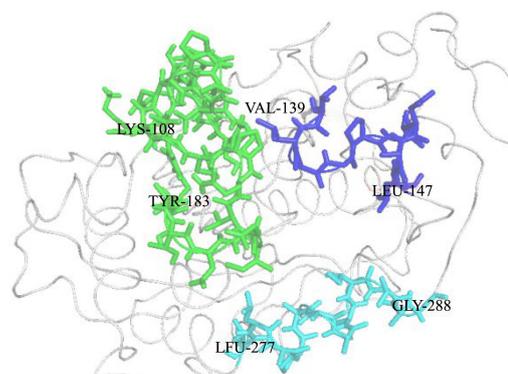


图9 脂肪酶的活性位点入口示意图

Fig.9 The scheme of active site entrance of CaLB

注:深蓝色为 Val139-Leu147 区域,浅蓝色为 Leu277-Gly288 区域。

脂肪酶的底物可及性可以通过 Val139-Leu147 和 Leu277-Gly288 (图 9) 两组螺旋结构的构象变化来表征。因此计算了 Val139-Leu147 的质心与 Leu277-Gly288 质心的距离 (COMAccess)。研究表明,活性位点入口可以定义为 COMAccess<1.5 nm 的封闭状态,中间状态和开放状态分别为 1.5<COMAccess<2.0 nm 和 COMAccess>2.0 nm^[17]。在 40 ns 的模拟时间内,CaLB-OCTS 组装体和游离 CaLB 的 COMAccess 分别

