

# $\beta$ -乳球蛋白与 EGCG 结合规律的分子动力学探究

孔庆新<sup>1</sup>, 黄业传<sup>\*2</sup>, 徐伟平<sup>3</sup>, 张径舟<sup>1</sup>, 刘碧林<sup>1</sup>, 李思阳<sup>4</sup>

(1. 重庆化工职业学院 制药工程学院, 重庆 401228; 2. 荆楚理工学院 生物工程学院, 湖北 荆门 448000; 3. 西南政法大学, 重庆 401120; 4. 江苏食品药品职业技术学院 药学院, 江苏 淮安 223001)

**摘要:** 为探究不同 pH 下多酚与蛋白质的结合规律, 以茶多酚 EGCG(表没食子儿茶素没食子酸酯)和  $\beta$ -乳球蛋白为研究对象, 采用分子对接和分子模拟技术研究两者结合能、结合机制分别在 pH 为 2、5、8 时的变化。结果表明, EGCG 主要结合在  $\beta$ -乳球蛋白的 3 个区域; 在结合能最高的结合位点进行 150 ns 分子模拟过程中, 发现 EGCG 的波动幅度比  $\beta$ -乳球蛋白大, 特别是 pH 为 2 时, 但 EGCG 的波动不会影响  $\beta$ -乳球蛋白结构的稳定; pH 为 5 时  $\beta$ -乳球蛋白的疏水表面积、 $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠含量均为最低; EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白在 pH 为 5 时结合能最高, pH 为 8 时最低, pH 为 5 时结合能最高主要由于此时疏水作用力、氢键和范德华力均最强。通过研究可知, pH 会影响蛋白质表面结构, 特别是蛋白质与小分子物质的结合处, 从而影响两者间的结合能、结合位点和结合姿势。

**关键词:** pH;  $\beta$ -乳球蛋白; 多酚; 分子动力学

中图分类号: TS 252.1 文章编号: 1673-1689(2022)01-0051-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.01.007

## Interaction between $\beta$ -Lactoglobulin and Polyphenols Investigated by Molecular Dynamics Simulation

KONG Qingxin<sup>1</sup>, HUANG Yechuan<sup>\*2</sup>, XU Weiping<sup>3</sup>, ZHANG Jingzhou<sup>1</sup>, LIU Bilin<sup>1</sup>, LI Siyang<sup>4</sup>

(1. School of Pharmaceutical Engineering, Chongqing Chemical Industry Vocational College, Chongqing 401228, China; 2. School of Biotechnology, Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China; 3. Southwest University of Political Science and Law, Chongqing 401120, China; 4. College of Pharmacy, Jiangsu Food and Pharmaceutical Science College, Huai'an 223001, China)

**Abstract:** For investigating the effects of pH on the binding between protein and polyphenols. The binding energy and binding mechanism between epigallocatechin gallate(EGCG) and  $\beta$ -lactoglobulin at pH 2, 5 and 8 were respectively studied using molecular docking and molecular dynamics simulation. EGCG mainly bound to 3 sites of  $\beta$ -lactoglobulin. The docking site with the highest binding energy was used for 150 ns molecular dynamics simulation. It was found that the fluctuation of small molecules was larger than that of protein, especially at pH 2, however, the fluctuation of small molecules did not affect the stability of protein structure. The hydrophobic surface area, the content of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet of protein were lowest at pH 5. The highest binding free energy of

收稿日期: 2021-03-19

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究面上项目(17KJB360002); 荆楚理工学院高层次人才启动项目。

作者简介: 孔庆新(1978—), 男, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: 66630906@qq.com

\* 通信作者: 黄业传(1975—), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品加工工程研究。E-mail: hyc2005@sina.com

small molecules to protein was detected at pH 5, while the lowest at pH 8. The highest value was mainly due to the strongest hydrophobic force, hydrogen bond and van der Waals force at pH 5. The difference of pH would affect the surface structure of protein, especially the binding site, thus affecting the binding energy, binding site, and binding posture between protein and small molecule.

**Keywords:** pH,  $\beta$ -lactoglobulin, polyphenols, molecular dynamics

牛乳是一种营养丰富、老少皆宜的食物。近年来,以牛乳为主要原料,添加茶或水果开发出了奶茶、果奶等乳饮料产品,产品形式多样、风味更佳、营养全面。然而,茶、水果等植物原料中含有的多酚类物质易与牛乳中蛋白质作用形成复合物,影响多酚的活性和牛乳蛋白质的性质,进而影响产品的功能和营养特性。很多学者对蛋白质与多酚的结合进行了较深入的研究,如两者间的结合类型、结合位点、结合机理等<sup>[1-5]</sup>。小分子物质与蛋白质的交联主要靠非共价键<sup>[6]</sup>,如氢键、疏水相互作用、范德华力、静电作用,在一定条件下也可共价交联<sup>[7-9]</sup>。

外源植物成分的加入,导致牛乳 pH 发生变化,进而影响多酚与蛋白质的结合,从而影响产品品质。很多学者开展了 pH 对多酚与牛乳蛋白质结合影响的研究,如川陈皮素在酸性 (pH 3.0) 与中性 (pH 7.4) 条件下<sup>[10]</sup>、阿魏酸在酸性 (pH 2.4) 和中性条件 (pH 7.3) 下<sup>[11]</sup>、芦黄素在 pH 分别为 2.6、6.2、7.1、8.2 条件下<sup>[12]</sup>与  $\beta$ -乳球蛋白的交联,没食子酸和表没食子儿茶素没食子酸酯在 pH 分别为 3.0 和 7.0 条件下与天然乳清蛋白的交联<sup>[13]</sup>。刘婵<sup>[14]</sup>模拟了胃 (pH 2.0)、肠 (pH 7.5) 环境下,茶多酚与乳蛋白、消化酶间的结合及三者的竞争情况。

