

分子动力学模拟与热稳定性实验相结合分析 乙酰氨基葡萄糖与脂肪酶的相互作用机制

郑敦锦^{1,2}, 沈锐锋¹, 何康平¹, 罗佳伟¹, 陈胤熹¹, 黄嘉惠³, 余洁婷¹, 郑少鹏¹, 古伟明^{1,4}, 曹诗林^{1,2*}

(1. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东佛山 528225)

(2. 广东省食品智能制造重点实验室, 佛山科学技术学院, 广东佛山 528225) (3. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510640) (4. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006)

摘要: 该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) 与乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 的相互作用, 以及通过热稳定性实验论证 GlcNAc 对 CaLB 的保护效果。结果表明: 在 323.15 K 下, CaLB 与 GlcNAc 的静电势能与 Lennard-Jones (L-J) 在前 20 ns 模拟时间中显著下降, CaLB-250 mmol/L-GlcNAc 模型在 0~100 ns 时, 静电势能和 L-J 势能分别下降了 3350 kJ/mol 和 2791 kJ/mol, 二者间的氢键数从 0 增加到 115 左右, CaLB 与 GlcNAc 的可及面积 (SASA) 接近于 50 nm²。均方根偏差 (RMSD) 和均方根波动 (RMSF) 数据表明: 游离酶 (Free-CaLB) 模型在 323.15 K 和 353.15 K 下的 RMSD 分别为 0.2617 nm 和 0.3473 nm, 而不同浓度 CaLB-GlcNAc 模型 RMSD 均小于 Free-CaLB 的数值, 且 CaLB-GlcNAc 组装体模型区域 (Val 147-Leu 155) 波动明显小于 Free-CaLB 模型, 说明 GlcNAc 可以减弱 Free-CaLB 的韧性而有效维持脂肪酶的原始结构。热稳定性实验表明: Free-CaLB 及 CaLB-GlcNAc 在 60 °C 下处理 2.0 h, Free-CaLB 的残余酶活力仅为 22.26%, 而 CaLB-GlcNAc 的残余酶活力为 52.11%。综上, 乙酰氨基葡萄糖可以提高游离脂肪酶的热稳定性。

关键词: 南极假丝酵母脂肪酶 B; 乙酰氨基葡萄糖; 分子动力学模拟; 热稳定性

文章编号: 1673-9078(2022)03-74-81

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.3.0492

Molecular Dynamics Simulation Combined with Thermal Stability Experiments to Analyze the Interaction Mechanism between Acetylglucosamine and Lipase

ZHENG Dunjin^{1,2}, SHEN Ruifeng¹, HE Kangping¹, LUO Jiawei¹, CHEN Yinxi¹, HUANG Jiahui³, YU Jieting¹,
ZHENG Shaopeng¹, GU Weiming^{1,4}, CAO Shilin^{1,2*}

(1. School of Food Science and Technology, Foshan University, Foshan 528225, China)

(2. Guangdong Key Laboratory of Food Intelligent Manufacturing, Foshan University, Foshan 528225, China)

(3. School of Food Institute, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China) (4. College of School of Chemical Engineering & Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

引文格式:

郑敦锦, 沈锐锋, 何康平, 等. 分子动力学模拟与热稳定性实验相结合分析乙酰氨基葡萄糖与脂肪酶相互作用机制[J]. 现代食品科技, 2022, 38(3): 74-81

ZHENG Dunjin, SHEN Ruifeng, HE Kangping, et al. Molecular dynamics simulation combined with thermal stability experiments to analyze the interaction mechanism between acetylglucosamine and lipase [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 74-81

收稿日期: 2021-05-07

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); 广东省科技创新战略专项资金项目(pdjh2020b0627); 广州无远生物科技有限公司-企业科研基金(012319705010); 佛山科学技术学院研究生自由探索基金项目(2020ZYTS33)

作者简介: 郑敦锦(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 794345615@qq.com

通讯作者: 曹诗林(1987-), 男, 博士, 讲师, 硕士生导师, 研究方向: 生物合成与生物转化, E-mail: shilin.cao@qq.com

Abstract: In this study, molecular dynamics simulation was used to examine the interaction between *Candida Antarctica* Lipase B (CaLB) and acetylglucosamine (GlcNAc), and demonstrate the protective effect of GlcNAc on CaLB through thermal stability experiments. The results show that at 323.15 K, the electrostatic potential energy of CaLB and GlcNAc as well as Lennard-Jones (L-J) decreased significantly in the first 20 ns simulation time. When the CaLB-250 mmol/L-GlcNAc model was at 0~100 ns, the electrostatic potential energy and LJ potential energy decreased by 3350 kJ/mol and 2791 kJ/mol, respectively, and the number of hydrogen bonds between them increased from 0 to about 115. The accessible area (SASA) of CaLB and GlcNAc is close to 50 nm². The root mean square deviation (RMSD) and root mean square fluctuation (RMSF) data show that the RMSD of the Free-CaLB model at 323.15 K and 353.15 K were 0.2617 nm and 0.3473 nm, respectively, while the RMSF of the CaLB-GlcNAc model at different concentrations was smaller than that of Free-CaLB, and the fluctuation of the CaLB-GlcNAc assembly model region (Val 147-Leu 155) was significantly smaller than that of the Free-CaLB model, indicating that GlcNAc can weaken the toughness of Free-CaLB and maintain effectively the original structure of CaLB. Thermal stability experiments showed that: after Free-CaLB and CaLB-GlcNAc were treated at 60 °C for 2.0 h, the residual enzyme activity of Free-CaLB was only 22.26%, whilst the residual enzyme activity of CaLB-GlcNAc was 52.11%. In summary, the thermal stability of Free-CaLB can be improved by acetylglucosamine.