在 1.5~2.1 和 1.5~2.4 nm 之间变化 (图 10), 说明在模拟时间内可以观察到活性部位入口的开放状态。

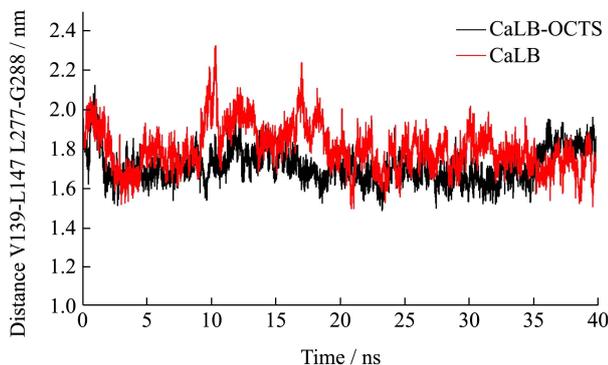


图10 CaLB-OCTS组装体与游离脂肪酶活性位点入口的质心距离

Fig.10 Distance between the COM of CalB-OCTS and CaLB

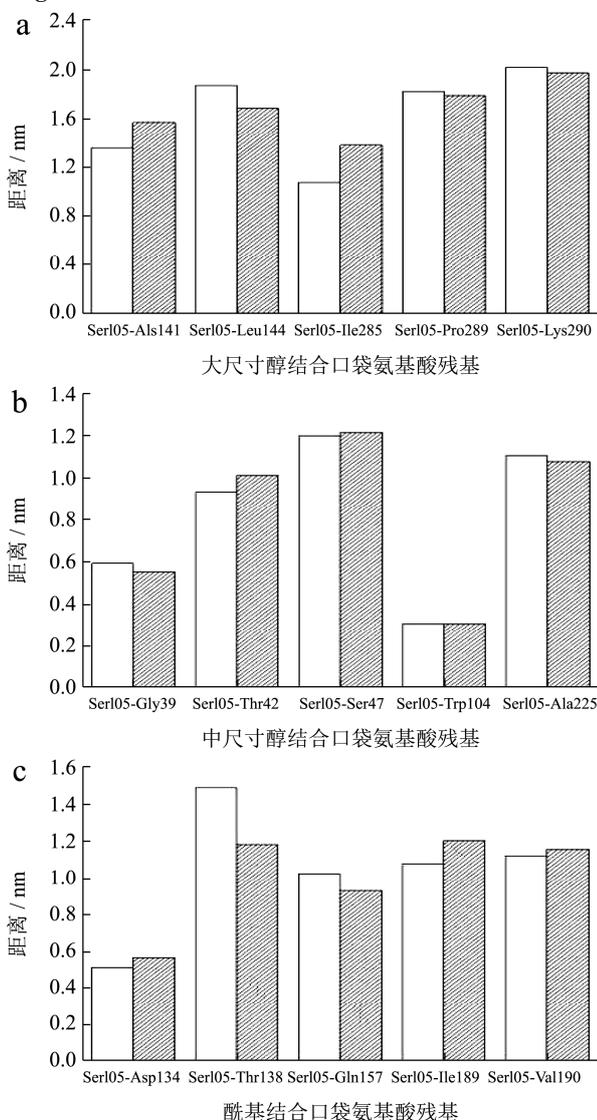


图 11 Ser105 残基与结合口袋的距离

Fig.11 Distance between the C-a atom of the catalytic site Ser105 and the binding pocket

为了表征底物结合口袋的构象变化, 计算丝氨酸

Ser105 残基与下面的口袋之间的距离, 如图 11 显示, 大尺寸醇 (图 11a) 结合口袋 (含有 Ala141、Leu144、Val154、Ile285、Pro289、Lys290); 中尺寸醇 (图 11b) 结合口袋 (含有 Gly39、Thr42、Ser47、Trp104、Ala225); 酰基 (图 11c) 结合口袋 (由 Asp134、Thr138、Gln157、Ile189、Val190 组成)。对比 CaLB-OCTS 和游离 CaLB 的底物口袋表明, 两者的底物口袋的距离差值均低于 0.31 nm, 表明底物结合口袋的结构基本保持一致。

2.5 CaLB 与底物 4-硝基苯对棕榈酸酯分子对接

接

2.5.1 CaLB-OCTS 与底物 (4-硝基苯对棕榈酸酯) 对接以及评分 (XScore)

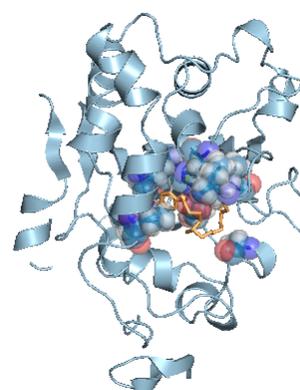


图 12 底物与脂肪酶对接后的模型

Fig.12 A model of substrate docking with lipase

注: 黄色是底物 4-硝基苯对棕榈酸酯。

将文中经 0~40 ns 模拟后 CaLB-OCTS 组装体进行加氢等处理, 然后将底物对接到 CaLB 的活性部位, 表 2 显示的是其对接结果, 对接软件自动对接出 9 种配体-受体复合物对接结果, 并分别对这 9 中复合物进行 XScore 评分, 评分是对对接的配体-受体的复合物的构象或其匹配程度进行评价, 以判断对接结果的合理性, 表 3 为评分结果。结果表明配体 (4-硝基苯对棕榈酸酯) 与脂肪酶分子形成稳定的复合物, 它们的结合能均为负值, 符合理论情况, 且并具有良好的结合亲和性, 其中最稳定的复合物的结合能为 -6.1 kcal/mol。在 XScore 评分中, 评分最高的是 Mode 5 的底物-酶蛋白复合物, 如图 5, 结合能为 -5.1 kcal/mol, 该复合物的 VDW 即范德华相互作用能为 699.3, HB 即配体与蛋白的氢键相互作用为 1.7, 最终评分为 5.89, 表示了该底物-酶蛋白的构象具有合理性以及可靠性。为分析底物-酶蛋白复合物之间的相互作用力, 故将 Mode 5 复合物进行 PLIP 作用力分析。

表 2 Vina 对接结果

Table 2 Docking results

模型	1	2	3	4	5	6	7	8	9
亲和力/(kcal/mol)	-6.1	-5.9	-5.7	-5.2	-5.1	-5.0	-4.8	-4.7	-4.7
rmsd l.b.	0	1.15	1.86	1.38	3.78	2.95	3.35	1.61	2.84
rmsd u.b.	0	1.78	4.38	3.20	7.59	5.20	6.14	2.52	5.24