几十年来,学者们将光谱技术、波谱技术、量热技术等用于研究蛋白质的结构,但测得的只是静态结构,而生物体内蛋白质一直处于动态变化中。近年来,分子模拟已成为研究蛋白质结构的一种有效手段,成为继实验和理论手段后,从分子水平认识蛋白质的第 3 种手段,是一种具有足够小的时间尺度和空间尺度的强大模拟技术<sup>[15-16]</sup>。用于蛋白质和小分子物质结合的主要分子模拟手段有分子对接和分子模拟。一些学者采用分子模拟对牛乳蛋白质与小分子物质的结合进行了研究,如柑橘黄酮<sup>[17]</sup>、姜黄素<sup>[18]</sup>、茶多酚<sup>[14]</sup>、芦丁<sup>[19]</sup>等。关于不同 pH 条件下多酚与乳蛋白的交联,一些学者也进行了分子模拟<sup>[10-12,14]</sup>,

刘婵<sup>[14]</sup>的研究涉及茶多酚与  $\beta$ -乳球蛋白的交联,但该研究只使用了分子对接对两者的结合位点和结合能进行探索,分子对接虽能研究蛋白质与小分子物质间的结合模式、结合能,以及蛋白质上参与结合的残基,但无法获得结合的动力学过程,而分子模拟能更深入地研究其结合机制。

$\beta$ -乳球蛋白是牛乳中的一种重要蛋白质,因其具有良好的功能和营养价值,广泛应用于食品中。 $\beta$ -乳球蛋白对疏水及两性配体均具有良好的亲和能力<sup>[20]</sup>。EGCG(表没食子儿茶素没食子酸酯)是茶多酚中主要成分之一,因此,本研究中以  $\beta$ -乳球蛋白和 EGCG 为研究对象,同时用分子对接和分子模拟技术探讨 pH 为 2(酸性)、5(接近等电点)和 8(微碱性)条件下,两者结合能和结合机制的差异,以期为进一步提高茶乳饮料的质量奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 $\beta$ -乳球蛋白与茶多酚 EGCG 的分子对接

$\beta$ -乳球蛋白从 RCSB 网站下载 (ID 号:3npo),下载后用 PyMOL 软件手动除去结晶水。小分子物质 EGCG 用 ChemDraw Professional 17.1 和 Chem3D 17.1 制备,并用其自带的 MM2 力场进行结构优化,通过 AutoDock Tools (1.5.6 版本)对  $\beta$ -乳球蛋白和 EGCG 进行处理,其中 EGCG 加氢、计算 gasteiger 电荷, $\beta$ -乳球蛋白加氢、计算 gasteiger 电荷、合并非极性氢,并分别生成  $\beta$ -乳球蛋白和 EGCG 的 pdbqt 文件。对接采用全盲对接,EGCG 设置为全柔性,盒子大小设定为 40×40×40 Å,中心坐标为默认值,设置间隔为 1 Å。对接时采用 AutoDock Vina 搜索前 20 个得分最高的构象,对接参数 energy\_range 设置为 5,exhaustiveness 设置为 100。

### 1.2 不同 pH 条件下 EGCG 与 $\beta$ -乳球蛋白结合分子模拟

从上述 1.1 得到的能量最高的构象中,剥离出

EGCG 的 pdb 结构,并在 ATB 网站生成其 top 文件。采用 PROPKA 在线计算平台计算  $\beta$ -乳球蛋白在 pH 分别为 2、5、8 时的氨基酸残基质子化状态,根据计算结果来设定  $\beta$ -乳球蛋白的不同质子化状态以模拟相应的 pH。采用 Gromacs(2019.03)软件进行分子模拟,先将 EGCG 合并到  $\beta$ -乳球蛋白中,修改复合物的 top 文件;选用 GROMOS54a7 力场,将  $\beta$ -乳球蛋白置于立方体水盒子中,采用 SPC 水模型,将  $\beta$ -乳球蛋白离盒子边缘最短距离设置为 1 nm 并添加 Na<sup>+</sup>或 Cl<sup>-</sup>使体系达到电中性,使用最速下降法对体系进行能量最小化。在 NVT 和 NPT 系综下分别进行 400 ps 的平衡,达到预设的温度和压力(温度为 300 K,压力为 1 MPa)。最后进行 150 ns 的分子模拟,使用 LINCS 算法约束所有键,使用 PME 计算静电作用,范德华力使用截断半径为 1.4 nm。选用 Parrinello-Rahman 压浴方式,Isotropic 控压方式,V-rescale 控温方式。模拟步长为 2 fs,每 10 ps 贮存 1 次数据,每个处理平行模拟 2 次。

模拟结束后,使用 gmx 的 rms 命令分别分析 150 ns 模拟过程中各 pH 条件下 EGCG 和  $\beta$ -乳球蛋白的均方根误差(RMSD);并用 gmx 的相应命令分析各 pH 条件下  $\beta$ -乳球蛋白结构稳定后(100~150 ns)蛋白质残基的波动(RMSF)、蛋白质二级结构、蛋白溶剂可及表面积。分析时每 100 ps 选取一个数据点,作图用 Origin 8.0 软件。

