

基于计算模拟高效筛选蛋白酶制备胶原蛋白三肽的方法

郝锦亨¹, 郭睿¹, 李叶¹, 方晓嘉¹, 林璐菁², 林丽炫², 张薄博¹

(1. 汕头大学理学院生物系, 广东汕头 515063) (2. 广东亿超生物科技有限公司, 广东汕头 515064)

摘要: 为筛选出能够高效分解胶原蛋白的蛋白酶, 首先通过分子对接和分子模拟技术, 利用虚拟筛选出的蛋白酶水解罗非鱼胶原蛋白粉, 测定其水解度、分子量及动力学常数并研究分子相互作用机制。结果显示, 筛选出对胶原蛋白水解效果良好的碱性蛋白酶、牛胰蛋白酶与中性蛋白酶的结合能分别为 -7.09 、 -6.74 、 $-6.62 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。对 3 种蛋白酶进行水解测定发现碱性蛋白酶在 pH 值为 9, 温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下对罗非鱼胶原蛋白粉有着良好的水解能力, 其水解度达到 30.22%, 其水解产物的平均分子量为 548.23 Da, 胶原三肽含量达到了 51.34%, 其米氏常数 (K_m) 为 $4.26 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最大反应速率 ($V_{\max}$) 为 $1.16 \mu\text{g}\cdot(\text{min}\cdot\text{mL})^{-1}$, 优于中性蛋白酶与胰蛋白酶。50 ns 的分子动力学模拟分析表明, 与 1NPC-GPH 和 3MFJ-GPH 相比, 1AH2-GPH 的 RMSD 在 15 ns 后达到平衡, 并在 $0.175 \text{ \AA}$ 附近震荡, 平均氢键数为 4, 回旋半径最终稳定在 1.67 nm 左右。此结果表明经虚拟筛选技术筛选出的碱性蛋白酶与罗非鱼来源的蛋白亲和性好, 特异性强, 可为胶原蛋白三肽的生产提供重要参考。

关键词: 分子对接; 胶原蛋白三肽; 蛋白酶; 分子动力学模拟

文章编号: 1673-9078(2026)6-237-245

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0380

Computational Simulation-based Method for the Efficient Screening of Proteases in Collagen Tripeptide Production

HAO Jinheng¹, GUO Rui¹, LI Ye¹, FANG Xiaojia¹, LIN Lujing², LIN Lixuan², ZHANG Bobo^{1*}

(1. Department of Biology, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China)

(2. Guangdong Yichao Biological Co. Ltd., Shantou 515064, China)

Abstract: To screen the proteolytic enzymes that can efficiently degrade collagen, molecular docking and molecular dynamics (MD) simulations were employed to virtually screen proteases for hydrolyzing tilapia collagen powder. The degree of hydrolysis (DH), molecular weight distribution, kinetic constants, and molecular interaction mechanisms were subsequently determined. Results revealed that the binding energies for the three proteases exhibiting favorable collagen hydrolysis-alkaline protease, bovine trypsin, and neutral protease-were -7.09 , -6.74 , and $-6.62 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. Enzymatic hydrolysis assays demonstrated that the alkaline protease exhibited excellent hydrolytic activity toward tilapia collagen powder under optimal conditions (pH value 9, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$), achieving a DH of 30.22%. The hydrolysates had an average molecular weight of 548.23 Da, with collagen tripeptides accounting for 51.34% of the total. The Michaelis constant (K_m) and maximum reaction velocity ($V_{\max}$) were $4.26 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $1.16 \mu\text{g}\cdot(\text{min}\cdot\text{mL})^{-1}$, respectively. Thus, alkaline protease outperformed both the neutral protease and trypsin. MD simulations over 50 ns indicated that

引文格式:

郝锦亨, 郭睿, 李叶, 等. 基于计算模拟高效筛选蛋白酶制备胶原蛋白三肽的方法[J]. 现代食品科技, 2026, 42(6): 237-245.

HAO Jinheng, GUO Rui, LI Ye, et al. Computational simulation-based method for the efficient screening of proteases in collagen tripeptide production [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 237-245.

收稿日期: 2025-03-18; 修回日期: 2025-07-05; 接受日期: 2025-07-08

作者简介: 郝锦亨 (2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学, E-mail: 23jhhao@stu.edu.cn

通讯作者: 张薄博 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物发酵、食品与生物医药, E-mail: bbzhang@stu.edu.cn

the complex 1AH2-GPH (alkaline protease) reached equilibrium after 15 ns, with the root mean square deviation fluctuating around 0.175 Å. This complex maintained an average of four hydrogen bonds and a stable radius of gyration (R_g) of approximately 1.67 nm. In contrast, complexes 1NPC-GPH and 3MFJ-GPH exhibited less stability. These findings indicate that the alkaline protease identified through virtual screening exhibits high affinity and specificity for tilapia-derived protein, providing important reference for collagen tripeptide production.

Key words: molecular docking; collagen tripeptide; protease; molecular dynamic simulation

在所有结缔组织细胞外基质的主要材料中,胶原蛋白的含量占动物总蛋白质的 25%~35%^[1],是脊椎动物中结构蛋白含量最丰富的一种。胶原蛋白的分子量约为 300 kDa,直径约为 14~15 Å,长约为 2 800 Å。它由三条称为三螺旋构象的多肽链组成,包含重复序列 (Gly-X-Y)_n,其中 X 和 Y 的位置多为 PRO 和 HYP^[2]。在产品研发上,以骨修复贴、创面修复、药物输送和美容为主导^[3,4]。然而,胶原蛋白属于大分子化合物,其产品存在难以吸收等问题^[5]。同时,人工提取的胶原中含有一定的免疫原性,增加了其应用的潜在风险^[6]。

胶原三肽是一种含有三种氨基酸的小肽,由胶原蛋白或明胶水解而得。与分解前的胶原蛋白相比,胶原蛋白三肽的溶解性和热稳定性更好,可以直接在体内吸收,具有很高的利用率,能促进肌肤^[7]、抑制皮肤糖化^[8]、并被用于治疗膝骨关节炎和软骨钙质沉着症^[9]。而在胶原三肽中,GPH 在多种生理功能中发挥作用。在 Chae 等^[10]的研究中,GPH 通过靶向 GR 信号通路,抵消应激激素皮质醇对皮肤胶原蛋白的降解作用,从而发挥保护皮肤结构和抗衰老的效应。正因为如此,胶原三肽正逐渐成为近期研究热点,拥有良好的商业价值。