表 3 XScore 评分结果

Table 3 XScore results

模型	范德华力	氢键	总评分	疏水结合评分	疏水可及表面评分
1	635.8	1.4	5.74	5.46	5.83
2	613.8	0.8	5.62	5.45	5.64
3	570.4	0.4	5.47	5.38	5.43
4	628.9	1.3	5.88	5.97	5.78
5	699.3	1.7	5.89	5.45	6.18
6	536.1	0.8	5.64	5.83	5.47
7	472.0	1.0	5.41	5.87	5.04
8	610.2	0.5	5.79	5.54	5.87
9	509.2	0.6	5.37	5.57	5.16

表 4 疏水效应、盐桥、 π -阳离子相互作用

Table 4 Hydrophobic Interactions, Salt Bridges, pi-Cation Interactions

	序号	残基	氨基酸	距离	配体原子	蛋白原子
疏水效应	1	104A	TRP	3.70	9	1535
	2	134A	ASP	3.87	20	2001
	3	141A	ALA	3.59	18	2112
	4	189A	ILE	3.62	2	2788
	5	190A	VAL	3.96	22	2807
	6	281A	ALA	3.57	10	4122
	7	285A	ILE	3.58	3	4165
	8	285A	ILE	3.32	7	4164
	序号	残基	氨基酸	配体结合原子		
盐桥	1	224A	HIS	24, 25		
π -阳离子相互作用	1	224A	HIS	5, 6, 7, 8, 9, 10		

2.5.2 CaLB 与底物对接后的作用力分析 (PLIP)

表 4 是模拟后的 CaLB-OCTS 蛋白酶与底物对接后评分最高的底物-酶复合物的相互作用力分析, 查阅文献可知, CaLB 的催化活性中心是由一个三联体(由 Ser105、Asp187 和 His224 构成)、一个氧负离子洞(Thr40 和 Gln106) 以及活性口袋(醇结合口袋(含有 Gly39、Thr42、Ser47、Trp104、Ala225、Ala141、Leu144、Val154、Ile285、Pro289、Lys290); 酰基结合口袋(由 Asp134、Thr138、Gln157、Ile189、Val190 组成) 构成, 结果显示, 底物对接进入 CaLB 活性口袋, 其中残基 Trp104、Asp134、Ala141、Ile189、Val190、Ala281、Ile285 与底物分子存在着疏水作用, 残基

Thr40 作为氢键供体与底物分子的氧原子形成氢键相互作用。此外, 活性中心残基 His224 与底物之间直接形成盐桥和 π -阳离子效应。由此表明, 底物 4-硝基苯对棕榈酸酯分子可在 CaLB 的催化活性位点处结合, 彼此在结合过程中所产生的疏水作用是维持底物-酶分子复合物构象稳定性的要作用力。

2.5.3 讨论

目前, 壳聚糖、甲壳素及其衍生物与蛋白间的相互作用的分子动力学模拟研究相对较少。仍有待进一步拓展。

Safoura Salar 通过分子动力学模拟手段研究了离子交联法制备的壳聚糖纳米颗粒与胰蛋白酶 (trypsin) 的相互作用, 由于其仅仅研究了相互作用后的 RMSD、

Rg 以及二级结构组成,得到的结构信息相对有限,建模过程并不清晰。该研究表明,相互作用后, trypsin 的天然结构并未有明显改变^[18]。

Mohammad Yahyaei 对比研究了壳聚糖与甲壳素与促卵泡激素蛋白 (follicle-stimulating hormone, FSH) 的相互作用。该研究以长度为 10 单元的甲壳素或者壳聚糖寡糖链作为长链甲壳素或壳聚糖的模型来进行研究。通过 RMSD、RDF (径向分布函数分析)、RMSF 分析与相互作用能分析表明,糖类与蛋白间的相互作用对蛋白结构稳定性有所提升,但该提升的机制仍有待进一步研究^[15]。

相比之下,本文从蛋白骨架结构分析、相互作用能量分析、活性中心分析、原子波动分析出发,并进一步通过分子对接等手段,分析并提出了,相互作用对酶催化性能及稳定性的影响机制:当 OCTS 与 CaLB 之间的距离越来越远时, CaLB 和 OCTS 之间的可及面积明显降低以及 CaLB-OCTS 之间的平均 COM 显著降低。除此之外, CaLB 与 OCTS 之间的氢键数量随着 CaLB 与溶剂之间氢键数量的减少而增加。在这个自组装过程的初始阶段, CaLB 和 OCTS 之间的静电和 L-J 相互作用起着重要的作用。随后,静电相互作用成为主导。相互作用主要由静电相互作用、疏水相互作用、氢键相互作用等构成,所形成的组装体将蛋白封装在寡糖保护层之中,该保护层在一定程度上替代了水分子与蛋白之间的相互作用,使得蛋白结构更加稳定。

