

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2023060103

CSTR:32061.14.hjhx.2023060103

王方略, 张力雯, 张东晨, 等. 枯草芽孢杆菌漆酶与阴离子型聚丙烯酰胺微观作用机理[J]. 环境化学, 2024, 43(11): 3873-3885.

WANG Fanglue, ZHANG Liwen, ZHANG Dongchen, et al. Microscopic action mechanism of laccase from *Bacillus subtilis* with anionic polyacrylamide[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43 (11): 3873-3885.

枯草芽孢杆菌漆酶与阴离子型聚丙烯酰胺微观作用机理*

王方略^{1**} 张力雯² 张东晨³ 吴学风⁴ 邓胜松⁴

(1. 淮南师范学院生物工程学院, 淮南, 232038; 2. 淮南师范学院机械与电气工程学院, 淮南, 232038; 3. 安徽理工大学材料科学与工程学院, 淮南, 232001; 4. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥, 230009)

摘要 阴离子型聚丙烯酰胺(HPAM)常用于煤泥水的澄清处理, 产生大量的含聚污水将对选煤厂周边环境造成不利影响. 为探究漆酶降解 HPAM 的微观作用机理, 采用对接模拟了 HPAM 及其脱氨产物聚丙烯酸(PAA)结构模型与枯草芽孢杆菌漆酶(Lac)的结合, 根据-CDOCKER_Energyscore 打分最高原则筛选出 Lac 的最适底物, 然后对该最适复合物分别进行基于亲和力虚拟突变和不同温度下的分子动力学(MD)模拟. 结合模式分析表明, Lac 对 HPAM-3 享有最高亲和力, 且其结合最好, 因此 HPAM-3 是该酶的最适底物; HPAM 比 PAA 易被 Lac 降解; Lac 可容纳一定碳链长度的 HPAM 和 PAA. 相互作用分析表明, Lac-HPAM-3 亲和力最大主要原因是盐桥; TYR133 通过形成氢键以稳定 Lac-HPAM-2、Lac-HPAM-3 和 Lac-HPAM-4, 而 ARG487 通过形成疏水以稳定所有的酶-底物复合物. 基于亲和力虚拟突变分析表明, TYR118、TYR133、ARG487 和 LYS135 是 Lac 降解 HPAM-3 的关键残基; LYS135 和 ARG487 分别通过形成盐桥和疏水来最大限度地影响酶同底物的亲和力. MD 分析表明, Lac-HPAM-3 在 298 K 时总相互作用能、酶骨架 RMSD 及所有残基 RMSF 皆最低, 因此该复合物在 298 K 时结合稳定性最佳; 308 K 时由于酶骨架 RMSD 最大, 导致底物偏离最初对接位置, 因此 Lac-HPAM-3 在 308 K 时结合稳定性最差. 这些数据为揭示 HPAM 酶降解过程奠定基础, 为将来突变试验来改造酶提供位点支持.

关键词 枯草芽孢杆菌漆酶(Lac), 阴离子型聚丙烯酰胺(HPAM), 对接, 基于亲和力虚拟突变, 分子动力学(MD).

中图分类号 X-1; O6 文献标识码 A

Microscopic action mechanism of laccase from *Bacillus subtilis* with anionic polyacrylamide

WANG Fanglue^{1**} ZHANG Liwen² ZHANG Dongchen³
WU Xuefeng⁴ DENG Shengsong⁴

(1. School of Bioengineering Huainan Normal University, Huainan, 232038, China; 2. School of Mechanical and Electrical Engineering Huainan Normal University, Huainan, 232038, China; 3. School of Material Science and Engineering Anhui University of Science and Technology, Huainan, 232001, China; 4. School of Food and Bioengineering Hefei University of Technology, Hefei, 230009, China)

Abstract Anionic polyacrylamide (HPAM) is often used to clarifying the coal slime water. A large amount of polymer-containing wastewater produced will have adverse effects on the surrounding environment of coal preparation plant. In order to explore the microscopic action mechanism of

2023年6月1日收稿(Received: June 1, 2023).

* 国家自然科学基金(51274012)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (51274012).

** 通信联系人 Corresponding author, E-mail: wangfanglue66@163.com

HPAM by laccase, docking was used to simulate the binding of HPAM and its deamination product polyacrylic acid (PAA) with *Bacillus subtilis* laccase (Lac). The optimal substrate of Lac was screened according to the highest principle of -CDOCKER_ Energy score. Then, molecular dynamics (MD) simulation at different temperatures and virtual mutation based on affinity were carried out by this optimal complex, respectively. The binding model analysis showed that Lac acquired the highest affinity for HPAM-3, and their binding was the optimal. Hence, HPAM-3 was the most suitable substrate for this enzyme; HPAM was more easily degraded by Lac than PAA; Lac could accommodate HPAM and PAA with a certain carbon chain length. The interaction analysis showed that Lac-HPAM-3 had the highest affinity mainly due to the salt bridge; TYR133 stabilized Lac-HPAM-2, Lac-HPAM-3, and Lac-HPAM-4 by forming hydrogen bonds, while ARG487 stabilized all enzyme-substrate complexes by forming hydrophobicity. The virtual mutation based on affinity analysis showed that TYR118, TYR133, ARG487 and LYS135 in Lac were key residues for degrading HPAM-3; LYS135 and ARG487 affected the affinity of enzyme with substrate to the utmost extent by forming salt bridge and hydrophobicity, respectively. MD analysis showed that the total interaction energy, RMSD of enzyme skeleton and RMSF of all residues were all the lowest for Lac-HPAM-3 at 298 K, so this complex had the optimal binding stability at 298 K; RMSD of the enzyme skeleton was the maximum at 308 K causing the substrate deviated from the initial docking position. Hence, Lac-HPAM-3 had the worst binding stability at 308 K. These data laid the foundation for revealing the enzymatic degradation process of HPAM, and provided site support for mutagenesis tests to modify the enzyme in the future.

Keywords laccase from *Bacillus subtilis* (Lac), anionic polyacrylamide (HPAM), docking, virtual mutation based on affinity, molecular dynamics (MD).

煤炭一直以来是我国主要的能源物质^[1],而洗选是实现煤炭清洁化利用的源头技术^[2].目前选煤厂仍以湿法选煤为主,伴随产生大量的煤泥水亟需澄清处理以实现水的循环^[3].阴离子型聚丙烯酰胺(HPAM)是由单体丙烯酰胺(AM)和丙烯酸(AA)在碱性条件下共聚而成的一种线性水溶性聚合物,分子量在300万—2000万区间^[4-5].HPAM作为选煤絮凝剂,其常用于煤泥水的絮凝沉降^[6-7].随着HPAM的广泛使用,伴随产生大量的含聚污水,增加了处理难度及成本^[8].煤泥水中的悬浮颗粒通过吸附到HPAM而实现桥连,形成较大絮团以促进分离^[9].HPAM本身被认为是无毒的^[10],但已证明其暴露在紫外线或光、热时会缓慢发生降解,释放出少量有毒的AM,该物质将会损伤人和动物的神经系统^[11].此外,HPAM高分子量的碳链具有生物抗性,较难生物降解,导致其在选煤厂周边环境大量累积,这将对生态环境构成潜在威胁^[12].所以,有必要将HPAM降解转化成无毒性的小分子物质.