胶原蛋白肽的酶解工艺一般以内切蛋白酶水解为主,生成具有特定活性的胶原蛋白三肽,其方法具有条件温和、不破坏氨基酸、无毒副产物等优点^[11]。然而,如何筛选获得可高效水解胶原蛋白的蛋白酶仍是一个难点。其中一个原因是大多数筛选蛋白酶的研究仍然遵循传统方法,需要大量劳动力和成本。而计算机方法^[12]可以提高筛选效率并在一定程度上避免传统方法的弱点^[13]。

分子对接和分子动力学模拟技术能够对分子间的相互作用进行深入的阐述,在药物研制上也有着重要的地位^[14]。分子对接是一种基于“锁钥原理”理论发展起来的技术,能识别一系列小分子与其受体的最佳结合模式^[15]。分子动力学模拟是一种计算机模拟原子尺度的分子运动的技术,其理论基础是经典牛顿力学。通过给每个生物分子提供适当的力场,模拟出原子间的相互作用关系^[16]。因此将分子模拟辅助分析与实验

验证相结合是筛选能有效分解出大量胶原三肽的蛋白酶的有效方法。

为筛选出能够高效水解胶原蛋白的蛋白酶,本研究基于酶-底物催化过程中的结合作用原理,采用分子对接技术,依托自行构建的蛋白酶数据库进行批量分子对接,初步筛选出具有高效生产胶原蛋白三肽潜力的酶。随后,采用 OPA 荧光标记法、高效液相色谱法 (HPLC)、测定酶反应动力学与分子动力学评估的协同分析策略,遴选优势蛋白酶配方,为探索蛋白酶的筛选方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

黄牛来源胰蛋白酶 T819002 (活力为 2 500 U·mg⁻¹),上海麦克林;来源于枯草芽孢杆菌的碱性蛋白酶 (活力为 200 U·mg⁻¹) 与中性蛋白酶 (活力为 110 U·mg⁻¹),夏盛生物科技开发有限公司;罗非鱼胶原蛋白粉,广东亿超生物科技有限公司;Bradford 蛋白浓度 P0006 测定试剂盒,上海碧云天。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白酶数据库的建立与虚拟筛选

以“蛋白酶”为关键词,以分辨率≤2.5、pH 值 (6.0~8.0)、蛋白晶体中有配体结合的条件进行筛选,在 RCSB 数据库^[17]中检索下载的与蛋白酶有关的三维结构文件。而后,利用从 MEROPS 数据库^[18]下载到的蛋白水解酶与 RCSB 检索筛选下载到蛋白酶进行对比,去除结构不合理的部分,最终构建一个小型蛋白酶数据库。

以 GPH 为目标,利用 pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[19]检索下载其三维结构文件,作为配体用于虚拟筛选。在酶的处理上,使用 Python 编写的脚本对数据库中的蛋白酶进行批量去水加氢操作,且将蛋白酶的 PDB 结构文件批量转化为用于对接的 PDBQT 格式文件。为确定蛋白酶的对接口袋,使用 p2rank 对蛋白酶数据库内的蛋白酶进行批量蛋白质口袋预测^[20],编写含有 p2rank 对接参数的配置文件

生成脚本用于做批量分子对接。最后调用 AutoDock-Vina^[21]进行批量分子对接。通过对接分数对比查找,选择具有最低预测结合能的对接姿势作为蛋白酶与GPH的建议结合构象,而后进行配体与受体结合情况分析^[22]。

1.2.2 胶原蛋白三肽水解产物的制备

将蛋白粉按照 0.1 g : 3 mL 的料水比加入超纯水中,煮沸解聚 10 min。加入 0.015 g 蛋白酶。在其最适 pH 值和温度条件下酶解 5 h。而后通过沸水浴 10 min 使酶失活,并于 8 000 r·min⁻¹下离心 10 min 后取 1 mL 上清制备而成。

1.2.3 蛋白酶最佳水解条件的探索

酶解产物的水解度使用 OPA 法进行测定^[23],并以此为依据探究蛋白酶的最适 pH 值和最适温度。

OPA 试剂的配置方法:将 0.1 mol·L⁻¹ 无水四硼酸钠溶液,与 3.46×10⁻³ mol·L⁻¹ SDS 溶液进行混合,最终配置成硼酸盐缓冲溶液。而后,将称取一定量的 DTT,溶于 40 mg·mL⁻¹ 的 97% OPA 无水乙醇溶液中,配备成 44 mg·mL⁻¹ 的 DTT 与 OPA 混合溶液,使用蒸馏水定容至 50 mL 后即得 OPA 试剂。

丝氨酸标准曲线绘制方法:取 5 mL 离心管,分别加入 0、100、200、300、400 μL 丝氨酸母液,再各加入 3.0 mL OPA 试剂,混合均匀后室温反应 2 min,以蒸馏水为参比,于 334.5 nm 波长处测定吸光度。根据测得的吸光度结合丝氨酸浓度绘制标准曲线。

样品水解度测定方法如下:取 1.0 mL 水解液,稀释 200 倍后取 400 μL 的稀释液,加入 3.0 mL OPA 试剂,反应 2 min 后测定 334.5 nm 处吸光度。

将实验测定的吸光度平均值与 C_{Serine-NH₂} (mmol·L⁻¹) 标准曲线进行对比查询,并根据该公式计算水解度。

$$H = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% = \frac{\left(\frac{C_{serine} \times V \times N}{m \times x} - 0.4 \right)}{h_{tot} \times 1.0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

H ——水解度, %;

h ——水解的肽键数, mmol·g⁻¹;

h_{tot} ——总肽键数,单位 mmol·g⁻¹, 胶原蛋白为 7.8 mmol·g⁻¹;

C_{Serine} ——样品中 L-Serine 的当量浓度, mmol·L⁻¹;

V ——样品溶解定容体积, L;