3 结论

本研究采用分子动力学模拟方法研究南极假丝酵母脂肪酶 B 与低聚壳聚糖的相互作用和组装。势能分析表明, CaLB 与 OCTS 之间的静电和 L-J 相互作用在自组装过程的初始阶段起着重要的作用。静电相互作用增强,成为下一阶段的关键驱动力。在模拟过程中, 14 个 OCTS 分子与 1 个 CaLB 分子组装形成 CaLB-OCTS 组装体。证实了 CaLB 与 OCTS 之间的静电相互作用和氢键相互作用。且 OCTS 可以与 CaLB 形成氢键,取代了部分 CaLB 与溶剂之间的氢键。二级结构表明, CaLB-OCTS 与游离酶 (CaLB) 对照相比, CaLB-OCTS 组装体具有更高的 sheet 含量 (12.62% vs 9.78%) 和更低的 loop 含量 (46.50% vs 49.20%)。此外, CaLB-OCTS 组装体保留了其固有的主干以及活性位点口袋的构象。将模拟后的 CaLB-OCTS 酶分子与 4-硝基苯对棕榈酸酯进行分子对接,在分子水平上揭示了酶与底物的相互作用。验证了底物 4-硝基苯对棕榈酸酯分子可结合于 CaLB 的活性位点,疏水作

用在维持酶蛋白-底物复合物发挥着极为重要的作用。总的来说,低聚壳聚糖具有稳定南极假丝酵母脂肪酶结构的潜力。由于低聚壳聚糖可在 CaLB-OCTS 组装体表面提供丰富的氨基和羟基,这种蛋白-低聚壳聚糖组装体在设计和制备相对高性能的固定化酶方面具有很大的潜力。

参考文献

- [1] Liburdi K, Benucci I, Palumbo F, et al. Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines [J]. Food Control, 2016, 63: 46-52
- [2] LONG Jie, YU Xiao-qin, XU En-bo, et al. In situ synthesis of new magnetite chitosan/carrageenan nanocomposites by electrostatic interactions for protein delivery applications [J]. Carbohydrate Polymers, 2015. 131: 98-107
- [3] 张庆,徐溢,曹坤,等.多糖-药物复合物的研究与展望[J].生物化学与生物物理进展,2017,44(4):303-315
- [4] ZHANG Qing, XU Yi, CAO Kun, et al. The Progress and Prospects of Polysaccharide-drug Conjugates [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics. 2017, 44(4): 303-315
- [5] Shinya, S T Fukamizo. Interaction between chitosan and its related enzymes: A review [J]. International journal of biological macromolecules, 2017. 104(Pt B):1422-1435
- [6] Ferrer M, Soliveri J, Plou F J, et al. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from Thermomyces lanuginosus and Candida antarctica B, and their antimicrobial properties [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2005, 36(4): 391-398
- [7] Liu D, Schmid R D, Rusnak M. Functional expression of Candida antarctica lipase B in the Escherichia coli cytoplasm--a screening system for a frequently used biocatalyst [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2006, 72(5): 1024-1032
- [8] 矫春丽,刘学杰.南极假丝酵母脂肪酶 B 在制备手性药物中的应用[J].药学研究,2014,7:406-410
- [9] JIAO chun-li, LIU Xue-jie. The application for candida antarctica lipase B in chiral drugs preparation [J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2014, 7: 406-410
- [10] 肖正华,张惠静,张梦军,等.壳聚糖在酶固定化中的应用[J].西南国防医药,2005,15(3): 339-341
- [11] XIAO Zheng-hua, ZHANG Hui-jing, ZHANG Meng-jun, et al. Application of chitosan in enzyme immobilization [J] Medical Journal of National Defending Forces In Southwest China, 2005, 15(3): 339-341