Key words: *Candida antarctica* lipase; acetyl glucosamine; molecular dynamic simulation; thermal stability

南极假丝酵母脂肪酶 B (CaLB) 是目前被重点研究的一类酯催化剂^[1]。CaLB 具有底物特异性、专一性, 作用条件温和的通性, 但与其它脂肪酶相比, CaLB 具有更宽泛的温度及 pH 值稳定性。CaLB 可催化酯化、水解、聚合等反应^[2], 因此被广泛应用于食品、生物医药^[3]、纺织^[4]等领域。但游离酶存在结构不稳定、易失活的缺点, 限制了其在工业化上的推广应用。据报道, 糖类物质在环境胁迫下(低温、干燥等)可对生物质材料起到保护性作用^[5]。因此, 可加入某些糖类物质作为保护剂提升游离 CaLB 的稳定性和储藏性能。目前, 可作为酶保护剂的糖类包括海藻糖^[6]、壳寡糖^[7]、甲壳素^[8]、羧甲基纤维素^[9]、果糖^[10]等, 不同糖类对生物质材料的保护作用各有差异。

N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetyl glucosamine, GlcNAc) 是许多重要多糖(几丁质和壳聚糖)的基本组成单位, 主要存在于真菌、细菌以及动植物体内^[11], 尤其是在甲壳类生物的外骨骼含量最高^[12]。GlcNAc 易溶于水, 具有消炎^[13]、抗肿瘤^[14]以及抗氧化^[15]等生物活性, 且对维持生物体正常生理功能具有显著作用^[16]。然而, 目前尚未有报道研究乙酰氨基葡萄糖对游离 CaLB 的保护机制及相关实验。

分子动力学模拟能够从分子水平上^[17]模拟蛋白的结构^[18]以及与其他物质间的相互作用^[19]。本文通过分子动力学模拟^[20]与实验相结合的方法研究了南极假丝酵母脂肪酶 B (CaLB) 与乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 装配体的构象, 考察了 CaLB 与 GlcNAc 之间的作用机制对脂肪酶热稳定性的影响规律。CaLB 与不同浓度 GlcNAc 混合生成 CaLB-GlcNAc 溶液混合物模型, 分子动力学模拟后得到较理想的组装体模型, 通过分析 CaLB 总体构象的变化, 然后进行热稳定性实验, 验证分子模拟的结果。本文所建立的分子模拟

方法及实验验证方法, 可以为研究其它酶与糖类物质的作用机制提供借鉴作用。

1 材料与amp;方法

1.1 研究材料

可表达南极假丝酵母脂肪酶 B 的毕赤酵母菌株: 由本实验室自行构建并保藏。

本实验室保存的南极假丝酵母脂肪酶 B (CaLB) 表达质粒 CaLB-HisTag-pPICZαA, 该质粒表达的酶的序列为: EFLVPRGSLPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTC QGASPSVSKPILLVPGTGTGTPQSFDSNWIPSTQ LGYTPCWISPPFMLNDTQVNTTEYMVNAITALYA GSGNNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFFPSIRSKVD RLMAFAPDYKGTVLGAGPLDALAVSAPSVWQQTT GSALTTALRNAGGLTQIVPTTNLYSATDEIVQPQVS NSPLDSSYLFNGKNVQAQAVCGPLFVIDHAGSLTS QFSYVVGRSALRSTTGARSADYGITDCNPLPAN DLTPEQKVAAAALLAPAAAIVAGPKQNCPEPDLM PYARPFVAVGKRTCSGIVTPLVPRGSFLEQKLISEEDL HHHHHH。

乙酰氨基葡萄糖, 购自湖北兴恒业科技有限公司; 棕榈酸对硝基苯酯, 购自上海麦克林生化科技有限公司; 无水乙醇、磷酸盐标准缓冲液 (pH 7.5), 购自源叶生物科技有限公司。

1.2 数据分析与作图相关软件

采用 Modeller 软件^[21-22]对 CaLB 进行同源建模和模型优化, 在线平台 (<https://mag.liulianpisa.top/login>) 与 UCLA-DOE 的 SAVES 服务器 (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>) 对模型进行质

量评估。Packmol 软件^[23]生成不同浓度的 CaLB-GlcNAc 模型, Gromacs 2019.1 软件^[24]对模型进行分子动力学模拟, Pymol 软件显示模型的三维结构。热稳定性实验的原始数据由酶标仪输出。

1.3 研究方法

1.3.1 CaLB 同源建模与模型评估

首先, 在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上获得南极假丝酵母脂肪酶 B (CaLB) (ID:1TCA) 的氨基酸序列作为主要结构模板, 然后应用 BLAST 工具对目标模板进行序列比对, 当模板与目的蛋白的序列相似度大于 30% 时, 利用 Modeller^[21,22]进行同源建模和模型优化。

将优化后的模型放置于在线平台上获得拉氏图, 再使用 UCLA-DOE 的 SAVES 服务器的 Verify_3D 模块进行评分, 二者同时对同源建模的模型质量进行评价。