HPAM降解处理方法包括物理降解^[13]、化学降解^[14]、生物降解^[15]及它们的结合等,而低成本、无二次污染、环境友好的生物降解转化常用于处理HPAM^[16].HPAM降解微生物通常从长期使用HPAM的环境中分离出来的,如HPAM处理的油田采出水、油砂尾矿、土壤、活性污泥等^[17].生物降解本质是酶催化反应,同时在降解HPAM发酵液中检测到关键酶活性,如酰胺酶、脱氢酶、漆酶等. HPAM的生物降解开始于酰胺酶催化HPAM脱氨成氨和聚丙烯酸(PAA),同时氨可释放出来供微生物生长所需的氮源. HPAM的碳骨架PAA比其酰胺部分更难被生物降解^[18],然而仍存在一些微生物是在HPAM和PAA的环境下生长^[19].HPAM经酰胺酶脱氨基反应后,残留的碳骨架PAA在加氧酶或氧化酶的作用下其碳主链被氧化断裂,类似于脂肪酸的 α -C氧化^[20]. Song等^[21]通过实验发现由细菌分泌漆酶的活性不受HPAM浓度影响,这可能是由于该酶不仅能提高污染物的氧化速率,还能扩大氧化底物范围.在好氧环境下漆酶可以从HPAM分子上夺得4个 e^- ,将 O_2 还原成 H_2O .国内外学者筛选高效菌株并优化工艺尝试对废水中HPAM的降解处理已取得很大的进步,然而菌株的筛选及工艺优化任务繁重且缺乏科学依据,迄今为止关于生物酶学分析很大程度上是未知的,仅提出了一些假设的降解途径,确切的降解机理还不清楚.同时,由于酶解是在水溶液中进行,生物酶与HPAM的微观作用

分子机制仍鲜为人知,水环境对 HPAM 与酶相互作用的影响鲜有报道.近年来,研究人员主要通过试验研究微生物降解 HPAM 的规律,例如淀粉-碘化镉、GPC/SEC、FT-IR、HPLC、扫描电镜(SEM)、黏度等方法,然而这些常规实验解释酶降解机理仍很困难.漆酶的三维晶体结构已经通过实验解析出来,这为进一步在分子水平上探究其与底物相互作用提供了可能性^[22].分子模拟可以在分子或原子尺度上探究酶与底物的相互作用,可以深入了解酶降解的分子机制,这将有助于解决 HPAM 降解效果差的问题^[23-24].

本文采用半柔性对接探究枯草芽孢杆菌漆酶(Lac)与 HPAM 或 PAA 的结合,从最佳对接构象中筛选到最适酶与底物复合物,然后对该最适复合物分别进行基于亲和力的虚拟突变以及不同温度下的分子动力学(MD)模拟.该研究的数据有助于深入理解酶降解机理,以期对 HPAM 及其中间产物 PAA 进行彻底降解.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 漆酶三维结构的获取

漆酶的三维晶体结构下载于蛋白质数据库(RCSB),相应 PDB 编号为 1GSK,分辨率为 0.170 nm, A 链,该酶来源于枯草芽孢杆菌,简称 Lac^[25].采用 Discovery Studio (DS) 2020 的 Prepare Protein 工具对其进行去水加氢,修补缺失残基,如图 1 所示.从图 1 可以看出,Lac 三维晶体结构中含有 4 个原始配体丙三醇,透明红色球体显示丙三醇的位置离 Lac 的 3 个铜离子最近,而且已经证明漆酶的催化活性是与铜离子有关.因此将透明红色球体的位置作为该酶对接的结合位点,其坐标为(X , 97.3796; Y , 61.3005; Z , -8.42748; Radius, 5).此外,对接前应删除所有原始配体.

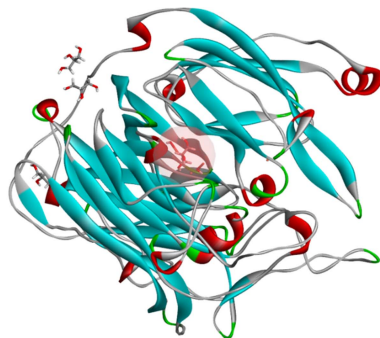


图 1 预处理的枯草芽孢杆菌漆酶三维晶体结构

Fig.1 Prepared 3D crystal structure of laccase from *Bacillus subtilis*

1.2 底物结构的获取

HPAM 在弱碱性环境下其羧基侧链带负电.PAA 实际上是 HPAM 的脱氨产物. HPAM 和 PAA 皆是由重复的结构单元构成的线性聚合物,而且生物酶降解主要涉及官能团之间发生的反应,所以仅考虑酶与底物分子主链或侧链上的高反应活性官能团之间的相互作用即可.

本文选取具有代表性的结构单元为 2—5 的 HPAM 和 PAA 作为结构模型,它们的结构模型采用 Materials Studio(MS) 2017 软件的 Build polymer 工具绘制,两端采用甲基进行封端,同样的处理见文献^[26].采用 DS 2020 的 Prepare Ligands 工具对所有配体进行预处理,以期获得正确的离子化状态下的三维结构,然后采用 DS 2020 的 Minimize Ligands 对它们在 CHARMm 力场下进行构型优化.图 2 显示了几种不同分子链长度的 HPAM 和 PAA 模型物化学结构及其优化构型.

1.3 分子对接

采用 DS 2020 的 CDOCKER 程序进行 Lac 与 HPAM 或 PAA 的分子对接模拟实验^[27].该对接程序主要采用负总能量打分(-CDOCKER_Energy score)和负相互作用能打分(-CDOCKER_Interaction_Energy score)两种能量打分评估对接结果.其中,负总能量打分值越大,说明酶同底物亲和力越大、越稳定^[28].结果默认保留底物最优的前 10 种构象,选择-CDOCKER_Energy score 值最大的底物构象进行进一步分析.

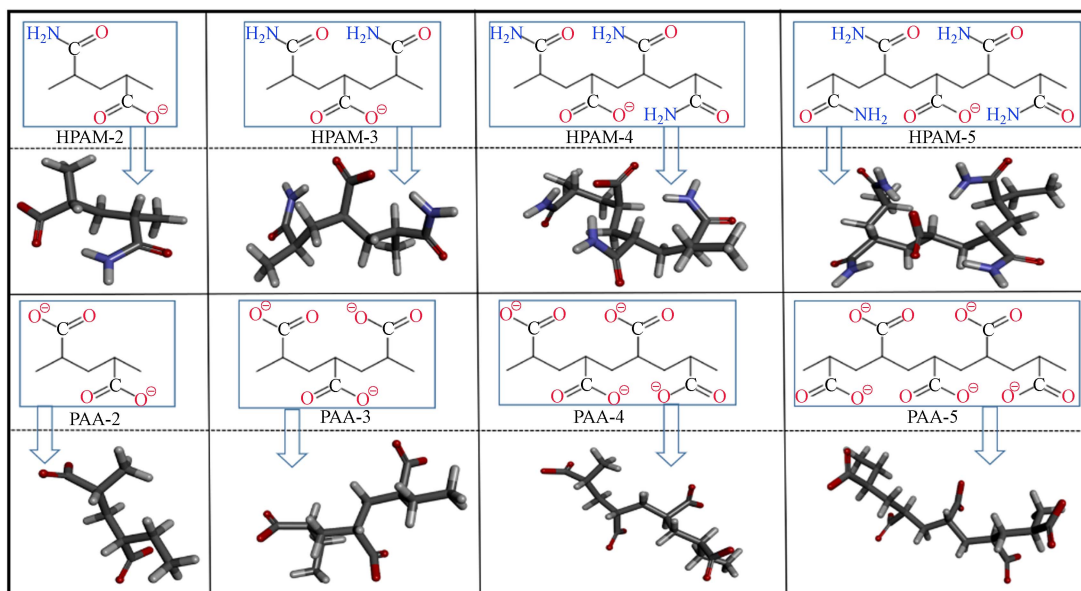


图2 HPAM和PAA的几种模型物化学结构及其优化构型
元素: 碳(灰色); 氢(白色); 氧(红色); 氮(蓝色)

Fig.2 Chemical structure of HPAM and PAA several models and their optimized configuration
Elements: gray: carbon; white: hydrogen; red: oxygen; blue: nitrogen

1.4 基于亲和力的虚拟突变

底物与活性位点处残基的非键作用力距离一般取 0.5 nm. 突变能是复合物突变前后总能量变化. 由对接筛选得到拥有 -CDOCKER_Energy score 值最大的复合物, 该复合物亲和力最大、最稳定. 根据酶促动力学理论推测出, 此时底物是酶的最适底物. 为了进一步确定最适酶-底物复合物中的关键残基, 采用 DS 2020 的 Calculate Mutation Energy (Binding) 程序对配体周围 0.5 nm 范围内残基进行丙氨酸(ALA)扫描, 选择突变能大于 $0.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的残基作为该酶结合底物的关键残基, 然后对这些关键残基进行虚拟饱和突变, 最终选择突变能小于 $-0.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的残基作为理论设计高活性酶的突变位点.

