



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI
EGYETEM

**EXTRACELLULÁRIS ENZIMEK ÉS
BIOAKTÍV ANYAGOK
KÖLCSÖNHATÁSAINAK MODELLEZÉSE**

ECKER JÁNOS

GÖDÖLLŐ

2022

A doktori iskola

megnevezése: Biológiatudományi Doktori Iskola

tudományága: Biológiai tudományok

vezetője: Dr. Nagy Zoltán
Tanszékvezető egyetemi tanár, DSc
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Növénytermesztési-tudományok Intézet
Növényélettan és Növényökológia Tanszék

Témavezető: Dr. Fülöp László
PhD, Dr. Habil.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Jelölések, rövidítések jegyzéke.....	1
1. Bevezetés.....	2
2. Célkitűzések.....	4
3. Irodalmi áttekintés.....	5
3.1. Molekulamodellezés elméleti háttere.....	5
3.2. Atommodellek és erőterek.....	8
3.3. Kvantumkémiai modellezés.....	14
3.4. Peszticidek és enzimek: az atrazin és a lignin-peroxidáz.....	18
3.5. Biopolimerek, molekulamodellezés alkalmazása.....	22
3.6. Modellezés alkalmazása bioüzemanyagok előállításában.....	30
4. Anyag és módszer.....	32
4.1. A felhasznált szoftverek bemutatása.....	32
4.2. Az atrazin paramétereinek kiszámítása.....	33
4.3. Az atrazin és a lignin-peroxidáz interakcióinak vizsgálata.....	36
4.4. Biopolimerázok modellezése.....	38
4.5. Modellezés a bioüzemanyagok előállításában.....	39
5. Eredmények és azok megbeszélése.....	40
5.1. Az atrazin CHARMM36-kompatibilis paraméterei.....	40
5.2. Az atrazin – lignin-peroxidáz komplex dinamikája.....	42
5.3. Biopolimerázok és molekulamodellezés.....	57
5.4. A modellezett metanolízis.....	72
6. Következtetések és javaslatok.....	74
7. Új tudományos eredmények.....	76
8. Összefoglalás.....	77
9. Summary.....	80
10. Mellékletek.....	83
M1. Irodalomjegyzék.....	83
M2. A ligandumcsatorna fluktuációja atrazin jelenlétében.....	100
M3. A ligandum csatorna aminosav-atrazin komplex.....	102
M4. Az atrazin háromdimenziós koordinátái (PDB).....	104
M5. Az atrazin molekula-specifikus adatai (PSF).....	105
M6. Az atrazin topológiája (TOP).....	108
M7. Az atrazin CHARMM36-kompatibilis paraméterei (PAR).....	109

Jelölések, rövidítések jegyzéke

3D	háromdimenziós
Å	Ångström (10^{-10} m)
AO	atomorbitál, -pálya
ATZ	atrazin
CBM	Cellulose-binding Domain (cellulóz-kötő domén)
ffTK	Force Field Toolkit (bővítmény)
G09	Gaussian 09 (szoftver)
GTO	Gauss-típusú orbitál, pálya
HF	Hartree-Fock (módszer)
H-kötés	hidrogénkötés
LiP	lignin-peroxidáz (enzim)
LJ	Lennard-Jones (potenciál)
MD	molekuladinamika
MO	molekulaorbitál, -pálya
MP	Møller-Plesset (elmélet)
NAMD	Nanoscale Molecular Dynamics (szoftver)
ns	nanoszekundum (10^{-9} s)
<i>P. chrysosporium</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (bazídiumos gomba)
ps	pikoszekundum (10^{-12} s)
RMSD	Root Mean Square Deviation
QM	kvantummechanikai/kvantumkémiái
vdW	van der Waals (kölcshatás)
VMD	Visual Molecular Dynamics (szoftver)