N ——样液稀释倍数;

m ——样品质量, g;

x ——样品中蛋白质含量, %。

1.2.4 高效液相色谱测定水解产物的平均分子量和胶原三肽含量

1.2.4.1 高效液相色谱法条件

色谱柱: TSK gel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm (GEL LOT 502R); 流动相: 乙腈:水, 体积比为 40:60, 含 0.05% (ϕ) 三氟乙酸; 检测波长: 220 nm; 流量: 0.5 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样体积: 10 μL。

1.2.4.2 样品处理

将罗非鱼胶原蛋白溶液分为对照组、中性蛋白酶酶解组、碱性蛋白酶酶解组、胰蛋白酶酶解组。对照组静置 5 h 后离心取上清, 其余各组按照各蛋白酶的最佳条件制备出胶原三肽溶液。参考 GB 31465-2018 的要求制备流动相, 并与各组蛋白溶液融合制成样品溶液, 将样品溶液超声振荡 10 min 后使用 0.22~0.45 μm 聚四氟乙烯或尼龙滤膜过滤到色谱瓶中, 设定波长 220 nm, 流量 0.5 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL 为测定条件进行测定。

1.2.5 酶反应动力学常数的测定

利用罗非鱼来源的蛋白粉分别配制质量浓度为 16、20、25、30、50、100 mg·mL⁻¹ 的罗非鱼胶原蛋白溶液。分别向各浓度胶原蛋白溶液中加入碱性蛋白酶、中性蛋白酶与胰蛋白酶至终质量浓度为 6.67 mg·mL⁻¹, 在最适条件下反应 40 min, 而后, 使用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 根据 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 可计算出以罗非鱼胶原蛋白为底物时的各蛋白酶的米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max})。

1.2.6 分子动力学模拟

利用经过分子对接后所产生的蛋白酶-GPH 复合物的 pdb 文件, 使用 gromacs 2020.6 进行 50 ns 的分子动力学模拟^[24]。分子动力学模拟采用 Amber99SB-ILDN 力场^[25], 使用 GaussView 5.0 进行加氢。溶液环境采用 TIP3P 水分子^[26], 使用周期性边界条件, 体系到水盒子边界距离设定为 0.8 nm, 而后加入 Na⁺ 和 Cl⁻ 使模拟体系电荷为 0。随后采用最速下降法迅速优化分子结构, 再采用共轭梯度法优化直至收敛。在 300 K 温度下和 1 atm 压力下, 进行时长为 100 ps 的 NVT 平衡和 NPT 平衡。采用 PME 方法处理静电相互作用, 进行 50 ns 的全原子分子动力学模拟, 其模拟积分步长为 2 fs。模拟结束后, 使用 gromacs 内置工具进行 RMSD 和 RMSF 的稳定性分析、回旋半径分析以及氢键相互作用分析。

1.2.7 数据分析

所有实验作 3 次重复, 以平均值 ± 标准差表示结

果,使用 SPSS 28 对数据进行 Turkey’s 检验显著性分析 ($P<0.05$)^[27],使用 Origin 2021 与 QtGrace 作图。对配体与受体的对接情况使用 LigPlot⁺ 进行作图,使用 Pymol^[28]和 VMD^[29]分析分子动力学后的结果。

2 结果与讨论

2.1 分子对接结果

使用 AutoDock-Vina 对上述所构建的蛋白酶数据库与 GPH 进行批量分子对接,选择具有最低预测结合能的对接姿势的 3 种蛋白酶进行研究。分子对接结果如表 1 所示,其中 1AH2、3MFJ 和 1NPC 与 GPH 的预测结合能分别为 -7.09、-6.74 和 -6.62 kcal·mol⁻¹。