1.5 MD 模拟计算细节

MD 可以用于探究温度对酶与底物随时间的动态变化影响, 同时能够找出酶的最大波动残基区域. 酶与底物亲和力越大, K_m 值就越小, 此时底物是酶的最适底物. 采用 GROMACS 软件包 (版本 2021.5) 对最适酶与底物复合物进行 298 K、303 K 及 308 K 下的 MD 模拟^[29], 力场选为 Amber03 force field^[30]. 为使模拟过程更接近真实情况, 体系被溶剂化放置在 $10 \text{ nm}\times 10 \text{ nm}\times 10 \text{ nm}$ 简单点电荷 (SPC) 水模型^[31] 周期性边界条件的立方盒子里, 添加抗衡离子 Na^+ 和 Cl^- 以中和体系. 然后, 采用最速下降法进行能量最小化, 并且在 1 个原子的恒压下进行了 1 ns NPT MD 使体系达到平衡. 最后, 模拟体系进行了 NPT MD 50 ns 采样并且进行轨迹的数据分析. 采用 gromacs tool gmxdmsd 及 gmxdmsf 分别来计算酶骨架原子的 RMSD 和酶残基 RMSF, 同时采用 DS 2020 的 Calculate Interaction Energy 程序计算酶与底物相互作用能及残基对相互作用能的贡献. 用 Visual Molecular Dynamics (VMD) 软件对复合物的构象变化进行可视化分析及比较. MD 模拟过程中范德华截断半径为 1.4 nm, 长程静电相互作用采用 Particle Mesh Eward (PME) 进行处理^[32], 步长设置为 2.0 fs. 温度和压力分别采用 Berendsen thermostat 和 Berendsen barostat 来维持, 以上模拟均在 Max-Flow 平台下进行.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 结合模式分析

本研究中采用重复单元为 2—5 的 HPAM 和 PAA 的优化结构模型用于研究 Lac 与底物的相互作用. Lac 与底物结合时亲和力越大、越稳定, 越说明该酶降解底物的活性就越强. 从表 1 对接结果中的

打分值可以看出,无论是基于 -CDOCKER_Energy score 还是-CDOCKER_Interaction_Energy score 指标来看, Lac-HPAM-3 都拥有最高的打分,说明 Lac 对 HPAM-3 有最高的亲和力^[33],此时 HPAM-3 是 Lac 的最适底物,而且它们相互作用最小,结合的最好. Lac 对 HPAM 的能量打分皆随其碳链延长而先增加后减少,尤其该酶对 HPAM-5 的打分迅速降至最低.这说明 Lac 对 HPAM 碳链长度有一定耐受性,倾向氧化降解 HPAM 的碳链,但 HPAM-5 很难被该酶降解,这也符合聚合物难于被酶解的规律.

表 1 通过 CDOCKER 工具获得的 Lac 与底物对接结果

Table 1 1Docking results of Lac with substrate obtained from CDOCKER protocol

| 酶-底物复合物 Enzyme-substrate complex | 负总能打分/(kcal·mol ⁻¹) -CDOCKER Energy score | 负相互作用能打分/(kcal·mol ⁻¹) -CDOCKER Interaction Energy score |
|-------------------------------------|--|---|
| Lac-HPAM-2 | 24.2360 | 24.9384 |
| Lac-HPAM-3 | 31.8442 | 35.4626 |
| Lac-HPAM-4 | 28.8940 | 33.1487 |
| Lac-HPAM-5 | -109.688 | 7.02389 |
| Lac-PAA-2 | 24.8628 | 30.3709 |
| Lac-PAA-3 | 18.8658 | 33.4581 |
| Lac-PAA-4 | 17.5539 | 34.5526 |
| Lac-PAA-5 | -152.526 | -25.3122 |

当 -CDOCKER_Energy score 和 -CDOCKER_Interaction_Energy score 呈现出不同的变化时, -CDOCKER_Energy score 打分更值得信赖.从表 1 中 Lac 与 PAA 结合时的 -CDOCKER_Energy score 值来看,可以发现 Lac-PAA-2 享有最高 -CDOCKER_Energy score 值(24.8628 kcal·mol⁻¹),但皆低于 Lac-HPAM-3 的打分(31.8442 kcal·mol⁻¹)和 Lac-HPAM-4 的打分(28.8940 kcal·mol⁻¹),说明 PAA 比 HPAM 更难被 Lac 降解.实验表明,基于淀粉-碘化镉和 TOC 的结果的显著差异,细菌更倾向将 HPAM 的酰胺基水解成羧基作为氮源,但难以利用 HPAM 的碳链骨架作为碳源^[18].即细菌很难利用其脱氨产物 PAA 作为营养物质.无论基于 -CDOCKER_Energy score 还是 -CDOCKER_Interaction_Energy score 指标来看, Lac-PAA-5 皆为负值,说明高分子量的 PAA 难于被 Lac 降解,同样也符合聚合物难于酶解的规律.

图 3 显示了 HPAM 与 Lac 最佳的结合构象, Lac 活性位点处的残基由线性模型显示.从图 3 可以发现, HPAM-2、HPAM-3 和 HPAM-4 的分子链舒展于活性位点附近,这种现象解释了 Lac-HPAM-2、Lac-HPAM-3 和 Lac-HPAM-4 能量打分皆为正,而且 -CDOCKER_Energy score 打分值在 24.00—32.00 kcal·mol⁻¹ 范围内.这说明 Lac 可容纳较长 HPAM 碳链,倾向于降解一定长度寡聚物.同时也观察到,只有 HPAM-5 偏离原来的对接位置,其它配体的对接位置均一致,这能很好地解释 Lac-HPAM-5 享有负的 -CDOCKER_Energy score 值(-109.688 kcal·mol⁻¹)的原因,进一步说明高分子量的 HPAM 很难被 Lac 降解.

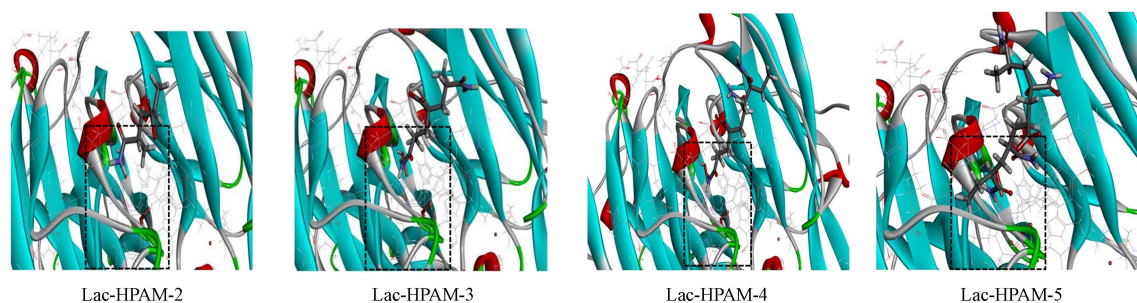


图 3 Lac 与 HPAM 的结合模式

Fig.3 Binding mode of the HPAM in Lac

The residues at the active site of Lac are showed as the line pattern, and HPAM are showed as stick model

图 4 显示了 PAA 与 Lac 最佳的结合构象,其中线性模型显示 Lac 活性位点处的残基.从图 4 可见, PAA-2、PAA-3 和 PAA-4 的分子链舒展于活性位点附近,这种现象解释了 Lac-PAA-2、Lac-PAA-3

和 Lac-PAA-4 能量打分皆为正,而且-CDOCKER_Energy score 打分值在 17.00—25.00 kcal·mol⁻¹ 范围,明显低于相应的 Lac 与 HPAM 结合.这说明 Lac 可以容纳较长 PAA 碳链,但该酶更倾向于降解一定长度的 HPAM.同时也观察到,只有 PAA-5 偏离原来的对接位置,而其它配体对接位置一致,这能很好地解释为什么 Lac-PAA-5 享有负的 -CDOCKER_Energy score(-152.526 kcal·mol⁻¹) 和 -CDOCKER_Interaction_Energy score(-25.3122 kcal·mol⁻¹),这说明高分子量 PAA 很难被 Lac 降解.