1.3.2 分子动力学模拟研究方法

分子动力学模拟使用 Gromacs 2019.1 软件^[24]进行分析。分子动力学模拟分析的具体过程如下: 首先, 通过 Packmol 软件^[23]将 CaLB 分别置于大小为 11、10、9 nm 的长方体模拟盒中心, 然后将数量不同的 GlcNAc 及水分子填充到相应的模拟盒中, 得到不同浓度 (250、500、750、1000 mmol/L) 的 CaLB-GlcNAc 模型。为保持盒子的总电荷数为 0, 对各个模型进行电中性处理。采用 Amber 03 力场, 先将体系进行能量最小化 (EM) 处理, 然后进行 100 ps 的约束溶质分子平衡模拟 (NVT、NPT) 处理, 游离 CaLB 在 303.15~323.15 K 具有良好的热稳定性, 故最后将各个模型在 323.15 K 下进行 100 ns 的无约束恒温分子 MD 模拟。待模型平衡后, 输出模拟数据并进行分析。

1.3.3 热稳定性实验设计

将 CaLB 酶样品分别加入 0、250、500、750、1000 mmol/L 的乙酰氨基葡萄糖溶液, 获得 CaLB-GlcNAc 混合溶液; 然后, 将游离 CALB 酶液及混合溶液分别置于 60、70、80 °C 水浴锅中热处理 0、0.5、1.0、1.5、2.0 h, 随后测试酶活性。

酶活性测试方法^[25]如下: 200 μ L 缓冲液与 25 μ L 酶液混合, 加入 25 μ L 底物溶液后, 立即读取 410 nm 波长下 0~5 min 的吸光值, 并以该过程变化曲线的斜率来表征相对酶活, 重复实验三次, 取平均值。

1.4 数据处理

1.4.1 南极假丝酵母脂肪酶 B 与乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 组装分析

势能分析: 分析了 0~100 ns 模拟中 CaLB 与 GlcNAc 之间的静电和 Lennard-Jones 相互作用。氢键、溶剂可达面积 (SASA) 分析: 对 0~100 ns 范围内的 CaLB-溶剂和 CaLB-GlcNAc 进行氢键数和 SASA 分析, 并计算了 GlcNAc 浓度从 0 增加至 1000 mmol/L, 酶与 GlcNAc 之间的氢键数变化情况和蛋白可及面积的变化情况。

1.4.2 南极假丝酵母脂肪酶 B 总体构象变化

均方根波动 (RMSF) 分析: 为研究 GlcNAc 对 CaLB 柔韧性的影响, 对 CaLB 和 CaLB-GlcNAc 的每个残基对计算平均 RMSF。均方根 (Root-mean-square deviation, RMSD) 分析: 计算游离酶模型及 CaLB-GlcNAc 模型的 RMSD, 研究 GlcNAc 对脂肪酶的结构稳定性的影响。

1.4.3 不同温度下 CALB 与乙酰氨基葡萄糖的热稳定性

相对酶活力分析: 将游离 CaLB 酶液 (Free-CaLB) 及 GlcNAc-CaLB 混合液置于 60、70、80 °C 温度下, 分别热处理 0、0.5、1.0、1.5、2.0 h, 之后以棕榈酸对硝基苯酯以底物测定二者的相对酶活力。

2 结果与讨论

2.1 模型评估结果

2.1.1 Ramachandran Plot (拉氏图) 评价

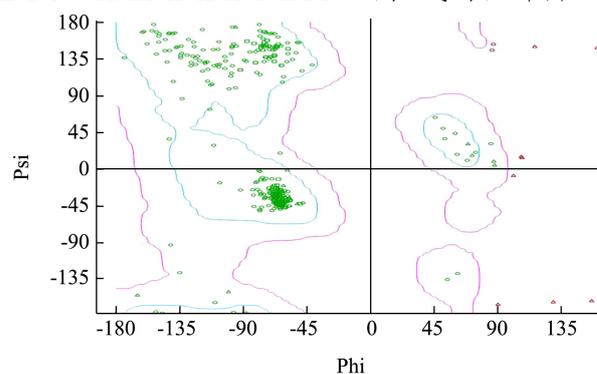


图 1 CaLB 的拉氏图分析结果

Fig.1 Ramachandran plot of CaLB

拉氏图是通过蛋白中非键合原子间最小接触距离来评价两个相邻肽单位骨架构象是否合理, 并以此得出蛋白的允许和不允许区域, 位于允许区域的氨基酸数应占总氨基酸数的 95% 以上^[26]。图 1 中的蓝色区域为“最适区”, 位于该区域的氨基酸数量越多, 则模型的可信度越大; 紫色区域为“允许区”; 白色区域为“不允许区”, 该区域的氨基酸是为构象不合理的氨基酸, 需要进行优化, 且该区域的氨基酸数应小于 5%, 否则模型的可信度低。对图 1 进行数据输出可知: 该模

型的氨基酸总数为 349 个，其中位于不允许区域的氨基酸数为 10 个，占比约为 2.87% < 5%，证明该模型的可信度较高。

2.1.2 Verify_3D 评价

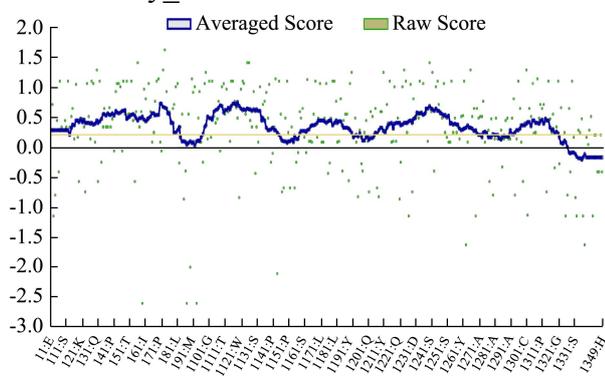


图2 Verify_3D 评价结果

Fig.2 Verify_3D evaluation result

模型的三维结构 (3D) 与氨基酸一级序列 (1D) 的相容性可以通过 Verify_3D 可分析，进而分析模型侧链构象的合理性^[27]。一般而言，超过 80% 氨基酸残基的平均 3D-1D 分数 ≥ 0.2 的模型是可行的，图 2 表示 CaLB 蛋白模型中有 80.22% 氨基酸残基的 3D-1D 分数 ≥ 0.2 ，且大部分的残基 Verify_3D 评分 > 0 ，表明该模型的侧链构象良好，可信度较高。