表 1 蛋白酶与GPH对接后的结合能

Table 1 Binding energy of the protease and GPH after docking

蛋白酶	PDB 号	结合能 /(kcal·mol ⁻¹)
碱性蛋白酶	1AH2	-7.09
牛胰蛋白酶	3MFJ	-6.74
中性蛋白酶	1NPC	-6.62

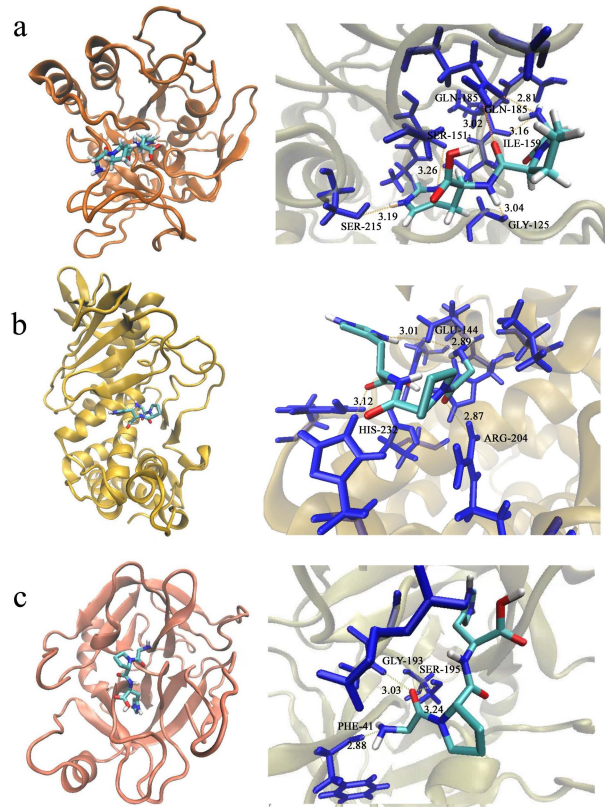


图 1 GPH 与蛋白酶的分子对接结果

Fig.1 The results of molecular docking between GPH and proteases

注:(a) 1AH2 碱性蛋白酶;(b) 1NPC 中性蛋白酶;(c) 3MFJ 牛胰蛋白酶。

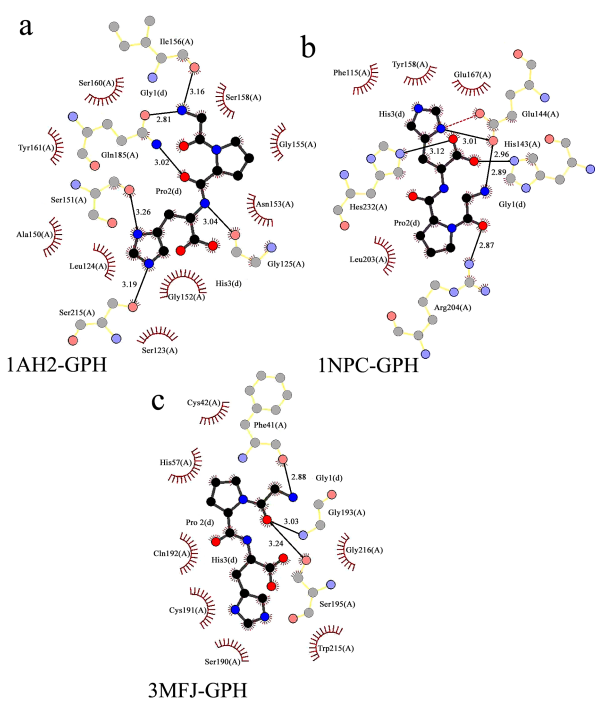


图 2 蛋白酶与 GPH 的相互作用

Fig.2 The interaction between proteases and GPH

注:(a) 1AH2 碱性蛋白酶;(b) 1NPC 中性蛋白酶;(c) 3MFJ 牛胰蛋白酶。

为了更进一步探究 1AH2 (碱性蛋白酶)、3MFJ (牛胰蛋白酶)、1NPC (中性蛋白酶) 与 GPH 之间的相互作用,运用 Ligplot⁺ 软件对表中的 3 种酶与 GPH 的结合模式进行分析。如图 1 所示。图中展示了 GPH 和蛋白酶结合的方式以及关键残基之间的相互影响。由图 2a 可以看出,1AH2 与 GPH 的结合能分数最优,受体与配体之间有 6 个残基发生了相互作用,其中 Ser215、Ser151、Ile159、Gly125、Gln185 与 GPH 形成 6 个氢键,键长分别为 3.19、3.26、3.16、3.04、3.02、2.81 Å。从图 2b 可以看出 1NPC 与 GPH 的 4 个残基发生了相互作用,其中 His232、Arg204、Glu144 与 GPH 形成 4 个氢键,键长分别为 3.12、2.87、3.01、2.89 Å。而从图 2c 可以看出,3MFJ 与 GPH 的结合能分数较差,受体与配体之间有 3 个残基发生了相互作用,其中 Phe41、Ser195、Gly193 与 GPH 形成了 3 个氢键,键长分别为 2.88、3.24 与 3.03 Å。

同样的,分析蛋白-配体相互作用二维图可得到 3 种酶与 GPH 的疏水相互作用详细信息,1AH2 与 GPH 间参与疏水作用的氨基酸残基主要有 Ser160、Ser158、Tyr161、Gly155、Ala150、Asn153、Leu124、Gly152、Ser123 等;而 1NPC 与 GPH 间参与疏水作用的氨基酸残基主要有 Phe115、Tyr158、Glu167、

Leu203、Val140等；3MFJ与GPH间参与疏水作用的氨基酸残基主要有Cys42、His57、Gln192、Cys191、Ser190、Gly216、Trp215。这表明蛋白酶与GPH之间主要作用力以氢键和疏水作用力为主。

2.2 蛋白酶最佳水解条件的探索

以罗非鱼胶原蛋白粉为原料进行单因素水解实验，并利用标准曲线计算胶原蛋白水解度，探究各蛋白酶反应的最适温度和pH值条件，实验结果如图3和图4所示。

综合图3和图4的结果可知，以罗非鱼胶原蛋白粉为原料使用碱性蛋白酶在pH值为9，温度为50℃的情况下水解度最高，水解度达到30.22%。在pH值为8，温度为55℃的条件下，牛胰蛋白酶的水解度最高，达到19.53%。而在pH值为7、温度为45℃的环境中，中性蛋白酶的水解度最高，达到16.81%。根据以上条件，利用高效液相测定不同酶在最优条件下水解后的平均分子量，进一步探究水解情况。

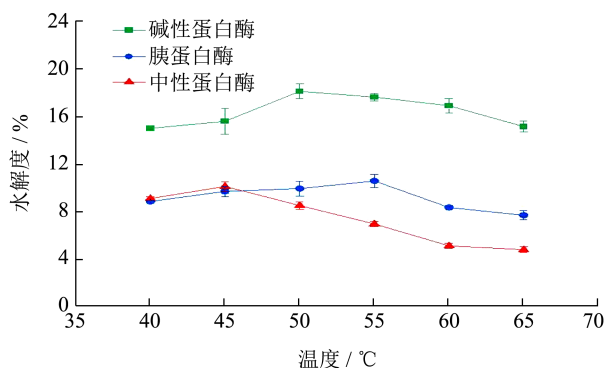


图3 在不同温度下三种蛋白酶的水解度

Fig.3 Hydrolysis of three proteases at different temperatures

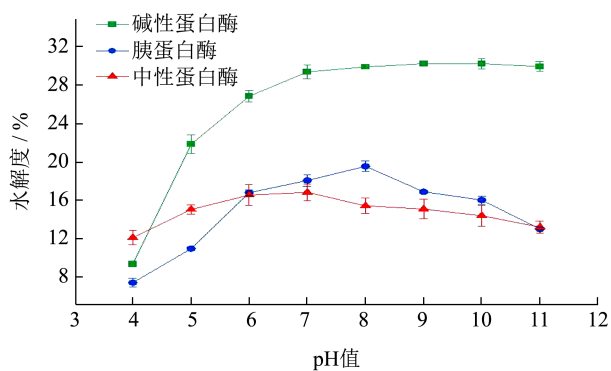


图4 在不同pH值下三种蛋白酶的水解度

Fig.4 Hydrolysis of three proteases at different pHs

2.3 UHPLC-Q-TOF-MS/MS测定酶解蛋白的平均分子量

经蛋白酶解后得到的蛋白溶液的平均分子量变化如图5所示。来自罗非鱼的胶原蛋白粉在经过3种蛋

白酶的酶解后，其分子量都有明显的下降，说明三种蛋白酶都具有良好的酶解效果。其分子量的平均排序为：原料>中性蛋白酶>胰蛋白酶>碱性蛋白酶，表明在三种蛋白酶中，碱性蛋白酶对胶原大分子的分解效果最好，分解后的平均分子量达到548.23 Da左右，接近于胶原蛋白三肽的平均分子量，而胰蛋白酶与中性蛋白酶对胶原大分子的分解效果较差，分别为707.77 Da与889.97 Da，其水解分子量未达到胶原三肽的平均分子量。与对接评分相结合来看，3种蛋白酶的水解效果的优劣与分子对接的评分结果基本一致。