1. Bevezetés

Az extracelluláris enzimek vagy exoenzimek a sejten kívüli térben látják el funkciójukat. Ilyen enzimeket baktériumok és eukarióta szervezetek egyaránt termelnek, és számos biológiai folyamatban vesznek részt, például makromolekulák lebontásában. Bizonyos enzimek xenobiotikumok átalakítására is képesek, így a bioremediációban is van szerepük, valamint a szennyezők átalakításával akár olyan biológiailag aktív másodlagos termékek is nyerhetők, amelyek majd peszticidek vagy antimikrobiális gyógyszerek hatóanyagaivá válhatnak. Az exoenzimek szekréció után kikerülnek a sejt kontrollja alól, így – az enzimtől függően – változatos fizikai-kémiai közegekben kell katalitikus aktivitással rendelkezniük. Azonban az enzimek vizsgálata körülményes, hosszadalmas, és gyakran nehéz a körülményeket optimalizálni. Így a különböző közegekben végzett enzimaktivitás-vizsgálatok elvégzése mellett azok molekulaszintű modellezése is igen fontos feladat. Utóbbi módszerek előnye, hogy kevésbé anyagigényesek, így jól megválasztott szoftveres háttérrel és a lehetőségek, illetve a kitűzött célok szempontjából kellően pontos modellekkel számos molekulaszintű mechanizmus szemléltethető, valamint a molekulákra vonatkozóan is számos tulajdonság elemezhető és számszerűsíthető. Ezek a megközelítési módok még viszonylag újszerűek, azonban eszköztárunk folyamatosan gyarapodik, és az alkalmazott módszerek egyre pontosabb eredményeket adnak. Ezért tudományos relevanciájuk ma már megkérdőjelezhetetlen, amit számos hazai és külföldi kutatócsoport, neves folyóiratokban közölt eredményei is alátámasztanak. Ebből kifolyólag érdemes ilyen kutatásokkal foglalkozni, mert az eredményekre nemzetközi viszonylatban is igény mutatkozik.

Az enzimek csoportosíthatók a szubsztrátspecifikusság vagy a szekvencia adatok (aminosav/nukleotid) hasonlóságai alapján, de pusztán a térszerkezetben felfedezhető hasonlóságok alapján történő kategorizálás is lehetséges (FÜLÖP és PONYI 2015).

A gyakorlatban a *Phanerochaete chrysosporium* nevű bazídiumos gombát elterjedten használják szerves szennyezőanyagok lebontására, ugyanis exoenzimeik nem szubsztrátspecifikusak. A gomba által termelt lignin-peroxidáz a lignin biodegradáció egyik kulcsenzime. A gomba képes különböző xenobiotikumok bontására, azonban a metabolizmusban résztvevő endo- és exoenzimek konkrét szerepe még nem tisztázott (GOLTAPEH et al. 2013). Az atrazin mint széleskörűen

alkalmazott növényvédőszer, a lignin-peroxidáz pedig mint xenobiotikumok lebontására használható enzim jó modellek a téma megközelítéséhez.

A gomba által termelt, veratril-alkohol (1,2-dimetoxi-benzol) nevű másodlagos anyagcseretermék mediátor szerepet tölt be a lignin-peroxidáz által katalizált reakciókban, jelenlétében bizonyos végtermékek nagyobb mennyiségben keletkeznek. A lignin-peroxidáz esetén ismert még az 1,4-dimetoxi-benzol mint mediátor (CUI és DOLPHIN 1991). Fontos kérdés, hogy a különböző mediátorok hogyan befolyásolják az enzim térszerkezetét, milyen szubsztrátok esetén működnek.

Az atrazin (1-klór-3-etil-amin-5-izopropil-amin-2,4,6-triazin) nevű szimmetrikus (s-) triazin-származék az egyik legszélesebb körben alkalmazott herbicid az Egyesült Államok és Ausztrália mezőgazdaságában. Leginkább a kukorica és a cukornád kétszikű gyomnövényeinek pre- és posztemergens elpusztítására használható fel. Az atrazin extracelluláris enzimekkel történő metabolizmusa egy viszonylag intenzíven kutatott terület, azonban az eddigi eredmények meglehetősen ellentmondásosak, a szer ezen enzimekkel történő lebontásának mechanizmusa kevésbé ismert. Számos baktérium és gomba képes az atrazin bizonyos mértékű degradációjára, azonban a konkrét enzimek szerepe, és a reakcióútvonalak nincsenek teljesen feltárva.