2.2 CaLB 和 GlcNAc 自组装过程分析

2.2.1 L-J 势能和静电势能分析

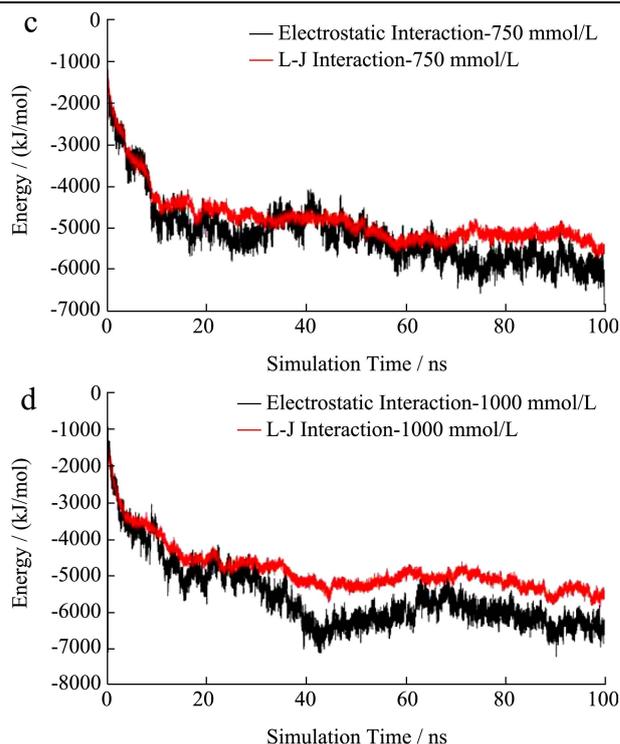
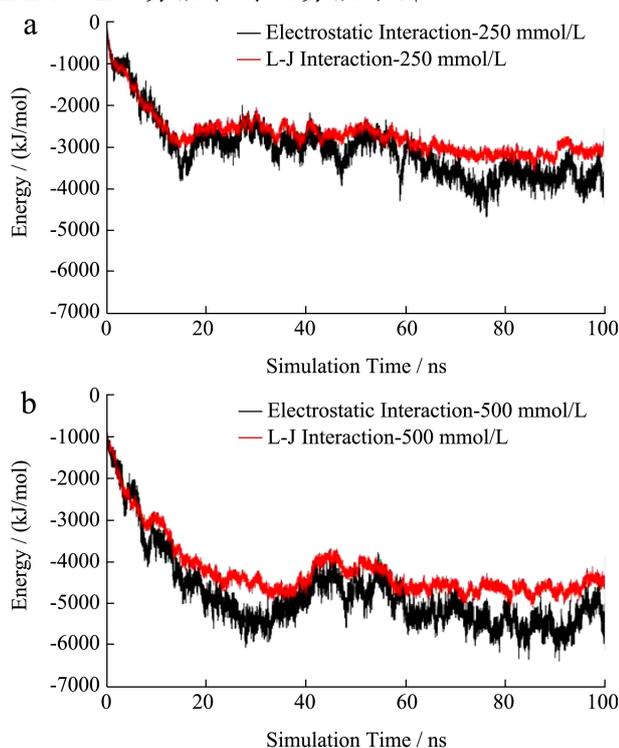


图3 CaLB 与不同浓度 GlcNAc 静电和 Lennard-Jones 相互作用 (323.15 K)

Fig.3 CaLB interacts with different concentrations of GlcNAc electrostatically and Lennard-Jones (323.15 K)

为了研究 CaLB 与 GlcNAc 在溶液中的相互作用，分析了 323.15 K 下 CaLB 与不同浓度 GlcNAc (250、500、750、1000 mmol/L) 的静电和 Lennard-Jones 势能 (图 3)。结果显示，CaLB-GlcNAc 的静电势能与 L-J 势能在前 20 ns 模拟时间中显著降低。此外，随着 GlcNAc 浓度的升高，静电势能与 L-J 势能下降值增大。CaLB-250 mmol/L-GlcNAc (图 3a) 模型在 0~100 ns 模拟过程中，静电势能下降了 3350 kJ/mol，L-J 势能下降了 2791 kJ/mol。1000 mmol/L (图 3d) 的模拟盒在 0~100 ns 模拟过程中，静电势能下降了 4992 kJ/mol，L-J 势能下降了 4340 kJ/mol。结果表明，CaLB 与 GlcNAc 存在静电作用和 L-J 作用，且库仑作用略高于 L-J 作用。

2.2.2 氢键分析

各模型的模拟时间为 0 ns 时，蛋白与溶剂的氢键数 (HBN) 约为 500，蛋白与 GlcNAc 的 HBN 约为 0。比较各模型平衡后的氢键数据可知：当 GlcNAc 浓度增加 500 mmol/L 时，蛋白与 GlcNAc 之间的氢键数逐步增加到 115，GlcNAc 浓度从 500 mmol/L 增加至 1000 mmol/L 时，二者之间的 HBN 变化不显著。表明 250~500 mmol/L 浓度的 GlcNAc 足以覆盖蛋白的表面