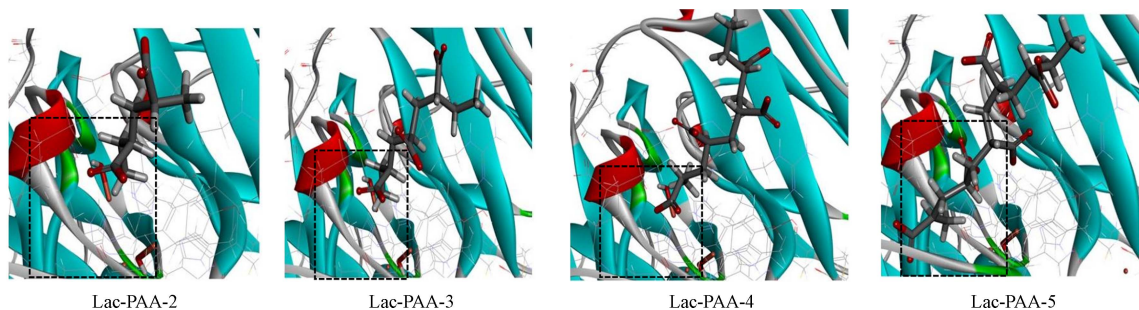


图 4 Lac 与 PAA 的结合模式

Fig.4 Binding mode of the PAA in Lac

The residues at the active site of Lac are showed as the line pattern, and PAA are showed as stick model

2.2 相互作用分析

(1) Lac 与 HPAM 的结合

通过 DS 2020 将能量打分皆为正的 Lac 与 HPAM 复合物进行可视化,显示其相互作用(图 5).从图 5 可以观察到,HPAM-2 与 LYS135 形成 2 个氢键,其与 TYR133 形成 1 个氢键,一共形成 3 个氢键. HPAM-2 分子链两端与 ARG487 形成 2 个疏水键,其分子链一端分别与 TYR118 和 TYR133 各自形成 1 个疏水键,一共形成 4 个疏水键. HPAM-2-O⁻与 LYS135-N⁺形成 1 个静电吸引; HPAM-3 分别与 TYR133 和 ASP507 各自形成 1 个氢键,一共形成 2 个氢键. HPAM-3 高分子链两端与 ARG487 形成 2 个疏水键. HPAM-3-O⁻与 LYS135-NH⁺形成 1 个静电吸引,同时形成盐桥; HPAM-4 分别与 TYR133 和 LYS135 各自形成 1 个氢键,一共形成 2 个氢键. HPAM-4 高分子链一端与 ARG487 形成 1 个疏水键. HPAM-4-O⁻与 LYS135-N⁺形成 1 个静电吸引.

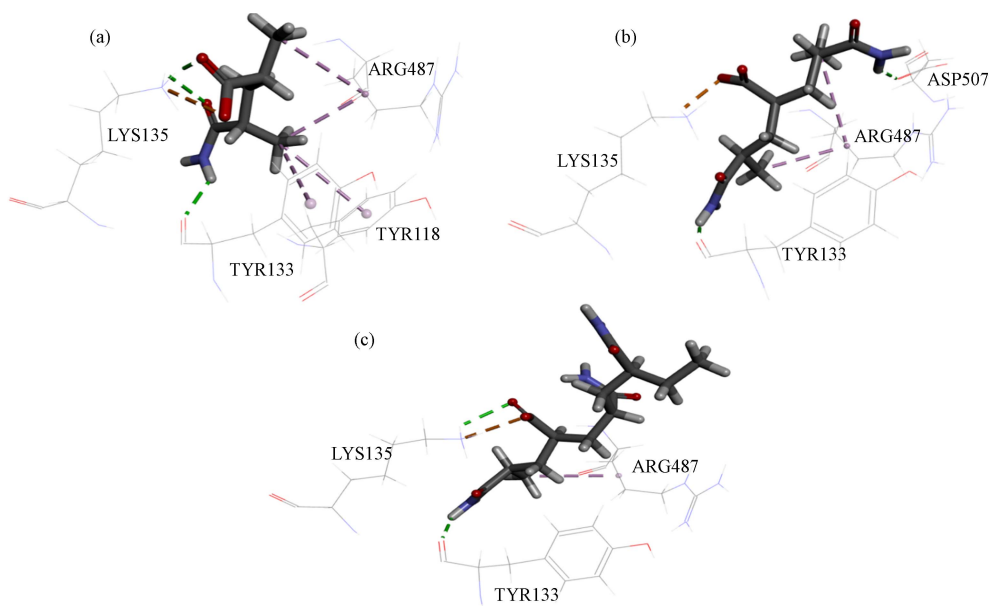


图 5 Lac 与 HPAM 三维相互作用(a) Lac-HPAM-2; (b) Lac-HPAM-3; (c) Lac-HPAM-4
绿色-氢键; 橙色-静电吸引; 粉色-疏水作用

Fig.5 The 3D interactions of Lac with HPAM (a) Lac-HPAM-2; (b) Lac-HPAM-3; Lac-HPAM-4
Green: H-bond; orange: attractive charge; pink: hydrophobic action

通过对比发现, Lac-HPAM-3 亲和力最大、最稳定的主要原因是 HPAM-3 与 Lac 之间形成强盐桥造成的, 此时 HPAM-3 是 Lac 降解 HPAM 的最适底物. Lac 与 HPAM 结合亲和力强度与其形成的氢键、疏水键和静电作用等数量及距离有关. 由于 HPAM-2 与 Lac 周围残基形成的疏水键较密集, 而且疏水键数量最多, 这将有利于 Lac 结合 HPAM-2. 但 HPAM-2 与 LYS135 同时形成 2 个氢键, 这将很大程度上不利于 LYS135-NH⁺ 与 HPAM-2-O⁻ 形成盐桥, 只存在静电吸引. HPAM-4 较长的分子链一端与 ARG487 形成一个较强的疏水作用, 可以保证 HPAM-4 以一定的自由度结合在 Lac 的活性位点上; HPAM-3 和 HPAM-4 与 Lac 周围的氨基酸残基形成 2 个氢键比较分散, 这样有利于 Lac 结合 HPAM. HPAM-4 与 LYS135 形成 1 个氢键, 它不利于 LYS135-NH⁺ 与 HPAM-4-O⁻ 形成盐桥, 但其减弱程度低于 HPAM-2, 这可以很好地解释为什么 Lac-HPAM-2 结合亲和力最差、最不稳定. 通过上述分析, 可以推测出亲和力大小的顺序为 Lac-HPAM-3>Lac-HPAM-4>Lac-HPAM-2, 这与 CDOCKER 对接程序获得的能量打分分析结果相一致.