### 1.3 MM-PBSA 计算 EGCG 与 $\beta$ -乳球蛋白的结合能

提取模拟过程中 100~150 ns 的轨迹,借助 g\_mmpbsa 实用工具,利用 MM-PBSA (Molecular mechanics poisson - boltzmann surface area) 方法计算 EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白之间的结合能<sup>[21-22]</sup>。

### 1.4 EGCG 与 $\beta$ -乳球蛋白结合的二维平面图和表面结构图

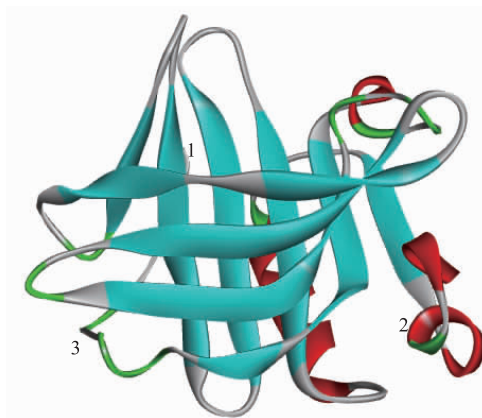
提取各 pH 条件下 EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白复合物在 100~150 ns 的平均 pdb,用 LigPlot+(V 2.2)分析 EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白结合位点的疏水相互作用和形成的氢键,并在 PyMOL 软件中绘制  $\beta$ -乳球蛋白分子的表面结构图及与 EGCG 结合情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\beta$ -乳球蛋白对酚类的结合位点

如图 1 所示, $\beta$ -乳球蛋白单体由 162 个氨基酸

组成,由 8 条反向平行的  $\beta$ -折叠构成桶状结构,其外侧含有 1 个  $\alpha$ -螺旋。



1~3:EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白的结合区域。

图 1 EGCG 在  $\beta$ -乳球蛋白的主要结合位点

Fig. 1 Main binding sites of EGCG to  $\beta$ -lactoglobulin

### 2.2 EGCG 与 $\beta$ -乳球蛋白结合的分子动力学

通过 AutoDock Vina 对接,发现在前 20 个能量较高的结合姿势中,EGCG 在  $\beta$ -乳球蛋白的结合区域主要有 3 个,如图 1 所示,其中最主要是 1 号区域,位于疏水腔的上部,其结合能也较高;另外两个是位于  $\beta$ -乳球蛋白表面的 2 号和 3 号位点,其中 3 号位点只有 20 个对接结果中的 1 个,且结合能较低。关于多酚在  $\beta$ -乳球蛋白结合位点的报道较多,其中但倩誉<sup>[10]</sup>的研究认为在 pH 为 7.4 时,小分子物质(川陈皮素)主要结合在疏水腔,而在酸性条件下(pH 3.0)时小分子物质结合在  $\beta$ -乳球蛋白表面;Abdulatif 等<sup>[19]</sup>也认为芦丁既可以结合在疏水腔也可以结合在蛋白质表面,其中疏水腔的结合力更大。尽管其研究中小分子物质都是偏疏水性,本研究中茶多酚偏亲水性,但研究结果与本研究结果基本一致,因为本研究中下载的  $\beta$ -乳球蛋白为中性 pH。而 Gholami 等<sup>[21]</sup>研究发现柚皮苷只吸附在  $\beta$ -乳球蛋白表面;Zhu 等<sup>[12]</sup>研究阿魏酸与  $\beta$ -乳球蛋白的结合时,发现在酸性条件下(pH 2.4)阿魏酸主要结合在疏水腔,而在中性条件下(pH 7.3)阿魏酸则主要吸附在表面蛋白二聚体的结合处;Li 等<sup>[23]</sup>研究 4 种不同黄酮与  $\beta$ -乳球蛋白的交联时,发现均在 2 号位点的结合能最大。以上结果的差异可能主要与小分子物质结构、初始蛋白质结构或模拟条件的差异有关。

**2.2.1 RMSD (均方根误差) 在模拟过程中的变化** RMSD(均方根误差)是衡量特定时间蛋白质结构与原始构象的平均偏差,是评价研究体系是否稳定的

重要指标,图2是不同质子化状态下体系中EGCG和 $\beta$ -乳球蛋白的RMSD对比。可以看出,EGCG在前60 ns波动较大,在60 ns后基本保持稳定,但pH为2时仍有一定幅度的波动,且就整体波动而言,pH为2时EGCG波动大于pH为5和8时,说明在酸性条件下EGCG与 $\beta$ -乳球蛋白结合过程中波动更大。就 $\beta$ -乳球蛋白的波动而言,3个pH条件下RMSD相当,且均在很短的时间内就达到了平衡(20 ns)。因此,总的来说,不同pH条件下EGCG与 $\beta$ -乳球蛋白的结合很平稳,EGCG只在有限的范围内存在一定的波动,不会对蛋白质结构造成大的影响。Sahihi等<sup>[17]</sup>模拟柑橘黄酮与 $\beta$ -乳球蛋白的交联时也发现结合很平稳,RMSD较小;Gholami等<sup>[3]</sup>研究柚皮苷和 $\beta$ -乳球蛋白的结合时发现小分子物质波动比 $\beta$ -乳球蛋白小;Abdulatif等<sup>[19]</sup>研究芦丁与 $\beta$ -乳球蛋白结合时,发现小分子物质与 $\beta$ -乳球蛋白的波动相当,这些都与本研究的结论基本一致。本研究中,pH为2时 $\beta$ -乳球蛋白与EGCG的波动相当,而pH为5或8时,EGCG的波动略小于 $\beta$ -乳球蛋白。