并与其形成氢键作用。此外,观察图 4 可知,随着 GlcNAc 浓度的增加,蛋白与溶剂间的 HBN 从 500 下降至 300 左右,而 GlcNAc 与 CaLB 之间的 HBN 则从 0 上升至 150 左右,表明 GlcNAc 与 CaLB 之间形成的氢键能取代部分 CaLB 与溶剂间的氢键。

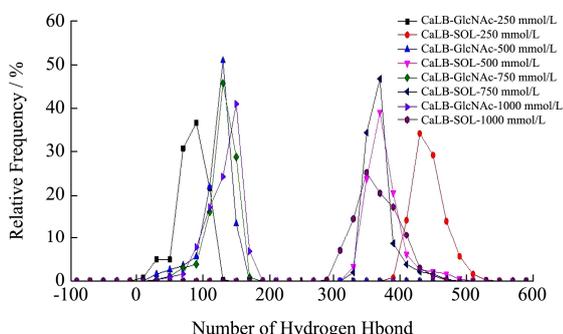


图 4 CaLB 与不同浓度 GlcNAc 时酶与 GlcNAc 及酶与溶剂的氢键数量分析图 (323.15 K)

Fig.4 Analysis of the number of hydrogen bonds between enzyme and GlcNAc and enzyme and solvent when CaLB and different concentrations of GlcNAc (323.15 K)

2.2.3 CaLB 和 GlcNAc 溶剂可及面积 (SASA) 分析

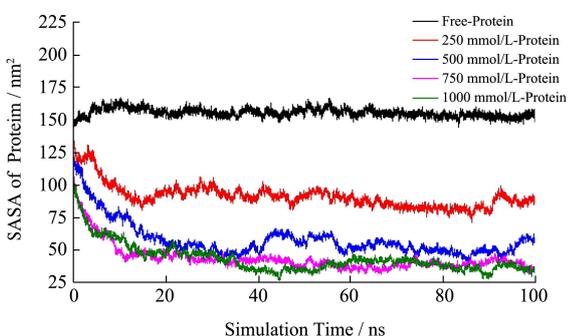


图 5 CaLB 与不同浓度 GlcNAc 的蛋白溶剂可及表面积 (SASA) 数据分析图 (323.15 K)

Fig.5 CaLB and different concentrations of GlcNAc protein solvent accessible surface area (SASA) data analysis chart (323.15 K)

分析蛋白溶剂可及面积 (SASA) 的数据,如图 5。比较各模型的平衡之后的蛋白 SASA 数据可知:模拟时间为 20 ns 时, GlcNAc 浓度从 0 增至 500 mmol/L,蛋白的 SASA 从 160 下降至 50 nm²,当 GlcNAc 浓度增至 750 mmol/L 与 1000 mmol/L,蛋白的 SASA 在 30~40 nm²。因此,蛋白 SASA 的数据表明,在 GlcNAc 浓度在 500 mmol/L 时, GlcNAc 已经充分占据了酶分子的表面,与氢键数量分析的结果相一致。

2.3 CaLB 与 GlcNAc 组装体的整体构象

2.3.1 均方根偏差 (RMSD) 分析

分析模型的均方根偏差 (RMSD) 可以揭示 GlcNAc 对脂肪酶结构稳定性的影响。如图 6 所示,在 323.15 K 下,游离酶模型 (Free-CaLB) 平衡后的 RMSD 约为 0.2617 nm,其余四个不同浓度的 CaLB-GlcNAc 模型的 RMSD 数值均小于 Free-CaLB 模型的 RMSD 数值。

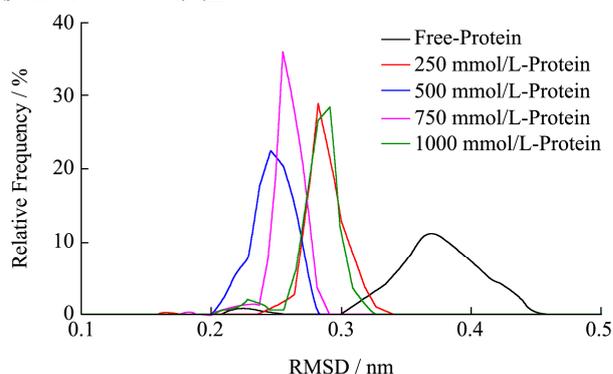


图 6 Free-CaLB-SOL 与不同浓度 GlcNAc 的 RMSD 数据分析图 (323.15 K)

Fig.6 The RMSD data analysis graph of Free-CaLB-SOL and different concentrations of GlcNAc (323.15 K)

表 1 Free-CaLB-SOL 与不同浓度 GlcNAc 最后 10 ns 的 RMSD 平均值数据分析表 (353.15 K)

Table 1 The last 10 ns RMSD average data analysis table of Free-CaLB-SOL and different concentrations of GlcNAc (353.15 K)

GlcNAc 浓度 / (mmol/L)	0	250	500	750	1000
RMSD/nm	0.3473	0.3052	0.3349	0.2667	0.2487

在 323.15 K 的基础上,对 Free-CaLB 与 250、500、750、1000 mmol/L 的 CaLB-GlcNAc 模型进行了升温至 353.15 K 的处理,分析模型最后 10 ns 的 RMSD 来表征升温后 GlcNAc 对脂肪酶的结构稳定性的影响及探究 CaLB 的热稳定性。结果如表 1 所示,在 353.15 K 温度下, CaLB-GlcNAc 模型的 RMSD 数值均小于 Free-CaLB 的 RMSD 数值 (0.3473 nm),揭示 GlcNAc 在 353.15 K 的条件下,仍可有效维持酶的原始结构,并提高其结构稳定性。