(2) Lac 与 PAA 的结合

通过 DS 2020 将能量打分皆为正的 Lac 与 PAA 复合物显示其相互作用细节(图 6). 从图 6 可以观察到, PAA-2 分子链两端与 ARG487 形成 2 个疏水键, 其分子链一端分别与 TYR118 和 TYR133 各自形成 1 个疏水键, 一共形成 4 个疏水键. PAA-2-O⁻ 与 LYS135-N⁺ 形成 2 个静电吸引; PAA-3 高分子链一端分别与 ARG487 和 TYR118 形成 1 个疏水键, 一共形成 2 个疏水键. PAA-3-O⁻ 也与 LYS135-N⁺ 形成 2 个静电吸引, 同时 LYS135 与 PAA-3 形成 1 个氢键; PAA-4 高分子链一端与 ARG487 形成 1 个疏水键. PAA-4-O⁻ 与 LYS135-N⁺ 形成 2 个静电吸引, 而 LYS135 与 PAA-4 形成 1 个氢键. PAA-4 与 GLY486 形成 1 个氢键, 一共形成 2 个氢键.

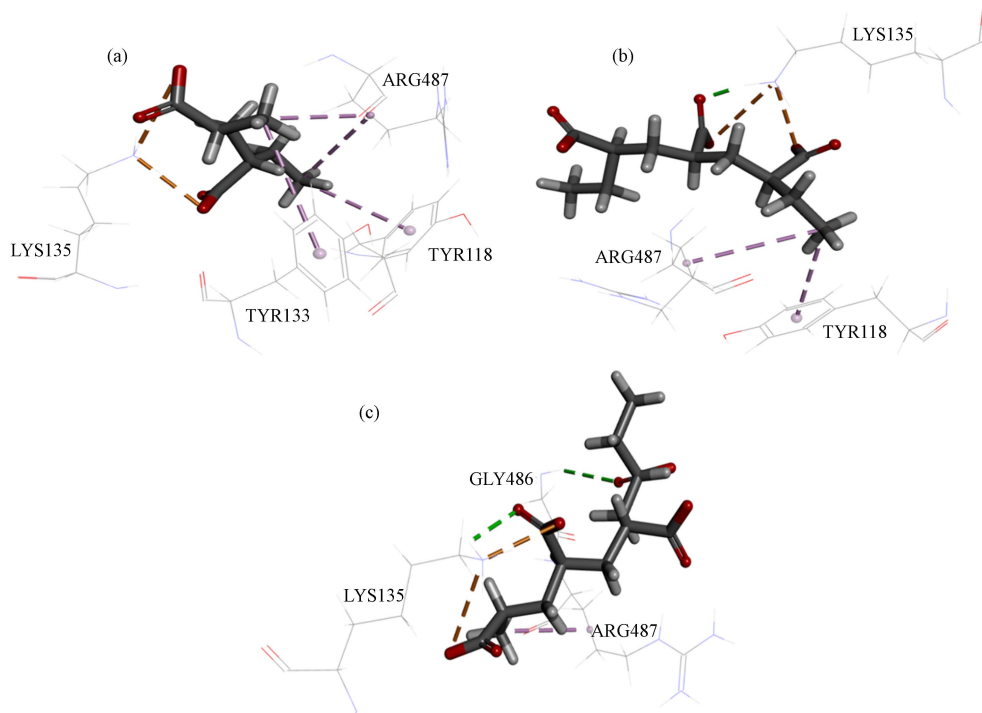


图 6 Lac 与 PAA 三维相互作用(a) Lac-PAA-2; (b) Lac-PAA-3; (c) Lac-PAA-4
绿色-氢键; 橙色-静电吸引; 粉色-疏水作用

Fig.6 The 3D interactions of Lac with PAA (a) Lac-PAA-2; (b) Lac-PAA-3; Lac-PAA-4
Green: H-bond; orange: attractive charge; pink: hydrophobic action

通过对比发现, PAA-2 与 Lac 周围氨基酸残基形成的疏水作用数最多, 而且密集, 说明疏水作用是 Lac-PAA-2 最稳定、亲和力最大的主要原因, 此时底物 PAA-2 是 Lac 降解 PAA 的最适底物. 另外, PAA-2-O⁻ 与 LYS135-N⁺ 的两个静电吸引也可以较好地将其稳定在 Lac 的活性中心上. PAA-3 和 PAA-4 都与 LYS135 形成 1 个氢键, 这将会大大增加了它们与 Lac 的结合. 虽然 Lac-PAA-3 比 Lac-PAA-4 多

了 1 个疏水作用,但 Lac-PAA-4 比 Lac-PAA-3 多了 1 个氢键作用. 所以, Lac-PAA-3 和 Lac-PAA-4 的能量评分相差不多,进一步说明 Lac 可容纳一定链长度的 PAA.

将上述分析的非键相互作用结果列于表 2. 从表 2 可以观察到, TYR133 参与 Lac 与 HPAM 中氢键的形成,而 ARG487 通过形成疏水、LYS135 通过形成静电吸引或盐桥以及氢键参与所有复合物的稳定.

表 2 Lac 与底物的相互作用残基

Table 2 Interaction residues of Lac with substrate

| 酶-底物复合物 ^a Enzyme-substrate complex ^a | 氢键(数量): 总数 H-bond (number): total | 疏水(数量): 总数 Hydrophobic (number): total | 静电吸引(数量): 总数 Electrostatic attract (number): total | 盐桥(数量): 总数 Salt bridge (number): total |
|---|---|--|--|--|
| Lac-HPAM-2 | TYR133(1), LYS135(2): 3 | ARG487(2), TYR118(1), TYR133(1): 4 | LYS135(1): 1 | |
| Lac-HPAM-3 | TYR133(1), ASP507(1): 2 | ARG487(2): 2 | | LYS135(1): 1 |
| Lac-HPAM-4 | TYR133(1), LYS135(1): 2 | ARG487(1): 1 | LYS135(1): 1 | |
| Lac-PAA-2 | | ARG487(2), TYR118(1), TYR133(1): 4 | LYS135(2): 2 | |
| Lac-PAA-3 | LYS135(1): 1 | ARG487(1), TYR118(1): 2 | LYS135(2): 2 | |
| Lac-PAA-4 | LYS135(1), GLY486(1): 2 | ARG487(1): 1 | LYS135(2): 2 | |

注: 指能量得分皆为正的最佳对接复合物.

Refers to the best docking complex with positive energy score.

2.3 ALA 扫描

通过上述的分析得到 Lac-HPAM-3 的亲合力最大、最稳定,即 HPAM-3 是 Lac 的最适底物,所以采用 DS 2020 的 Calculate Mutation Energy (Binding) 模块对该复合物配体 HPAM-3 周围 0.5 nm 内的残基进行 ALA 扫描. 突变能作为唯一标准来评估单点突变对 Lac 同 HPAM-3 亲和力的影响. 图 7 显示了该复合物 ALA 扫描的所有突变能,而表 3 仅列出了其 5 个最高突变能和 5 个最低突变能. 从 Lac-HPAM-3 的 ALA 扫描结果可以发现, TYR118ALA、TYR133ALA、ARG487ALA 和 LYS135ALA 等突变体的突变能都大于 0.5 kcal·mol⁻¹, 效果为不稳定,说明这些突变可能会导致 Lac 与 HPAM-3 亲和力下降,由此可以判断出 TYR118、TYR133、ARG487 和 LYS135 等 4 种残基是 Lac 与 HPAM-3 结合的关键氨基酸残基. 其中,突变体 LYS135ALA 的突变能(1.62 kcal·mol⁻¹)最大,说明 LYS135 对 Lac 与 HPAM-3 亲和力影响最大,即 LYS135 与 HPAM-3 形成的盐桥对 Lac-HPAM-3 亲和力影响最大,进一步说明盐桥作用是 Lac-HPAM-3 亲和力最大的主要原因. 而突变体 ARG487ALA 的突变能(1.35 kcal·mol⁻¹)仅次于突变体 LYS135ALA,说明 ARG487 参与的疏水作用对 Lac 与 HPAM-3 亲和力影响也较大. 图 8 显示了 Lac 结合 HPAM-3 时该酶关键残基的位置.