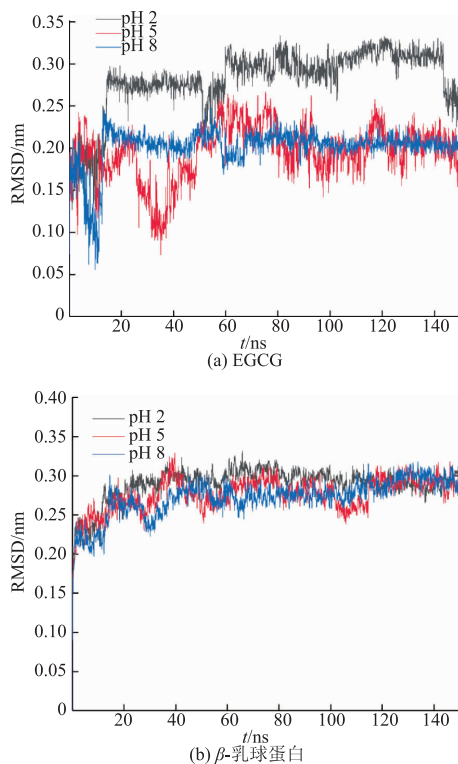


图2 不同pH条件下模拟过程中EGCG和 $\beta$ -乳球蛋白的RMSD对比

Fig. 2 RMSD comparison of small molecule and protein during different pH simulation

**2.2.2 RMSF (均方根涨落) 在模拟过程中的变化** RMSF主要反映蛋白质中各氨基酸残基在不同pH条件下的波动情况,波动越大,说明该残基柔性越大,平均柔性越高蛋白质结构越不稳定。从图3中可以看出,各体系RMSF相当,没有明显差异,说明不同pH总体上对残基波动影响不大。就EGCG和 $\beta$ -乳球蛋白结合口袋附近而言,残基波动较大的有86号位的Ala,87号位的Leu和88号位的Asn。RMSF的结果与Sahihi等<sup>[17]</sup>模拟柑橘黄酮与 $\beta$ -乳球蛋白的结合结果基本一致。

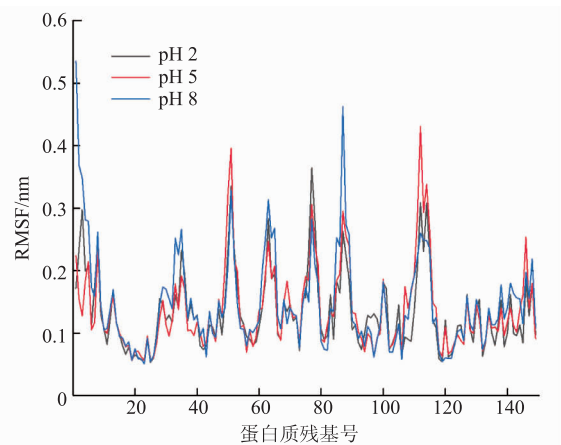


图3 分子模拟过程中不同pH条件下 $\beta$ -乳球蛋白的RMSF对比

Fig. 3 RMSF comparison of different pH during molecular dynamics simulation

**2.2.3 不同pH对蛋白溶剂可及表面积的影响** 从表1可以看出,总溶剂可及表面积、疏水表面积及亲水表面积均是随pH的增加先减少再增加,亲水表面积大于疏水表面积,因此 $\beta$ -乳球蛋白在不同pH条件下总体上均为水溶性。pH从2增加到5时,总溶剂可及表面积的减少可能是由于 $\beta$ -乳球蛋白从单体变为二聚体的原因,而pH从5增加到8时总溶剂可及表面积的增加可能是由于Tanford的转变,即 $\beta$ -乳球蛋白上的EF环(残基85~90)形成了疏水腔的盖子,其在pH低于6.2时关闭,而在高于7.1时打开,盖子关闭时,部分溶剂可及表面积被掩埋<sup>[12]</sup>。从2.2.2的分析也可以看出,波动较大的86~88号残基正是位于EF环上,因此可以推测Tanford转变确有发生。

**2.2.4 不同pH对 $\beta$ -乳球蛋白二级结构的影响** 从表2可以看出,随着pH的升高, $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠均有所降低,pH为5时降至最低;伴随着 $\alpha$ -螺旋和

表 1 不同 pH 对蛋白溶剂可及表面积的影响

Table 1 Effect of different pH on the solvent accessible surface area of lactoglobulin

pH	总溶剂可及表面积/nm <sup>2</sup>	疏水表面积/nm <sup>2</sup>	亲水表面积/nm <sup>2</sup>
2	89.46±1.63	34.28±1.03	55.18±1.30
5	87.92±1.64	33.85±1.19	54.07±1.27
8	90.77±1.57	36.09±1.13	54.68±1.30

β-折叠的降低,无规则卷曲结构有所增加;而转角和弯曲的变化是相反的,pH 为 2 时 β-乳球蛋白中

表 2 不同 pH 对β-乳球蛋白二级结构的影响

Table 2 Effect of different pH on the secondary structure of β-lactoglobulin

单位:个

pH	无规则卷曲	β-折叠	弯曲	转角	α-螺旋
2	27.05±2.25	66.96±2.30	22.50±2.53	17.09±2.91	24.65±2.51
5	28.18±2.48	64.23±2.64	31.28±3.09	13.51±3.51	19.06±2.78
8	32.74±2.95	64.45±3.27	29.31±2.37	11.92±3.25	20.64±2.02