2.3.2 均方根波动 (RMSF) 分析

为了研究 GlcNAc 对 CaLB 结构柔性的影响,图 7 对比分析了 Free-CaLB 与不同浓度的 CaLB-GlcNAc 均方根波动 (RMSF) 数据。结果表明,各残基的 RMSF 在 Free-CaLB 和 CaLB-GlcNAc 组装体中表现出相同的趋势。进一步分析 323.15 K 时模拟盒的 RMSF 数据,结果发现在 Free-CaLB 模型中 (Val 147-Leu 155) 区域的波动较大,而 CaLB-GlcNAc 组装体模型在该区域的

波动却有所减弱,表明 (Val 147-Leu 155) 区域在 CaLB-GlcNAc 组装体中的结构柔性较 Free-CaLB 弱。

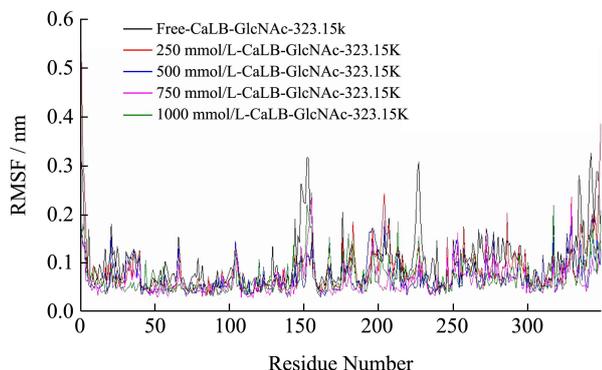


图 7 CaLB 与不同浓度 GlcNAc 的 RMSF 数据分析图 (323.15 K)

Fig.7 CaLB and different concentrations of GlcNAc RMSF data analysis chart (323.15 K)

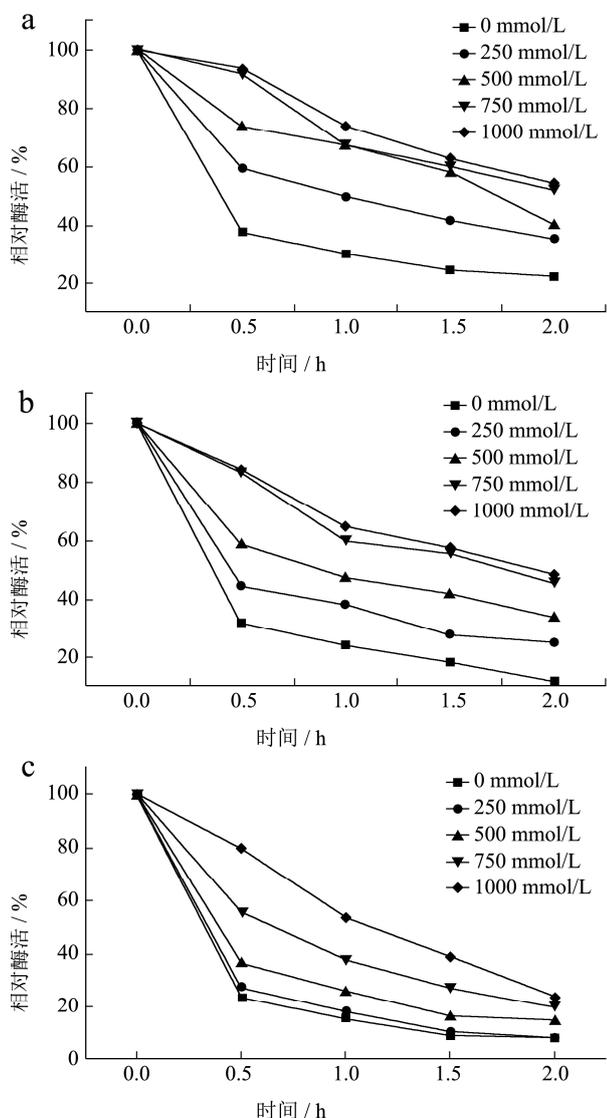


图 8 60 °C (a)、70 °C (b)、80 °C (c) 下 CaLB 与 GlcNAc 的热稳定性

Fig.8 Thermal stability of CaLB and GlcNAc at 60 °C (a), 70 °C (b), and 80 °C (c)

2.3.3 不同温度下 CaLB 与 GlcNAc 的热稳定性分析

为了验证 CaLB-GlcNAc 模型的模拟效果,进行了 CaLB 与不同浓度 GlcNAc 的热稳定性实验。实验结果如图 8 所示, CaLB-GlcNAc 热稳定性要优于游离酶,并且随着 GlcNAc 浓度增加, CaLB 在不同温度热处理时的酶活保留率相对增加。此外,由图 8a 所示,游离 CaLB 在 60 °C 热处理 0.5 h 后,其相对酶活力仅剩 37.21%,而与浓度为 750~1000 mmol/L 的 GlcNAc 共同作用的 CaLB,其相对酶活力保留>90%;在该温度下热处理 2.0 h 后,游离 CaLB 的相对酶活力仅剩 22.26%,而 750~1000 mmol/L GlcNAc 溶液中的 CaLB 活性依旧保持有 52.11%。可见,在溶液中,加入 GlcNAc 可有效提高 CaLB 的热稳定性,这与分子模拟的结果具有一定的吻合之处。