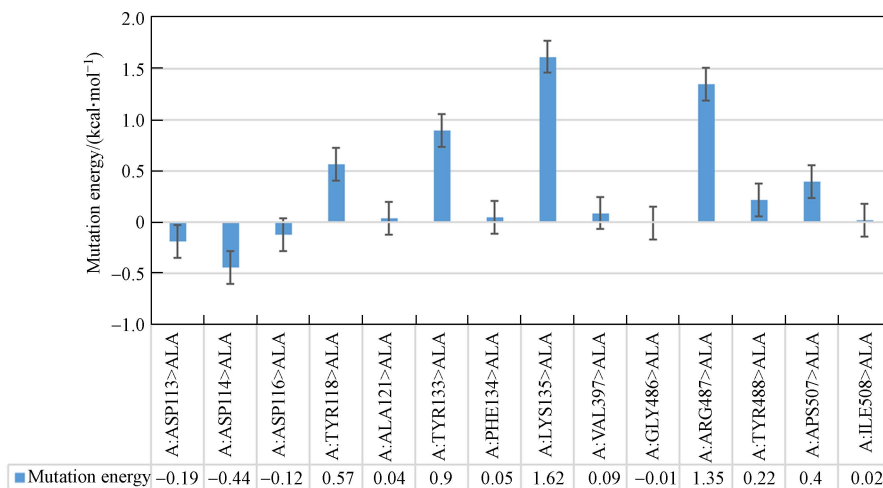


图 7 Lac-HPAM-3 的 ALA 扫描所有突变能

Fig. 7 The whole mutation energy of ALA scan in Lac-HPAM-3

表 3 Lac-HPAM-3 的 ALA 扫描的结果

Table 3 Results of ALA scan in Lac-HPAM-3

| 索引 Index | 突变 Mutation | 突变能/ (kcal·mol ⁻¹) Mutation energy | 突变的影响 Effect of mutation |
|-------------|----------------|---|-----------------------------|
| 1 | ASP114ALA | -0.04 | 中性 |
| 2 | ASP113ALA | -0.19 | 中性 |
| 3 | ASP116ALA | -0.12 | 中性 |
| 4 | GLY486ALA | -0.01 | 中性 |
| 5 | ILE508ALA | 0.02 | 中性 |
| 10 | ASP507ALA | 0.40 | 中性 |
| 11 | TYR118ALA | 0.57 | 不稳定 |
| 12 | TYR133ALA | 0.90 | 不稳定 |
| 13 | ARG487ALA | 1.35 | 不稳定 |
| 14 | LYS135ALA | 1.62 | 不稳定 |

注: 表中仅报告了5个最低能量及5个最高能量的突变。

Table reports up to 5 lowest energy and up to 5 highest energy mutations.

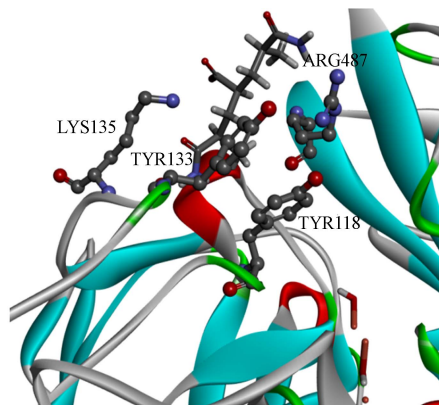


图 8 Lac-HPAM-3 的关键残基(去氢的球棍模型显示)

Fig.8 The key residues (showed by ball and stick-delete hydrogen) in Lac-HPAM-3

2.4 虚拟饱和和突变

采用 DS 2020 的 Calculate Mutation Energy (Binding) 模块对 Lac-HPAM-3 的关键残基进行虚拟饱和和突变. 即将 TYR118、TYR133、ARG487 和 LYS135 等关键残基分别突变为除 ALA 外其余的 19 种标准残基, 虚拟饱和突变结果列于表 4, 而且仅列出了 5 个最高的突变能和 5 个最低的突变能. 当 TYR118LYS、LYS135ASP、LYS135TYR、LYS135HIS 和 ARG487PRO 时, 突变能分别为 2.42、2.50、2.52、3.13、4.64 kcal·mol⁻¹, 这些突变能有较大值, 都大于 2.40 kcal·mol⁻¹, 影响均为不稳定, 说明这些突变会使 Lac 对 HPAM-3 的亲合力下降, 相互作用减弱, 最终导致 Lac 的活性降低. 其中有 3 种突变体是包含残基 LYS135 对亲和力的影响, 说明 LYS135 参与的盐桥对稳定 Lac-HPAM-3 起关键作用. 此外, 突变体 ARG487PRO 的突变能 (4.64 kcal·mol⁻¹) 最大, 说明 ARG487 参与的疏水作用也对稳定 Lac-HPAM-3 起关键作用.

表 4 Lac-HPAM-3 的虚拟饱和突变结果

Table 4 Results of virtual saturation mutation in Lac-HPAM-3

| 索引 Index | 突变 Mutation | 突变能/ (kcal·mol ⁻¹) Mutation energy | 突变的影响 Effect of mutation |
|-------------|----------------|---|-----------------------------|
| 1 | TYR118ARG | -0.36 | 中性 |
| 2 | TYR133LYS | -0.35 | 中性 |
| 3 | TYR133ARG | -0.22 | 中性 |

续表 4

| 索引 Index | 突变 Mutation | 突变能/(kcal·mol ⁻¹) Mutation energy | 突变的影响 Effect of mutation |
|-------------|----------------|--|-----------------------------|
| 4 | LYS135LYS | -0.18 | 中性 |
| 5 | TYR118TRP | -0.18 | 中性 |
| 72 | TYR118LYS | 2.42 | 不稳定 |
| 73 | LYS135ASP | 2.50 | 不稳定 |
| 74 | LYS135TYR | 2.52 | 不稳定 |
| 75 | LYS135HIS | 3.13 | 不稳定 |
| 76 | ARG487PRO | 4.64 | 不稳定 |

注: 表中仅报告了5个最低能量及5个最高能量的突变.

Table reports up to 5 lowest energy and up to 5 highest energy mutations.

2.5 Lac 与最适底物的总相互作用能

通过对接可以得到 Lac 的最适底物是 HPAM-3, 因此不同温度下它们的总相互作用能如图 9 所示. 从图 9 可以看到, 298 K 时 Lac 与 HPAM-3 的总相互作用能最小, 说明 Lac 与 HPAM-3 在 298 K 时结合的最好.

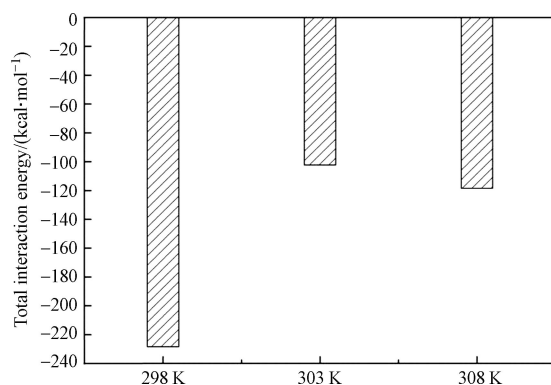


图 9 不同温度下 Lac 与 HPAM-3 的总相互作用能

Fig.9 The total interaction energy of Lac with HPAM-3 under different temperatures

2.6 Lac 与最适底物的构象变化

RMSD 通常被用来测量酶骨架原子的结构稳定性. RMSD 值越高, 酶的稳定性就越差. 为了观察 Lac 与 HPAM-3 的结合稳定性, 计算 RMSD 值随模拟时间的变化, 并以 Lac 与底物的初始构象作为参考, 如图 10 所示. 当 Lac 在 298 K 时与 HPAM-3 结合时, 该酶的骨架振动振幅最小, 说明它们在 298 K 时结合稳定性是最佳的.