### 2.3 MM-PBSA 分析 EGCG 与 β-乳球蛋白的结合能

从表 3 可以看出,pH 为 5 时 β-乳球蛋白与 EGCG 的结合能最大,其次是 pH 为 2 时,而 pH 为 8 时两者的结合能最低。从具体的能量组成来看,在 3 个 pH 条件下非极性溶剂化能相当,均较低;范德华力为 β-乳球蛋白与 EGCG 结合的主要作用力,其在 pH 为 5 时最高,pH 为 2 时最低;静电作用力在 pH 为 5 时最低,pH 为 8 时最高,pH 不同会使部分残基的侧链带有不同电荷而引起静电作用力的差异,pH 为 5 时最接近 β-乳球蛋白的等电点,所带净电荷最少,从而静电作用力也最低;极性溶剂化能阻碍 β-乳球蛋白与 EGCG 的结合,且随 pH 的增加阻碍作用也增大。Zhan 等<sup>[24]</sup>研究 β-乳球蛋白与辣椒素结合时,用 MM-PBSA 计算得到的结合能是 -142.744 kJ/mol,范德华力为主要结合力,与本研究

转角显著高于另两个 pH,而弯曲的变化则相反。二级结构的变化,意味着蛋白质与多酚在结合时结合位点和结合能可能也会发生变化,从而导致结合的稳定性有所不同。Abdollahi 等<sup>[11]</sup>研究阿魏酸与 β-乳球蛋白结合时,也发现 pH 升高时,α-螺旋和 β-折叠的比例均降低,而无规则卷曲增加,这与本研究中的结果一致。而 Zhu 等<sup>[12]</sup>则发现在不同 pH 条件下 β-乳球蛋白的二级结构变化不大。

结果基本一致。Abdulatif 等<sup>[19]</sup>研究芦丁和 β-乳球蛋白的结合时,用 MM-GBSA 计算出两者在蛋白质表面的结合能为 -285.647 kJ/mol,大于本研究的结果,这可能与小分子物质结构不同有关,也可能与计算方法不同有关。Zhu 等<sup>[12]</sup>研究了 β-乳球蛋白和芹黄素的结合,发现 pH 为 7.1 和 pH 为 8.2 时芹黄素主要靠疏水相互作用吸附在疏水腔,而 pH 为 2.6 和 pH 为 6.2 时主要是靠氢键和范德华力吸附在 β-乳球蛋白表面,不同 pH 条件下吸附能 ( $E$ ) 为  $E(\text{pH } 6.2) > E(\text{pH } 8.2) > E(\text{pH } 7.1) > E(\text{pH } 2.6)$ ,与本研究中的结论有所差异,因为该研究中先在各 pH 条件下分别进行对接,并用各自的最佳对接构象来进行分子模拟和结合能计算,而本研究中起始构象均在疏水腔,因此模拟的起始构象不一样。一些学者也研究了小分子风味物质,如醛、酮、酯等在不同 pH 条件下吸附于 β-乳球蛋白的情况,发现在 pH 为 3~9

表 3 不同 pH 条件下 β-乳球蛋白与 EGCG 结合的 MM-PBSA 结合能变化

Table 3 Effect of different pH on the MM-PBSA binding affinity between protein and EGCG

结合能	能量/(kJ/mol)		
	pH 2	pH 5	pH 8
范德华力	-161.672±13.241	-201.424±12.620	-181.927±13.209
静电作用力	-26.132±11.789	-20.552±13.474	-35.116±12.537
极性溶剂化能	91.281±16.244	113.180±27.026	133.700±20.210
非极性溶剂化能	-18.251±1.245	-21.467±1.280	-20.634±0.917
总能量	-114.774±13.774	-130.262±16.996	-103.976±16.726