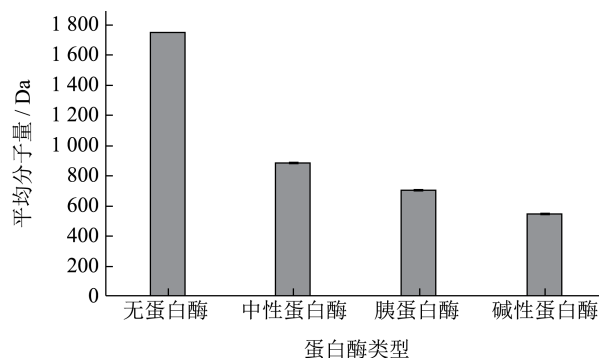


图5 被不同蛋白酶酶解后的罗非鱼来源胶原蛋白粉平均分子量

Fig.5 The average molecular weights of collagen powder derived from tilapia after being hydrolyzed by different proteases respectively

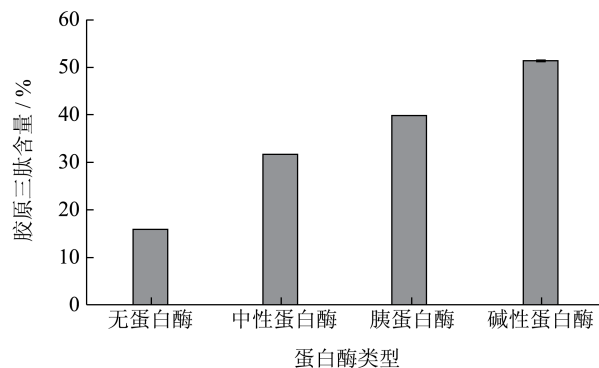


图6 罗非鱼胶原蛋白粉被不同蛋白酶酶解后三肽的面积占比

Fig.6 The proportion of the area of tripeptides after the collagen powder derived from tilapia were hydrolyzed by different proteases respectively

图6展示了酶解后胶原三肽的占比情况。由于胶原三肽的分子量约为300~500 Da，因此采用峰面积归一化法测定酶解产物中300 Da组分的峰面积百分比。图6显示，罗非鱼来源的胶原蛋白肽经三种蛋白酶酶解后，其胶原三肽的峰面积以碱性蛋白酶>胰蛋白酶>中性蛋白酶为特征，差异明显。表明经水解后，碱性蛋白酶的胶原三肽含量为51.34%，明显多于胰蛋白酶与中性蛋白酶的39.79%与31.84%，酶解效果良

好。可见,在测试出的几种酶中,经碱性蛋白酶水解后的胶原蛋白粉的平均分子量最低,水解后所产生的胶原三肽的分子量最高。

2.4 酶动力学常数的测定

米氏常数(K_m)是常用的酶的反应动力学常数,它表示酶反应速率(V)为最大反应速率一半时的底物浓度, K_m 值越小,表示酶与底物的亲和力越大。如图7所示,当以罗非鱼蛋白粉为底物时,碱性蛋白酶的米氏常数(K_m)为 $4.26\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,最大反应速率($V_{\max}$)为 $1.16\text{ }\mu\text{g}\cdot(\text{min}\cdot\text{mL})^{-1}$,胰蛋白酶的米氏常数(K_m)为 $25.79\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,最大反应速率($V_{\max}$)为 $1.24\text{ }\mu\text{g}\cdot(\text{min}\cdot\text{mL})^{-1}$,中性蛋白酶的米氏常数(K_m)为 $11.31\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,最大反应速率($V_{\max}$)为 $0.40\text{ }\mu\text{g}\cdot(\text{min}\cdot\text{mL})^{-1}$ 。在三种蛋白酶中,碱性蛋白酶的米氏常数相对于胰蛋白酶与中性蛋白酶更小,说明以罗非鱼蛋白粉为底物时,碱性蛋白酶相比胰蛋白酶与中性蛋白酶水解效果更好。

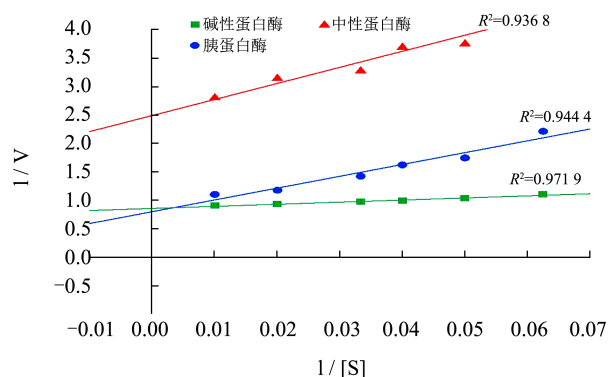


图7 三种蛋白酶水解罗非鱼皮蛋白的 Lineweaver-Burk 图

Fig.7 Lineweaver-Burk plots for the hydrolysis of Tilapia skin protein by three types of proteases

2.5 分子动力学模拟

2.5.1 均方根偏差

均方根偏差(RMSD)是评估蛋白质与配体构象稳定性的有效指标,反映了原子位置相对于初始结构的偏移程度,RMSD值越小,稳定性越高。如图8d所示。1AH2(碱性蛋白酶)与GPH复合物体系在模拟时间15 ns后达到平衡,并在平均值 $0.175\text{ }\text{\AA}$ 附近震荡,表明1AH2-GPH复合物达到稳定状态;1NPC(中性蛋白酶)与GPH复合物的RMSD值在模拟时间15 ns后达到平衡,并最后在在 $0.15\text{ }\text{\AA}$ 附近震荡,震荡幅度较大。在实际实验结果中酶解效果最差;3MFJ(牛胰蛋白酶)与GPH复合物的RMSD值在模拟时间4 ns左右达到