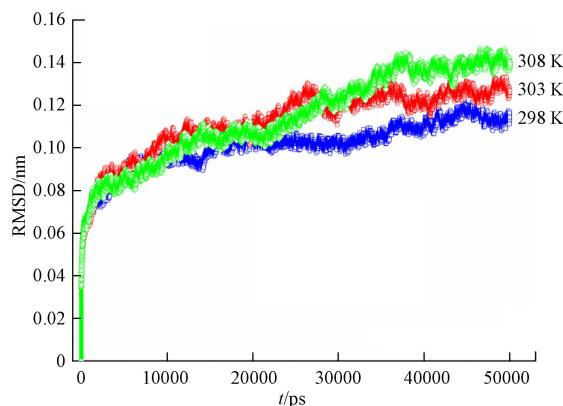


图 10 不同温度下 Lac-HPAM-3 酶骨架的的 RMSD

Fig.10 Enzyme backbone RMSD of Lac-HPAM-3 under different temperatures

图 11 显示了 MD 轨迹采样分析的第一帧和最后一帧. 从图 11 可以看出, Lac-HPAM-3 复合物的构象在 298 K 和 303 K 变化不明显, 而 HPAM-3 的取向略有改变, 说明该复合物在 298 K 和 303 K 下均是稳定的. 但 Lac 在 308 K 结合底物时 HPAM-3 偏离原先的对接位置, 推测这可能是由于 Lac 骨架振动较大导致, 即此时的 RMSD 值最大, 因此说明 Lac 在 308 K 结合底物时的结合稳定性是最差的.

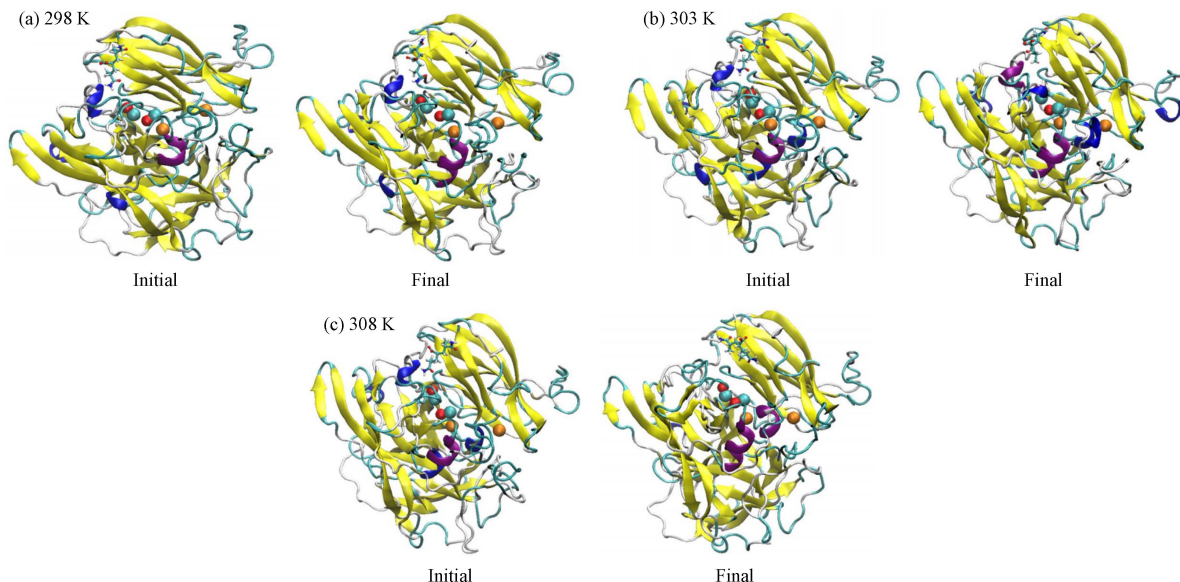


图 11 不同温度下 Lac 与 HPAM-3 的构象变化

Fig.11 Conformation transformation of Lac-HPAM-3 under the different temperatures

Note: The stick configuration was HPAM-3 and the secondary structure of Lac was exhibited in new cartoon pattern. The solvents were not shown for simplicity. The initial and final frames were only analyzed for the 50ns dynamics trajectory.

RMSF 值越高说明相应的单个残基在酶中的稳定性就越差, 而这些残基可能会影响酶结合底物的稳定性. 从图 12 可以看出, Lac 所有残基的 RMSF 值随温度升高而逐渐增大, 而且在 298 K 下 Lac 与 HPAM-3 结合时该酶所有残基的 RMSF 是最小的, 这进一步说明 Lac 与 HPAM-3 在 298 K 时结合是最佳的.

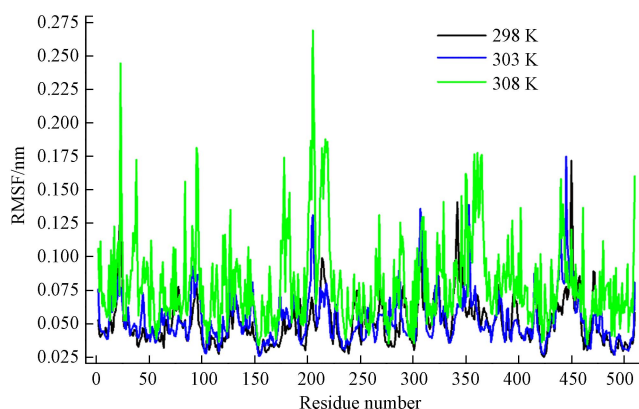


图 12 不同温度下 Lac-HPAM-3 的酶残基 RMSF

Fig.12 RMSF of enzyme residues in Lac-HPAM-3 under different temperatures

3 结论(Conclusions)

采用对接获得了 PAA 或 HPAM 与 Lac 最佳的结合构象, 从中选取能量打分为正的 Lac-底物复合物进行了相互作用分析, 然后对最适复合物 Lac-HPAM-3 分别进行基于亲和力的虚拟突变和不同温度下的 MD 模拟计算.

(1)通过结合模式分析表明, Lac-HPAM-3 享有最高亲和力、最稳定, 且它们相互作用最小、结合最

好,因此 HPAM-3 是该酶最适底物;HPAM 比 PAA 更易被 Lac 降解;Lac 对 HPAM 和 PAA 的碳链都有一定的耐受,但该酶很难降解分子量较大的聚合物。

(2)通过对打分皆为正的复合物进行相互作用分析可发现,Lac-HPAM-3 亲和力最大、最稳定的主要原因是由于形成铵盐;TYR133 通过形成氢键以稳定 Lac-HPAM 复合物,而 ARG487 一直通过形成疏水以稳定所有复合物。

(3)通过 ALA 扫描得到, TYR118、TYR133、ARG487 和 LYS135 是 Lac 降解 HPAM-3 的关键残基。通过虚拟饱和突变进一步确定,LYS135 和 ARG487 分别通过形成盐桥和疏水最大程度地影响酶同底物的亲和力。

(4)通过 MD 模拟计算分析发现,Lac 与 HPAM-3 在 298 K 时总相互作用能、酶骨架 RMSD 和酶所有残基 RMSF 都最小,因此该温度下酶与底物的结合稳定性最佳;在 298 K 和 303 K 时复合物构象变化不明显,仅底物取向略有改变,说明酶与底物的结合在 298 K 和 303 K 下均是稳定的;308 K 时 Lac 的骨架 RMSD 最大,导致底物偏离原先对接位置,说明在该温度时酶与底物的结合稳定性是最差的。

参考文献 (References)