2.3.4 讨论

乙酰氨基葡萄糖是一种功能性糖,但目前关于乙酰氨基葡萄糖与脂肪酶相互作用的分子动力学模拟及热稳定性实验研究鲜有报道。N-乙酰氨基葡萄糖经 β -1,4-糖苷键连接形成甲壳素,甲壳素脱去乙酰基及降解后形成壳寡糖 (OCTS),因此,乙酰氨基葡萄糖与壳寡糖都属于甲壳素衍生物的范畴。杨宝燕^[28]使用分子动力学模拟方法研究了壳寡糖与南极假丝酵母脂肪酶 B 的相互作用机制,模拟结果显示:CaLB 与 OCTS 之间存在静电相互作用和氢键相互作用,并且 CaLB 与 OCTS 之间的氢键数量增加, CaLB 与 OCTS 之间的 SASA 明显降低,使得脂肪酶被壳寡糖包裹住,从而使脂肪酶的蛋白结构变稳定,但壳寡糖在实验中是否能够提高脂肪酶的热稳定性仍需进一步研究。

相比之下,本文不但从分子动力学模拟的角度分析了 GlcNAc 与 CaLB 之间的氢键数、SASA 的变化情况等来研究脂肪酶与乙酰氨基葡萄糖之间的相互作用机制,进一步通过热稳定性实验进行论证,结果显示:乙酰氨基葡萄糖可以提高南极假丝酵母脂肪酶 B 的热稳定性,这与分子动力学模拟结论具有一定的吻合性。

3 结论

本实验利用分子动力学模拟及实验论证方法研究了南极假丝酵母脂肪酶 B 与乙酰氨基葡萄糖的相互作用及酶的热稳定性实验。分子动力学模拟势能与氢键分析表明:CaLB 与 GlcNAc 之间的组装过程存在静电作用和 L-J 作用,并且随着 GlcNAc 浓度的增加,蛋白与 GlcNAc 之间的 HBN 增加 (由 0 增至 115),取代了 CaLB 与溶剂间的部分氢键。此外,当 GlcNAc

的浓度为 250~500 mmol/L 时, GlcNAc 足以覆盖蛋白的表面与其形成氢键作用。RMSD、RMSF 和 SASA 数据表明: 不同浓度的 CaLB-GlcNAc 模型波动程度明显小于 Free-CaLB 模型, 且当 GlcNAc 浓度为 500 mmol/L 时, 酶分子的表面已被 GlcNAc 充分覆盖(此时的 SASA 由 160 下降到 40 nm²), 这表明 GlcNAc 可有效维持脂肪酶的原始结构。CaLB 与 GlcNAc 的热稳定性实验也表明了 GlcNAc 可以有效维持 CaLB 的天然结构并提高其结构的稳定性。

参考文献

- [1] 李远锋,张琨,韩双艳,等.黑曲霉表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B 催化仲醇动力学拆分[J].化学与生物工程,2018,35(5):56-61
LI Yuanfeng, ZHANG Kun, HAN Shuangyan, et al. The surface of *Aspergillus niger* displays *Candida antarctica* lipase B catalyzing the kinetic resolution of secondary alcohol [J]. Chemistry & Bioengineering, 2018, 35(5): 56-61
- [2] 邬琼斯.脂肪酶 CALB 定点突变及其酶促立体选择性研究[D].杭州:浙江大学,2015
WU Qionsi. Study on site-directed mutation of lipase CALB and its enzymatic stereoselectivity [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015
- [3] Manuel Ferrer, Juan Soliveri, Francisco J Plou, et al. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(4): 391-398
- [4] 张为胜,董素青,李诗标.中药有效成分几丁质的研究进展[J].山东中医药大学学报,2002,26(6):476-477
ZHANG Weisheng, DONG Suqing, LI Shibiao. Research progress of chitin, the effective ingredient of traditional chinese medicine [J]. Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2002, 26(6): 476-477
- [5] 张宏梅.糖类物质对固定化脂肪酶的保护作用[J].粮油食品科技,2007,4:38-39,48
ZHANG Hongmei. The protective effect of carbohydrates on immobilized lipase [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2007, 4: 38-39, 48
- [6] 陈艺,陶冶玮,陈文清. β -葡萄糖苷酶冻干保护剂的研究[J].中国酿造,2016,35(9):109-112
CHEN Yi, TAO Zhiwei, CHEN Wenqing. Study on β -glucosidase freeze-dried protective agent [J]. China Brewing, 2016, 35(9): 109-112
- [7] 孙君艳,李淑梅,全胜利.干旱胁迫下壳寡糖对花生幼苗叶片光合特性及保护酶的影响[J].江苏农业科学,2015,43(6):98-100
SUN Junyan, LI Shumei, TONG Shengli. Effects of chitooligosaccharides on photosynthetic characteristics and protective enzymes of peanut seedling leaves under drought stress [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(6): 98-100
- [8] CAO Shilin, GU Weiming, OUYANG Weidong, et al. Preparation, characterization and application of rod-like chitin nanocrystal by using p-toluenesulfonic acid/choline chloride deep eutectic solvent as a hydrolytic media [J]. Carbohydrate Polymers: Scientific and Technological Aspects of Industrially Important Polysaccharides, 2019, 213: 304-310
- [9] 闫倩云,李玲玲,丛方地,等.固定化脂肪酶生物反应器催化合成乙酸正己酯[J].食品工业科技,2015,36(9):171-174,183
YAN Qianyun, LI Lingling, CONG Fangdi, et al. Catalytic synthesis of n-hexyl acetate in immobilized lipase bioreactor [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(9): 171-174, 183
- [10] 苏雪林,董培娜,万银松,等.黑曲霉 C2J6 脂肪酶的保存稳定性研究[J].中国酿造,2018,37(6):36-40
SU Xuelin, DONG Peina, WAN Yinsong, et al. Study on the storage stability of *Aspergillus niger* C2J6 lipase [J]. China Brewing, 2018, 37(6): 36-40
- [11] 张灿.海洋产几丁质酶菌株的筛选,鉴定及其酶学性质研究[D].大连:大连工业大学,2012
ZHANG Can. Screening, identification and enzymatic properties of marine chitinase-producing strains [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2012
- [12] 王顺昌.几丁质及其衍生物的应用进展[J].中国水产,2003,5:70-72
WANG Shunchang. Application progress of chitin and its derivatives [J]. China Fisheries, 2003, 5: 70-72
- [13] Yoshie Y, Akimasa S, Kensuke I, et al. Evaluation of the anti-inflammatory actions of various functional food materials including glucosamine on synovial cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(2): 1353-1359
- [14] 赵莹.N-乙酰氨基葡萄糖对 5-FU 所致大鼠肠粘膜屏障损伤的保护及机制初探[D].重庆:第三军医大学,2012
ZHAO Ying. The protection and mechanism of N-acetylglucosamine on 5-FU-induced intestinal mucosal barrier damage in rats [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2012
- [15] 金黎明,郑奕,杨艳,等.壳聚糖及其衍生物的抗氧化作用[J].食品与发酵工业,2008,34(11):66-68