平衡,RMSD波动稳定在 $0.1\text{ }\text{\AA}$ 左右。表明3种复合物中,相较于中性蛋白酶而言,碱性蛋白酶与胰蛋白酶结构波动更小,表明1AH2-GPH与3MFJ-GPH具有相对于1NPC-GPH较高的结合稳定性。

2.5.2 均方根扰动

均方根波动(RMSF)表示的是某个氨基酸残基相对于参考构象的结构变化,反应了氨基酸残基的自由度。如图8a所示,对3组轨迹进行RMSF分析表明,1AH2-GPH与的平均残基波动约为 0.1 nm ,而残基51~64、70~80、249~260区域的灵活性发生显著变化,表明这些区域可能发生一些构象变化;由图8b可以看出,1NPC-GPH的平均残基波动约为 0.098 nm ,大多数残基没有太大波动。而195-210号残基波动较大,残基位于不规则结构中,总体比较稳定;而从图8c可以看出,3MFJ-GPH的平均残基的波动约为 0.076 nm 左右,表明大多数区域的灵活性没有显著改变,在50 ns模拟的过程中较为稳定。

2.5.3 氢键数目分析

氢键是一种分子间弱键相互作用,氢键数量反映其受体-配体复合物的结合稳定性。氢键分析(图8e)表明,在50 ns的模拟中,3种蛋白酶与GPH之间都存在氢键相互作用。其中1AH2与GPH之间观察出有4个氢键,最高生成7个氢键,表明1AH2-GPH稳定性良好;1NPC与GPH之间平均生成2~3个氢键;3MFJ与GPH之间平均生成3~4个氢键。三种蛋白酶与GPH都存在氢键相互作用,其中1AH2与GPH间存在的氢键数量最多,相较于1NPC与3MFJ而言存在较强的氢键相互作用。

2.5.4 回转半径分析

回转半径(R_g)是系统在模拟过程中的质量加权平均半径。通常用于确定蛋白质-配体在结合过程中的紧密性和折叠稳定性。图8f表明,在整个模拟过程中,1NPC与GPH复合物稳定在 2 nm 左右;1AH2与GPH复合物稳定在 1.67 nm 左右;3MFJ与GPH复合物稳定在 1.64 nm 左右。说明在50 ns的模拟中,1AH2-GPH与3MFJ-GPH结构相较于1NPC-GPH更加稳定。

2.6 讨论

胶原三肽是一种含有三种氨基酸的小肽,由于胶原三肽在工业和消费领域有着众多的应用。因此,筛选出能大量酶解出胶原三肽的蛋白酶并探索出通过计算机辅助筛选蛋白酶方法具有重要意义。