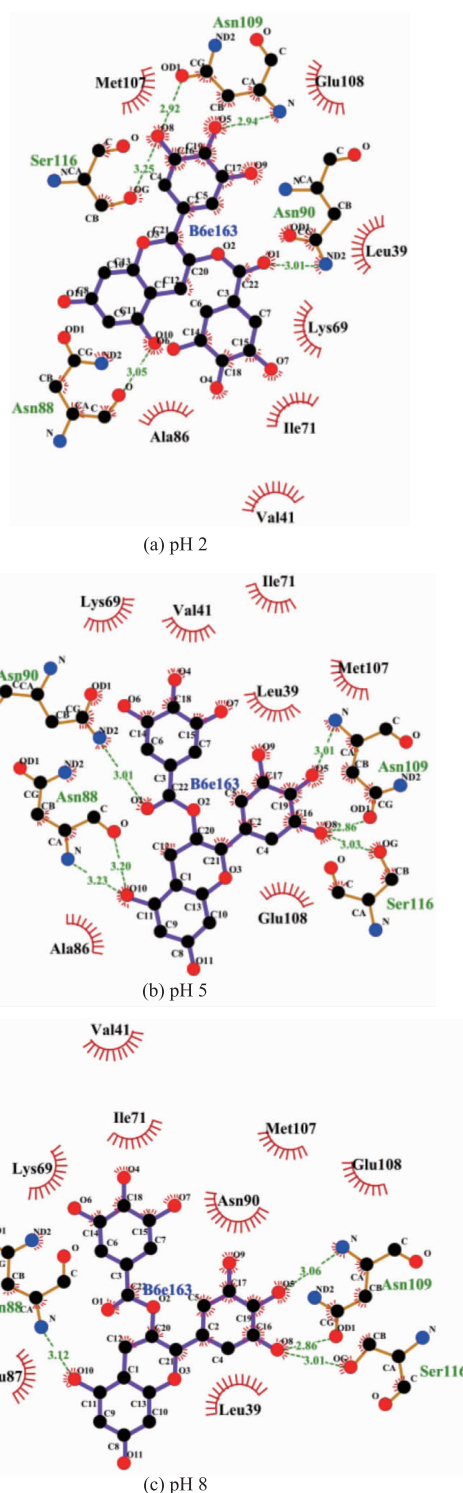
注:数值前“-”表示吸引。

时, pH 越高吸附作用越强<sup>[25-26]</sup>, 原因可能是小分子风味物质相对分子质量较小, 与  $\beta$ -乳球蛋白结合时空间位阻较小, 可结合位点多, pH 增加时  $\beta$ -乳球蛋白的结构变化更有利于这些小分子风味物质的结合或增加了结合位点。

从不同残基的能量贡献值来看, pH 为 2 时排名前 10 的分别是 Leu31、Pro38、Pro113、Asn109、Lys91、Ala37、Glu108、Ala118、Glu89、Leu1; pH 为 5 时排名前 10 的分别是 Met107、Leu58、Ile84、Ile71、Val92、Val43、Ile56、Val41、Phe105、Leu31; pH 为 8 时排名前 10 的分别是 Ile84、Ile71、Leu39、Val41、Glu62、Met107、Leu58、Val92、Pro38、Glu108。可以看出, pH 为 5 时残基均为疏水氨基酸, 这 10 个残基共贡献了 -50.75 kJ/mol 的结合能; pH 为 8 和 pH 为 2 时分别有 8 个和 6 个疏水氨基酸, 这 8 个和 6 个残基分别贡献了 -40.22 kJ/mol 和 -24.42 kJ/mol 的结合能, 说明  $\beta$ -乳球蛋白与 EGCG 在 pH 为 5 时疏水相互作用最强, pH 为 2 时最弱。另外, 排名前 10 的残基中, pH 为 5 和 pH 为 8 时有 6 个残基一样, 而 pH 为 2 时与另外两个 pH 相同的残基很少, 这说明酸性条件下  $\beta$ -乳球蛋白与 EGCG 的相互作用可能发生了较大的变化。

#### 2.4 $\beta$ -乳球蛋白与 EGCG 可能的结合机制分析

从图 4 可以看出, 不同 pH 条件下, EGCG 所处的疏水环境基本一致, 均与周围的 Leu39、Val41、Lys69、Ile71、Met107、Glu108 存在疏水相互作用, 氨基酸环境与 Cheng 等<sup>[27]</sup>报道的天车菊素-3-O-葡萄糖苷在  $\beta$ -乳球蛋白的结合位点基本一致, 也与 Kanakis 等<sup>[20]</sup>报道的 EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白结合后 EGCG 所处的氨基酸环境基本一致。从 2.3 的分析可以看出, 虽然疏水环境相似, 但不同 pH 时  $\beta$ -乳球蛋白疏水残基对结合能的贡献存在明显差异。不同 pH 条件下 EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白形成的氢键数目不同, pH 为 2 时为 5 个氢键, 分别是 88、90、109 位的 Asn 和 116 号位的 Ser, 其中 EGCG 与 109 号位的 Asn 形成 2 个氢键; pH 为 5 时形成了 6 个氢键, 与 pH 为 2 时相比, Asn88 与 EGCG 形成了 2 个氢键; 而 pH 为 8 时只形成了 4 个氢键, EGCG 与 Asn88 和 Ser116 各形成 1 个氢键, 与 Asn109 形成 2 个氢键, 而 Asn90 则与 EGCG 不存在氢键。因此可以推断, 不同 pH 条件下, EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白结合力的差异也部分与氢键有关。从表 3 可以看出, pH



B6e163在二维平面图中代表小分子茶多酚, ●●非配体键, ●●配体键, ●●●●●●氢键及长度, ☀参与疏水相互作用的非配体残基, ●●参与疏水相互作用的相应原子。

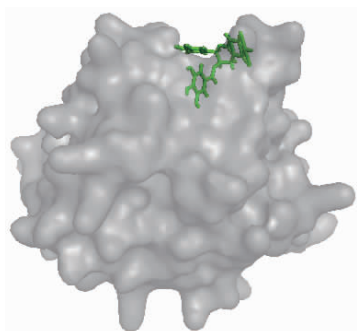
图 4 不同 pH 条件下 EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白相互作用的二维平面图

Fig. 4 2D plot for interaction between EGCG and  $\beta$ -lactoglobulin at pH 2, pH 5 and pH 8

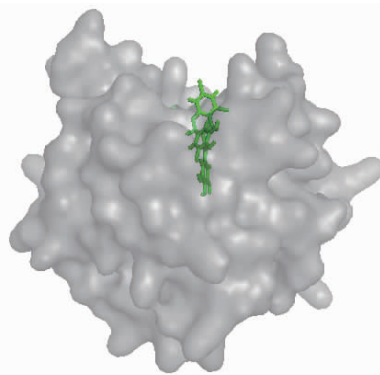
为 5 时静电作用最弱,因此除了氢键以外,EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白的其他弱静电作用也很重要<sup>[28]</sup>。