- JIN Liming, ZHENG Yi, YANG Yan, et al. Antioxidant effect of chitosan and its derivatives [J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(11): 66-68
- [16] 牛腾飞,李江华,堵国成,等.微生物法合成 N-乙酰氨基葡萄糖及其衍生物的研究进展[J].食品与发酵工业,2020,46(1): 278-283
- NIU Tengfei, LI Jianghua, DU Guocheng, et al. Research progress on microbial synthesis of N-acetylglucosamine and its derivatives [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(1): 278-283
- [17] Lili Dong, Shengqiang Shen, Yefei Xu, et al. Identification of novel insect β -N-acetylhexosaminidase of Hex1 inhibitors based on virtual screening, biological evaluation, and molecular dynamics simulation [J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021, 39(5): 1735-1743
- [18] 樊康旗,贾建援.经典分子动力学模拟的主要技术[J].微纳电子技术,2005,42(3):133-138
- FAN Kangqi, JIA Jianyuan. The main techniques of classical molecular dynamics simulation [J]. Micronanoelectronic Technology, 2005, 42(3): 133-138
- [19] M E Tuckerman, G J Martyna. Understanding modern molecular dynamics: techniques and applications [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2000, 104(2): 159-178
- [20] Boumya W, Khnifira M, Machrouhi A, et al. Adsorption of eriochrome black t on the chitin surface: experimental study, DFT calculations and molecular dynamics simulation [J]. Journal of Molecular Liquids, 2021, 4
- [21] Li Daniel, Tsui Brian, Xue Charles, et al. Protein structure modeling in a grid computing environment [C]// 2013 IEEE 9th International Conference on eScience: 2013 IEEE 9th International Conference on eScience (eScience 2013), 22-25 October 2013, Beijing, China: Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2013: 301-306
- [22] Webb B, A Sali. Comparative protein structure modeling using MODELLER [J]. Current Protocols in Protein Science, 2016, 50(1)
- [23] Ge J, Lu D, Wang J, et al. Molecular fundamentals of enzyme nanogels [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112(45): 14319
- [24] Silva L A, Julio C G Correia. GEMS-Pack: a graphical user interface for the packmol program [J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2020, 60(2): 439-443
- [25] 何为,詹怀宇,王习文,等.一种改进的漆酶酶活检测方法[J].华南理工大学学报(自然科学版),2003,31(12):46-50
- HE Wei, ZHAN Huaiyu, WANG Xiwen, et al. An improved laccase enzyme activity detection method [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2003, 31(12): 46-50
- [26] 刘力钊,苗晶晶,赵安冉,等.贝类雌激素受体的同源建模与分子对接研究[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2021,51(6):17-25
- LIU Liru, MIAO Jingjing, ZHAO Anran, et al. Understanding homology modeling and molecular docking of bivalve estrogen receptors [J]. Periodical of Ocean University of China (Natural Science Edition), 2021, 51(6): 17-25
- [27] 刘鸿仪,杨敏,陈依帆,等.Mtb G5K 同源建模及其与[3,2-c]喹啉对接研究[J].化学研究与应用,2020,32(7):1200-1206
- LIU Hongyi, YANG Min, CHEN Yifan, et al. Homology modeling of Mtb G5K and its docking mode with [3,2-c] quinolone [J]. Chemical Research and Application, 2020, 32(7): 1200-1206
- [28] 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 Baoyan, ZHENG Dunjin, HE Kangping, et al. A molecular dynamic study on the mechanism of interaction between chitooligosaccharides and lipase [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 72-81

(上接第 88 页)

- [20] 陈军.特色资源果胶的提取和物理化学性质表征及微射流降解机理[D].南昌:南昌大学,2013
- CHEN Jun. Extraction and physicochemical characterization of pectins from some special resources and the mechanism of pectin degradation induced by dynamic high pressure microfluidization [D]. Nanchang: Nanchang University, 2013
- [21] CAI Liangliang, ZOU Shanshan, LIANG Dengpan, et al. Structural characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Sophorae tonkinensis* Radix [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 184: 354-365