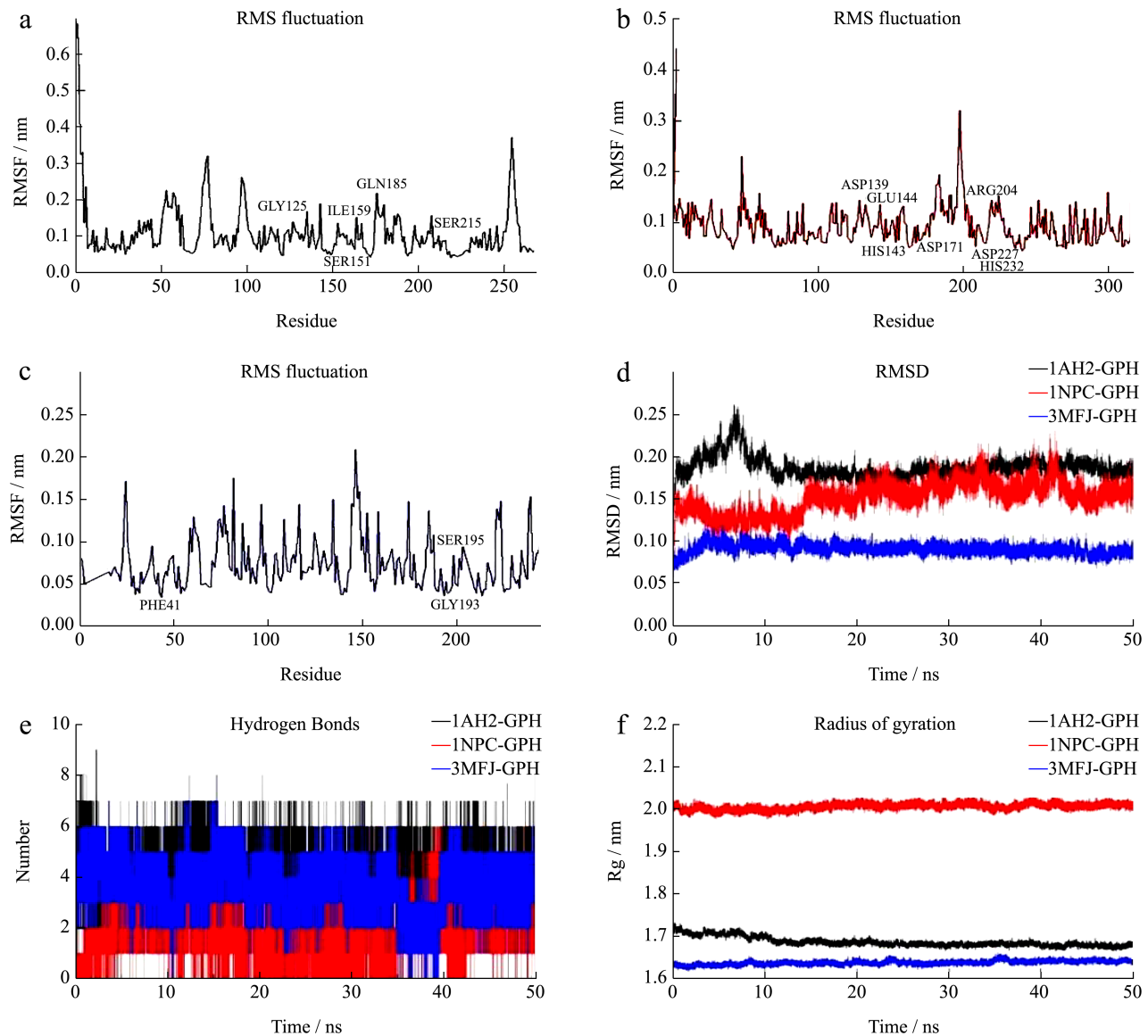


图 8 50 ns 分子动力学中 1AH2 (碱性蛋白酶)、1NPC (中性蛋白酶)、3MFJ (牛胰蛋白酶) 与 GPH 复合物模拟的各项指标

Fig.8 Various indicators of the simulations of complexes of 1AH2 (alkaline protease), 1NPC (neutral protease), 3MFJ (bovine trypsin) with GPH in the 50 ns molecular dynamics

注: (a) 1AH2-GPH 的均方根扰动 (RMSF); (b) 1NPC-GPH 的均方根扰动 (RMSF); (c) 3MFJ-GPH 的均方根扰动 (RMSF); (d) 3 种复合物在 50 ns 模拟中的平均方根误差 (RMSD); (e) 在 50 ns 模拟过程中 3 种复合物中生成的氢键数量; (f) 在 50 ns 模拟过程中 3 种复合物的回转半径 (RMSF)。

虚拟筛选是一种被广泛使用的方法,用于从大型化合物库中识别某种具有新活性的化合物。本研究采用虚拟筛选方法,以胶原三肽 GPH 作为配体,从自行构建的蛋白酶数据库进行分子对接,最终筛选出碱性蛋白酶、牛胰蛋白酶与中性蛋白酶。结果显示,碱性蛋白酶、牛胰蛋白酶、中性蛋白酶与 GPH 的结合能分别为 -7.09 、 -6.74 、 $-6.62 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明三种蛋白酶与 GPH 展现出较强的结合亲和力。其中,碱性蛋白酶的结合亲和力最高,具有良好的水解潜力。

基于分子对接结果,使用三种蛋白酶对罗非鱼

来源的蛋白粉进行水解并测定平均分子量,探究不同蛋白酶间水解蛋白粉的效果优劣,并且测定三种蛋白酶的酶动力学常数。结果显示,经水解后,碱性蛋白酶、牛胰蛋白酶、中性蛋白酶的胶原三肽含量分别为 51.34%、39.79%、31.84%。在测定水解产物的 300 Da 组分的峰面积中,碱性蛋白酶 > 胰蛋白酶 > 中性蛋白酶,差异明显,表明碱性蛋白酶相对于其他两种蛋白酶水解出的胶原三肽占比最多。其酶解效果与分子对接预测一致。汪雪莲等^[30]研究发现,以罗非鱼鱼皮酶解产物为底物,经解淀粉芽孢杆菌蛋白酶二次酶解

后测定酶解液的肽分子量分布得出在水解产物中分子量<500 Da的肽段占比约54.28%，水解度为18.40%，而本研究中使用筛选后的碱性蛋白酶在探索出条件下得出在水解产物中分子量<500 Da的肽段占比约60.66%，水解度达到30.22%。此外，在三种蛋白酶中，碱性蛋白酶的米氏常数达到了 $4.26 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，低于中性蛋白酶($11.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)与胰蛋白酶($25.79 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。说明以罗非鱼蛋白粉为底物时，碱性蛋白酶的水解效果在其他两种蛋白酶中最好。

相较于分子对接，分子动力学模拟能提供更全面且动态的信息用于验证分子对接结果，能完善对接中无法捕捉的细节。因此，使用三种蛋白酶对GPH分别进行分子动力学模拟。发现碱性蛋白酶-GPH复合体系结合稳定，GPH与在碱性蛋白酶的活性口袋中的Gln185、Ile159、Ser151、Gly125等残基中形成氢键相互作用；和Ser160、Tyr161、Ser158、Gly155、Ala150等残基间存在疏水相互作用。表明碱性蛋白酶与GPH结合主要作用力为氢键与疏水相互作用。有研究表明^[31]，在酶的相互作用中，氢键的长短与数量影响了配体与酶的结合力。李娇等^[32]研究表明，六肽WHAFLW能与活性口袋里的氨基酸残基形成氢键，从而活性高于七肽WFHAVFW，认为维持ACE和抑制肽结合的主要作用力为氢键作用。本研究中碱性蛋白酶与GPH形成的氢键数量多于胰蛋白酶与中性蛋白酶，同时与口袋中的氨基酸残基存在一定的疏水相互作用，这可能是碱性蛋白酶的水解能力高于其他两种酶的原因。

3 结论

本实验以罗非鱼胶原蛋白粉为研究对象，利用计算机虚拟筛选技术结合分子动力学模拟及实验论证方法，对基于RCSB与MSRPS所自建的胶原蛋白酶数据库进行虚拟筛选，并通过单因素实验探索筛选出来的蛋白酶水解罗非鱼胶原蛋白粉的水解条件、水解度、平均分子量，测定其动力学常数并研究蛋白酶对胶原蛋白三肽(GPH)的相互作用，以筛选出最优蛋白酶。研究发现，碱性蛋白酶(PDB id: 1AH2)在温和水解条件下表现最优，其产物平均分子量为548.23 Da(接近GPH理论值)，300 Da特征峰处的三肽含量高于中性蛋白酶和胰蛋白酶，此外，碱性蛋白酶测出的米氏常数为 $4.26 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，低于中性蛋白酶($11.31 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)与胰蛋白酶($25.79 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)，展现出了优异的水解效果。分子动力学模拟显示，1AH2-GPH复合体系在50 ns模拟中保持最优结构稳定性：RMSD值稳定于 $0.175 \text{ \AA}$ ，RMSF波动幅度最小，回转半径最终收敛至

1.67 nm ，且平均形成4个氢键的强相互作用。碱性蛋白酶因兼具良好的结合稳定性($\Delta G < -7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)与适中的水解条件，在胶原三肽工业化生产中展现出重要应用潜力。