Abdulatif 等<sup>[19]</sup>研究发现芦丁与  $\beta$ -乳球蛋白的结合时形成 7 个氢键,但最佳结合位点与本研究有所差异。Cheng 等<sup>[27]</sup>报道天车菊素-3-O-葡萄糖苷也吸附在  $\beta$ -乳球蛋白的疏水腔,主要结合力为氢键和疏水相互作用,且形成的氢键有两个分别与 Asn109 和 Ser116 结合,与本研究中一致。贾晶晶<sup>[29]</sup>研究 EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白结合时发现结合力以疏水相互作用为主,同时也有范德华力和氢键。本研究中,EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白之间的结合同时存在氢键、疏水相互作用、静电作用和范德华力。综合分析,pH 为 5 时氢键、疏水相互作用、范德华力均为最大,虽然静电作用力最小,但其贡献有限,因此 pH 为 5 时 EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白的结合能最高。

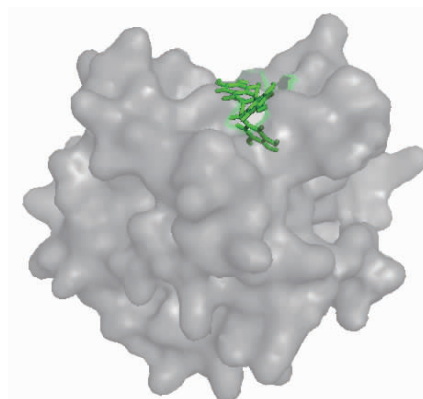
为进一步探索高压对  $\beta$ -乳球蛋白表面结构及与 EGCG 结合的影响,用 PyMOL 软件绘制了不同 pH 质子化状态下 100~150 ns 模拟过程中  $\beta$ -乳球蛋白的表面结构及多酚与  $\beta$ -乳球蛋白的结合情况(见图 5)。由图 5 可以看出,在不同 pH 条件下  $\beta$ -乳球蛋白的表面结构均有差异,特别是在位于疏水腔上部结合口袋处的结构差异较大,结构的差异也必然会导致  $\beta$ -乳球蛋白与 EGCG 的结合产生差异,且 EGCG 的结合姿势明显不同。在 pH 为 5 时 EGCG 更加伸展,也更加靠近疏水腔的内部。因此,pH 为 5 时  $\beta$ -乳球蛋白与 EGCG 的结合能最高可能也与此有关,EGCG 结构越伸展越能与更多的氨基酸侧链发生相互作用,增强氢键和疏水作用力。



(a) pH 2



(b) pH 5



(c) pH 8

图 5 不同 pH 条件下蛋白质分子表面结构及与多酚结合情况  
Fig. 5 Surface structure and polyphenol binding of protein at pH 2, pH 5 and pH 8

### 3 结 语

茶多酚 EGCG 主要结合在  $\beta$ -乳球蛋白的 3 个位点,其中疏水腔的结合最稳定。选取疏水腔作为结合位点,进行 EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白结合的分子模拟,发现结合过程中 EGCG 在模拟前期的波动并不会影响  $\beta$ -乳球蛋白结构的稳定。pH 为 8 时蛋白疏水表面积最大,pH 为 2 时  $\beta$ -乳球蛋白的  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠含量最高,pH 为 5 时这三者均为最低。不同 pH 条件下  $\beta$ -乳球蛋白表面的结构差异较大,特别是位于疏水腔入口的结合位点处,这可能是影响 EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白结合能和结合姿势不同的主要原因之一。EGCG 与  $\beta$ -乳球蛋白的结合能在 pH 为 5 时最高,其次是 pH 为 2 时,而 pH 为 8 时最低;pH 为 5 时,尽管静电作用力低于另外两个 pH,但由于其疏水作用力、氢键和范德华力最强,因此总的结合能较高。本研究中进一步明确了不同 pH 条件