- [1] 袁亮,张平松. 煤炭精准开采地质保障技术的发展现状及展望 [J]. 煤炭学报, 2019, 44(8): 2277-2284.
YUAN L, ZHANG P S. Development status and prospect of geological guarantee technology for precise coal mining[J]. Journal of China Coal Society, 2019, 44(8): 2277-2284 (in Chinese).
- [2] 张志军,孟齐,刘炯天. 选煤水化学:循环煤泥水系统的水化学性质 [J]. 煤炭学报, 2021, 46(2): 614-623.
ZHANG Z J, MENG Q, LIU J T. Water chemistry in coal preparation: Water chemistry properties of circulating coal slime water system[J]. Journal of China Coal Society, 2021, 46(2): 614-623 (in Chinese).
- [3] 张志军,庄丽,刘炯天. 选煤水化学:水化学性质对颗粒间相互作用的影响 [J]. 煤炭学报, 2021, 46(5): 1685-1693.
ZHANG Z J, ZHUANG L, LIU J T. Water chemistry in coal preparation: Effect of water chemistry properties on interparticle interaction[J]. Journal of China Coal Society, 2021, 46(5): 1685-1693 (in Chinese).
- [4] REN B, MIN F F, CHEN J, et al. Adsorption mechanism insights into CPAM structural units on kaolinite surfaces: A DFT simulation[J]. *Applied Clay Science*, 2020, 197: 105719.
- [5] MORTIMER D A. Synthetic polyelectrolytes-a review[J]. *Polymer International*, 1991, 25(1): 29-41.
- [6] HANSDAH P, KUMAR S, MANDRE N R. Optimization of settling characteristics of coal fine tailings with an anionic polyacrylamide using response surface methodology[J]. *International Journal of Coal Preparation and Utilization*, 2021, 41(5): 370-383.
- [7] 闵凡飞,汪婷,任豹,等. APAM 在水/高岭石界面吸附行为的试验和分子模拟研究 [J]. *中国矿业大学学报*, 2022, 51(3): 572-580.
MIN F F, WANG T, REN B, et al. Experimental and molecular simulation study of the adsorption behavior of APAM at water/kaolinite interface[J]. *Journal of China University of Mining and Technology*, 2022, 51(3): 572-580 (in Chinese).
- [8] GUEZENNEC A G, MICHEL C, BRU K, et al. Transfer and degradation of polyacrylamide-based flocculants in hydrosystems: A review[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(9): 6390-6406.
- [9] KANG X, XIA Z, CHEN R P, et al. Effects of inorganic cations and organic polymers on the physicochemical properties and microfabrics of kaolinite suspensions[J]. *Applied Clay Science*, 2019, 176: 38-48.
- [10] SEYBOLD C D. Polyacrylamide review: Soil conditioning and environmental fate[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1994, 25(11/12): 2171-2185.
- [11] ERKEKOGLU P, BAYDAR T. Acrylamide neurotoxicity[J]. *Nutritional Neuroscience*, 2014, 17(2): 49-57.
- [12] JOSHI S J, ABED R M M. Biodegradation of polyacrylamide and its derivatives[J]. *Environmental Processes*, 2017, 4(2): 463-476.
- [13] 邵振波,周吉生,孙刚,等. 部分水解聚丙烯酰胺驱油过程中机械降解研究:分子量、粘度及相关参数的变化 [J]. *油田化学*, 2005, 22(1): 72-77.
SHAO Z B, ZHOU J S, SUN G, et al. Studies on mechanical degradation of partially hydrolyzed polyacrylamide in course of polymer flooding: Changes in relative molecular mass, viscosity and related parameters[J]. *Oilfield Chemistry*, 2005, 22(1): 72-77 (in Chinese).
- [14] ZHOU Y, LI W, WAN W C, et al. W/Mo co-doped BiVO₄ for photocatalytic treatment of polymer-containing wastewater in oilfield[J]. *Superlattices and Microstructures*, 2015, 82: 67-74.
- [15] KAY-SHOEMAKE J L, WATWOOD M E, LENTZ R D, et al. Polyacrylamide as an organic nitrogen source for soil microorganisms with potential effects on inorganic soil nitrogen in agricultural soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30(8/9): 1045-1052.

- [16] ZHAO L M, BAO M T, YAN M, et al. Kinetics and thermodynamics of biodegradation of hydrolyzed polyacrylamide under anaerobic and aerobic conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 216: 95-104.
- [17] NYSSÖLÄ A, AHLGREN J. Microbial degradation of polyacrylamide and the deamination product polyacrylate[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2019, 139: 24-33.
- [18] SANG G L, PI Y R, BAO M T, et al. Biodegradation for hydrolyzed polyacrylamide in the anaerobic baffled reactor combined aeration tank[J]. *Ecological Engineering*, 2015, 84: 121-127.
- [19] KAWAI F. Biodegradation of polyethers and polyacrylate[M]//*Studies in Polymer Science*. Amsterdam: Elsevier, 1994: 24-38.
- [20] BAO M T, CHEN Q G, LI Y M, et al. Biodegradation of partially hydrolyzed polyacrylamide by bacteria isolated from production water after polymer flooding in an oil field[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 184(1/2/3): 105-110.
- [21] SONG T W, LI S S, DING W D, et al. Biodegradation of hydrolyzed polyacrylamide by the combined expanded granular sludge bed reactor-aerobic biofilm reactor biosystem and key microorganisms involved in this bioprocess[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 263: 153-162.
- [22] SINGH D, SHARMA K K, JACOB S, et al. Molecular docking of laccase protein from *Bacillus safensis* DSKK5 isolated from earthworm gut: A novel method to study dye decolorization potential[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2014, 225(11): 2175.
- [23] LIU Z F, SHAO B B, ZENG G M, et al. Effects of rhamnolipids on the removal of 2, 4, 2, 4-tetrabrominated biphenyl ether (BDE-47) by *Phanerochaete chrysosporium* analyzed with a combined approach of experiments and molecular docking[J]. *Chemosphere*, 2018, 210: 922-930.
- [24] CHEN M, ZENG G M, LAI C, et al. Molecular basis of laccase bound to lignin: Insight from comparative studies on the interaction of *Trametes versicolor* laccase with various lignin model compounds[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(65): 52307-52313.
- [25] ENGUITA F J, MARTINS L O, HENRIQUES A O, et al. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(21): 19416-19425.
- [26] ZHAO X D, SONG L Z, FU J, et al. Experimental and DFT investigation of surface degradation of polyvinylidene fluoride membrane in alkaline solution[J]. *Surface Science*, 2011, 605(11/12): 1005-1015.
- [27] WANG X K, JI G X, HAN X Y, et al. Thiazolidinedione derivatives as novel GPR120 agonists for the treatment of type 2 diabetes[J]. *RSC Advances*, 2022, 12(10): 5732-5742.
- [28] 王方略, 张东晨, 吴学风, 等. 红球菌酰胺酶降解阴离子型聚丙烯酰胺的亲合力分析[J]. *环境化学*, 2023, 42(1): 319-326.
WANG F L, ZHANG D C, WU X F, et al. Affinity analysis of anionic polyacrylamide degraded by amidase from *Rhodococcus* sp. N-771[J]. *Environmental Chemistry*, 2023, 42(1): 319-326 (in Chinese).
- [29] BERENDSEN H J C, van der SPOEL D, van DRUNEN R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation[J]. *Computer Physics Communications*, 1995, 91(1/2/3): 43-56.
- [30] DUAN Y, WU C, CHOWDHURY S, et al. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2003, 24(16): 1999-2012.
- [31] BERENDSEN H J C, POSTMA J P M, van GUNSTEREN W F, et al. Interaction models for water in relation to protein hydration[M]//Pullman B. *Intermolecular Forces*. Dordrecht: Springer, 1981: 331-342.
- [32] ESSMANN U, PERERA L, BERKOWITZ M L, et al. A smooth particle mesh Ewald method[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1995, 103(19): 8577-8593.
- [33] TU M L, LIU H X, ZHANG R Y, et al. Analysis and evaluation of the inhibitory mechanism of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide derived from casein hydrolysate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(16): 4139-4144.