- [9] 徐鑫煤,陈英文,沈树宝.壳聚糖固定化酶和细胞研究新进展[J].化工科技,2006,14(1):54-57
XU Xin-mei, CHEN Ying-wen, SHENG Shu-bao. Application of chitosan materials for enzyme and cell immobilization [J]. Science & Technology in Chemical Industry 2006, 14(1): 54-57
- [10] Ge J, Lu D, Wang J, et al. Molecular fundamentals of enzyme nanogels [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112(45): 14319
- [11] 张宝花,徐顺.GROMACS 软件并行计算性能分析[J].计算机系统应用,2016,12:16-23
ZHANG Bao-hua, XU Shun. Parallel Computing Performance Analysis on [J]. Gromacs Software Computer Systems and Applications. 2016, 12: 16-23
- [12] Trott, Oleg, Olson, et al. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2009, 31(2): 455-461
- [13] Sebastian S, Sven S, Joachim H V, et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler [J]. Nucleic Acids Research, 2015(W1): W443
- [14] Patino J, Pilosof A. Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8): 1925-1937
- [15] Mohammad, Yahyaei, Faramarz, et al. Protein adsorption onto polysaccharides: Comparison of chitosan and chitin polymers [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 191: 191
- [16] Bekale, L., D. Agudelo, H.A.J.C.S.B.B. Tajmir-Riahi, Effect of polymer molecular weight on chitosan-protein interaction. [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 125: 309-317
- [17] Zisis T, Freddolino P L, Turunen P, et al. Interfacial activation of *Candida antarctica* lipase B: combined evidence from experiment and simulation [J]. Biochemistry, 2015, 54(38): 5969-5979
- [18] Salar S, Mehrnejad F, Sajedi R H, et al. Chitosan Nanoparticles-Trypsin Interactions: Bio-physicochemical and Molecular Dynamics Simulation Studies [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 103: 902-909

(上接第 34 页)

- [15] 刘文颖,谷瑞增,鲁军,等.大豆低聚肽的成分分析及体外抗氧化作用[J].食品工业,2015,36(4):200-203
LIU Wen-ying, GU Rui-zeng, LU Jun, et al. Composition analysis and antioxidant effects in vitro of soy oligopeptides [J]. Food Industry, 2015, 36(4): 200-203
- [16] Chen L, Ejima A, Gu R, et al. Presence of exopeptidase-resistant and susceptible peptides in a bacterial protease digest of corn gluten [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(43): 11948-11954
- [17] 王淼,王洪彬,杨霁菡,等.2709 碱性蛋白酶水解 BSA 蛋白肽谱变化的研究[J].分析测试学报,2015,34(9):1050-1054
WANG Miao, WANG Hong-bin, YANG Ji-han, et al. Study on peptide mapping changes of bsa protein hydrolyzed by 2709 alkaline proteinase [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2015, 34(9): 1050-1054
- [18] 孙大林.养精胶囊提取液对 Leydig 细胞睾酮合成的影响及机制研究[D].南京:南京中医药大学,2012
SUN Da-lin. Effects and mechanisms of Yangjing Capsule extract on testosterone production in leydig cells [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2012
- [19] 徐梓荷.玛咖对雄性小鼠性功能和肠道的影响研究[D].重庆:西南大学,2017
XU Zi-he. Effects of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) on sexual functions and intestine in male mice [D]. Chongqing: Southwest University, 2017
- [20] Lagoda G, Muschamp J W, Vigdorichik A, et al. A nitric oxide synthesis inhibitor in the medial preoptic area inhibits copulation and stimulus sensitization in male rats [J]. Behavioral Neuroscience, 2004, 118(6): 1317
- [21] 杨峰.一氧化氮、诱导型一氧化氮合酶及睾酮与阴茎勃起功能关系的研究[D].郑州:郑州大学,2018
YANG feng. A study on the relationship of nitric oxide inducible nitric oxide synthase testosterone and erectile function [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018
- [22] 曹东,薛润光,顾鉴秋.丽江玛咖不同提取物对小鼠性行为及性激素的影响[J].云南中医药杂志,2012,33(9):53-54
CAO Dong, XUE Run-guang, GU Jian-qiu. Effects of different extracts of Lijiang maca on the sexual behavior and sex hormones of mice [J]. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 33(9): 53-54