下蛋白质与多酚等小分子物质的结合机理,进而为 提高植物蛋白饮料的质量奠定了一定的理论基础。

### 参考文献:

- [ 1 ] GENG S,JIANG Z,MA H,et al. Interaction mechanism of flavonoids and bovine  $\beta$ -lactoglobulin:experimental and molecular modelling studies[J]. **Food Chemistry**,2020,312:1-8.
- [ 2 ] ZHANG G,WANG L,PAN J. Probing the binding of the flavonoid diosmetin to human serum albumin by multispectroscopic techniques[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2012,60(10):2721-2729.
- [ 3 ] GHOLAMI S,BORDBAR A. Exploring binding properties of naringenin with bovine  $\beta$ -lactoglobulin;a fluorescence,molecular docking and molecular dynamics simulation study[J]. **Biophysical Chemistry**,2014,187:33-42.
- [ 4 ] VANAEI S,PARIZI M S,ABDOLHOSSINI S,et al. Spectroscopic,molecular docking and molecular dynamic simulation studies on the complexes of  $\beta$ -lactoglobulin,safranal and oleuropein[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,165:2326-2337.
- [ 5 ] MOHSENI-SHAHRI F S,MOEINPOUR F,MALAEKEH-NIKOUEI B,et al. Combined multispectroscopic and molecular dynamics simulation investigation on the interaction between cyclosporine A and  $\beta$ -lactoglobulin[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2017,95:1-7.
- [ 6 ] PU P,ZHENG X,JIAO L,et al. Six flavonoids inhibit the antigenicity of  $\beta$ -lactoglobulin by noncovalent interactions;a spectroscopic and molecular docking study[J]. **Food Chemistry**,2021,339:1-8.
- [ 7 ] JAKOBEK L. Interactions of polyphenols with carbohydrates,lipids and proteins[J]. **Food Chemistry**,2015,175:556-567.
- [ 8 ] SUI X,SUN H,QI B,et al. Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins:focus on covalent and non-covalent interactions[J]. **Food Chemistry**,2018,245:871-878.
- [ 9 ] WANG K,ARNTFIELD S D. Probing the molecular forces involved in binding of selected volatile flavour compounds to salt-extracted pea proteins[J]. **Food Chemistry**,2016,211:235-242.
- [10] 但倩誉.  $\beta$ -乳球蛋白与川陈皮素相互作用机制研究[D]. 武汉:华中农业大学,2019.
- [11] ABDOLLAHI K,INCE C,CONDICT L,et al. Combined spectroscopic and molecular docking study on the pH dependence of molecular interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and ferulic acid[J]. **Food Hydrocolloids**,2020,101:1-10.
- [12] ZHU J,LI K,WU H,et al. Multi-spectroscopic,conformational,and computational atomic-level insights into the interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with apigenin at different pH levels[J]. **Food Hydrocolloids**,2020,105:1-13.
- [13] 曹艳芸. 乳清蛋白与多酚在中性 pH 条件下的相互作用对蛋白功能性质的影响研究[D]. 无锡:江南大学,2017.
- [14] 刘婵. 体外消化环境下多酚与蛋白、酶间的竞争相互作用及其对多酚和蛋白功能特性的影响研究[D]. 无锡:江南大学,2017.
- [15] 陈刚. 高压引发脂肪酶分子构象变化与催化行为关系的研究[D]. 无锡:江南大学,2017.
- [16] 刘吉元. 蛋白质与配体相互作用分子模拟研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2014.
- [17] SAHIHI M,GHAYEB Y. An investigation of molecular dynamics simulation and molecular docking:interaction of citrus flavonoids and bovine  $\beta$ -lactoglobulin in focus[J]. **Computers in Biology and Medicine**,2014,51:44-50.
- [18] MOHAMMADI F,SAHIHI M,KHALEGH A. Multispectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of two curcuminoids with  $\beta$ -lactoglobulin[J]. **Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy**,2015,140(1):274-282.
- [19] ABDULATIF A S N,MASOOD K J,AJAMALUDDIN M,et al. Molecular insight into binding behavior of polyphenol (rutin) with beta lactoglobulin:spectroscopic and molecular docking and MD simulation studies[J]. **Journal of Molecular Liquids**,2018,269:511-520.
- [20] KANAKIS C D,HASNI I,BOURASSA P,et al. Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols[J]. **Food Chemistry**,2011,127:1046-1055.
- [21] KUMARI R,KUMAR R,LYNN A M. *g\_mmpbsa*—A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations[J]. **Journal of Chemical Information and Modeling**,2014,54:1951-1962.
- [22] ISLAM M A,PILLAY T S.  $\beta$ -secretase inhibitors for Alzheimer's disease;identification using pharmacoinformatics[J]. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**,2018,37:503-522.



- [23] LI T, HU P, DAI T, et al. Comparing the binding interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking[J]. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2018, 201: 197-206.
- [24] ZHAN F, DING S, XIE W, et al. Towards understanding the interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with capsaicin: multi-spectroscopic, thermodynamic, molecular docking and molecular dynamics simulation approaches[J]. **Food Hydrocolloids**, 2020, 105: 1-10.
- [25] VAN RUTH S M, VILLENEUVE E. Influence of  $\beta$ -lactoglobulin, pH and presence of other aroma compounds on the air/liquid partition coefficients of 20 aroma compounds varying in functional group and chain length[J]. **Food Chemistry**, 2002, 79: 157-164.
- [26] JOUENNE E, CROUZET J. Effect of pH on retention of aroma compounds by  $\beta$ -lactoglobulin[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2000, 48: 1273-1277.
- [27] CHENG J, LIU J H, PRASANNA G, et al. Spectrofluorimetric and molecular docking studies on the interaction of cyanidin-3-O-glucoside with whey protein,  $\beta$ -lactoglobulin[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017, 105: 965-972.
- [28] ZHANG J, ZHANG L, XU Y, et al. Deciphering the binding behavior of flavonoids to the cyclin dependent kinase 6/cyclin D complex[J]. **Plos One**, 2018, 13(5): 1-18.
- [29] 贾晶晶. 多酚类物质与牛乳  $\beta$ -乳球蛋白及  $\beta$ -半乳糖苷酶相互作用的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2018.

## 科技信息

### 欧盟批准 3-岩藻糖基乳糖作为新型食品投放市场

2021年11月19日,欧盟委员会发布法规(EU)2021/2029号条例,根据欧洲议会和理事会法规(EC) No 2015/2283,批准3-岩藻糖基乳糖(3-Fucosyllactose)作为新型食品投放市场,并修订欧盟委员会实施条例(EU)2017/2470附件涉及新型食品使用要求。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟批准3-岩藻糖基乳糖作为新型食品投放市场 [EB/OL]. (2021-11-22).<http://news.foodmate.net/2021/11/612661.html>