参考文献

- [1] HOLWERDA A M, VAN LOON L J C. The impact of collagen protein ingestion on musculoskeletal connective tissue remodeling: a narrative review [J]. *Nutrition Reviews*, 2022, 80(6): 1497-1514.
- [2] FELICIAN F F, XIA C, QI W, et al. Collagen from marine biological sources and medical applications [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2018, 15: e1700557.
- [3] TANG C, ZHOU K, ZHU Y, et al. Collagen and its derivatives: From structure and properties to their applications in food industry [J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 131: 107748.
- [4] IRASTORZA A, ZARANDONA I, ANDONEGI M, et al. The versatility of collagen and chitosan: From food to biomedical applications [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 116: 106633.
- [5] REZVANI G E, NOURBAKHSH N, AKBARI K M, et al. Collagen-based biomaterials for biomedical applications [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2021, 109(12): 1986-1999.
- [6] ZHANG J, ELANGO J, WANG S, et al. Characterization of immunogenicity associated with the biocompatibility of type I collagen from Tilapia fish skin [J]. *Polymers*, 2022, 14: 2300.
- [7] PRAJAPUTRA V, ISNAINI N, MARYAM S, et al. Exploring marine collagen: Sustainable sourcing, extraction methods, and cosmetic applications [J]. *South African Journal of Chemical Engineering*, 2024, 47(1): 197-211.
- [8] LEE Y I, LEE S G, JUNG I, et al. Effect of a topical collagen tripeptide on antiaging and inhibition of glycation of the skin: a pilot study [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23: 1101.
- [9] PORTA F, FILIPPUCCHI E, CIPOLLETTA E, et al. Efficacy of a single ultrasound-guided injection of high molecular weight hyaluronic acid combined with collagen tripeptide in patients with knee osteoarthritis and chondrocalcinosis [J]. *Frontiers in Medicine*, 2024, 11: 1437160.
- [10] CHAE M, BAE I H, LIM S, ET AL. AP collagen peptides prevent cortisol-induced decrease of collagen type I in human dermal fibroblasts [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4788.
- [11] WU S, ZHOU X, XU K, et al. The role of extraction method to collagen substrates in enzymolysis of type I collagenase [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 283: 138086.
- [12] CHEN Y, GUO Y, LIU Y, et al. Identification of Di/Tripeptide(s) with osteoblasts proliferation stimulation abilities of yak bone collagen by in silico screening and molecular docking [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 874259.
- [13] KUO C J, CHAO T L, KAO H C, et al. Kinetic characterization and inhibitor screening for the proteases leading to identification of drugs

- against SARS-CoV-2 [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2021, 65(4): 10.
- [14] XIE L, ZHANG T, Karrar E, et al. Insights into an α -glucosidase inhibitory profile of 4,4-dimethylsterols by multispectral techniques and molecular docking [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69: 15252-15260.
- [15] PAGGI J M, PANDIT A, DROR R O. The art and science of molecular docking [J]. Annual Review of Biochemistry, 2024, 93(1): 389-410.
- [16] FILIPE H A L, LOURA L M S. Molecular dynamics simulations: advances and applications [J]. Molecules, 2022, 27(7): 2105.
- [17] AHMAD S, BANO N, RAZA K. RCSB protein data bank: revolutionising drug discovery and design for over five decades [J]. Medical Data Mining, 2025, 8: 7-11.
- [18] RAWLINGS N D, BARRETT A J, BATEMAN A. MEROPS: the peptidase database [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38: D227-D233.
- [19] S KIM, CHEN J, CHENG T, et al. PubChem 2023 update [J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51: D1373-D1380.
- [20] POLÁK L, ŠKODA P, RIEDLOVÁ K, et al. PrankWeb 4: a modular web server for protein-ligand binding site prediction and downstream analysis [J]. Nucleic Acids Research, 2025, 53: W466-W471.
- [21] DING J, TANG S, MEI Z, et al. Vina-GPU 2.0: further accelerating AutoDock Vina and its derivatives with graphics processing units [J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2023, 63(7): 1982-1998.
- [22] LASKOWSKI R A, SWINDELLS M B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery [J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2011, 51(10): 2778-2786.
- [23] 林虬,黄薇,宋永康,等.棉籽蛋白水解物水解度3种测定方法的比较[J].福建农业学报,2011,26(16):1076-1080.
- [24] VIEIRA I H P, BOTELHO E B, DE SOUZA GOMES T J, et al. Visual dynamics: a WEB application for molecular dynamics simulation using GROMACS [J]. BMC Bioinformatics, 2023, 24(1): 107.
- [25] GAO Y, ZHANG C, ZHANG J Z H, et al. Evaluation of the coupled two-dimensional main chain torsional potential in modeling intrinsically disordered proteins [J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2017, 57(2): 267-274.
- [26] PRICE D J, BROOKS C L. A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation [J]. The Journal of Chemical Physics, 2004, 121(20): 10096-10103.
- [27] RAHMAN A, MUKTADIR M G. SPSS: an imperative quantitative data analysis tool for social science research [J]. International Journal of Research and Innovation in Social Science, 2021, 5(10): 300-302.
- [28] GONZÁLEZ-CAVIERES L, PÉREZ-WON M, TABILO-MUNIZAGA G, et al. Advances in vacuum microwave drying (VMD) systems for food products [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 116: 626-638.
- [29] DELANO W L. PyMOL: an open-source molecular graphics tool [J]. CCP4 Newsletter on Protein Crystallography, 2002, 40(1): 82-92.
- [30] 汪雪莲,刘鹏展,崔春,等.胶原三肽的酶法制备工艺研究[J].中国调味品,2023,48(1):97-101
- [31] WU Q Y, JIA J Q, YAN H, et al. A novel angiotensin-I converting enzyme(ACE) inhibitory peptide from gastrointestinal protease hydrolysate of silkworm pupa (*Bombyxmori*) protein: Biochemical characterization and molecular docking study [J]. Peptides, 2015, 68: 17-24.
- [32] 李娇,苏继磊,陈敏,等.马氏珍珠贝肉蛋白水解特征及其ACE抑制肽的筛选[J].食品科学,2022,43(4):119-126.