A *Phanerochaete chrysosporium* szintén képes a herbicid bontására, azonban kiderült, hogy a lignin-peroxidáz tisztított formában nem reagál az atrazinnal. Ez önmagában legfeljebb egy negatív eredmény lenne, amely nem érdemel figyelmet, azonban a lignin-peroxidáz képes az atrazinnal szerkezeti hasonlóságot mutató vegyületek lebontására. A kérdés így az, hogy a szubsztrát (atrazin) és az enzim (lignin-peroxidáz) oldaláról melyek azok a fizikai, kémiai és szerkezeti paraméterek, amelyek meghatározzák az adott vegyület bonthatóságát, hozzáférhetőségét.

Ismeretes, hogy a lignin jelenléte a cellulázok jelentős részének aktivitás-csökkenését okozza (HAARMEYER et al. 2017). Modellezéssel és véletlen aminosav-cserékkel hatékonyabb cellulázokat lehetne előállítani, és a lignin-celluláz kölcsönhatásokról is többet lehetne megtudni.

Emellett a bioüzemanyagok (bioetanol, biodízel) előállításában is lehetne alkalmazni a molekulamodellezés módszertanát, tekintve, hogy ezen energiaforrások iránt egyre növekszik az igény, és enzimes úton is lehetőség van az előállításukra. Az enzimek célzott módosításával, és szimulált körülmények közötti tesztelésével időt és anyagi forrásokat lehetne megspórolni a nagyobb aktivitású enzimek előállításához vezető úton.

2. Célkitűzések

Az atrazin mint széleskörűen alkalmazott herbicid, a lignin-peroxidáz pedig mint a bioremediációban használható enzim jó modellek a téma megközelítéséhez. Ahhoz, hogy pontosabb képet kapjunk az atrazin – lignin-peroxidáz közötti „inkompatibilitás” okairól, az enzim-szubsztrát interakciók atomi szintű leírása válik szükségessé. Ehhez felhasználhatjuk a molekulamodellezés szinte teljes eszköztárát, és a munka során az alábbi célokat tűzzük ki.

1. Ahhoz, hogy az atrazint felhasználhassuk molekuladinamikai számítások során, kvantumkémiai módszerekkel kiszámítjuk a vegyület paramétereit: a nem kötő Lennard-Jones/van der Waals kölcsönhatásokat, geometriát, töltéseket, kötéshosszakat, kötésszögeket és torziós szögeket.
2. A lignin-peroxidáz és az atrazin térszerkezetét felhasználva enzim-ligandum dokkolással megvizsgáljuk, hogy atrazinnak van-e affinitása az enzim aktív centrumához, majd a kapott komplex stabilitását és viselkedését molekuladinamikai szimulációkkal vizsgáljuk tovább. A szimulációk alatt kapott komplexekről kvantitatív adatokat (kötési energiák, az enzim aktív centruma aminosavainak konformációváltozásai) gyűjtünk.
3. A kapott adatok kiértékelésével atomi szintű magyarázatot adunk arra a tényre, hogy a lignin-peroxidáz tisztított formája nem képes bontani az atrazint. (Az atrazinnal szerkezeti hasonlóságot mutató vegyületeket viszont igen.)
4. Molekulamodellezés segítségével megpróbáljuk feltérképezni a biopolimerázok működését. Emellett próbálunk összefüggéseket keresni a biopolimerek és biopolimerázok közötti gátló mechanizmusokra is, melyek akadályozhatják a biomassza eredményes feldolgozását. További célunk az is, hogy áttekintsük a biopolimerázok modellezésen alapuló fejlesztéseit, melyek szerepet játszhatnak a hatékonyabb biomassza feldolgozásában.
5. Vizsgáljuk a bioüzemanyagok előállításában szerepet játszó katalitikus folyamatokat, azon célból, hogy molekulamodellezés segítségével hogyan optimalizálhatóak, és segítségével hogyan tehető hatékonyabbá a bioüzemanyagok előállítása.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Molekulamodellőzés elméleti hátttere

A molekulamodellőzés magában foglalja az összes, a molekulák viselkedésének minél realiztikusabb reprodukálását célzó elméleti és számítógép-alapú módszereket. A módszereket széles körben alkalmazzák, többek között az informatikai kémiában, gyógyszerkutatásban, anyagtudományokban. Minden módszer alapja, hogy legkisebb egységnek az atomot tekintjük, az elektronokat csak az általuk létesített ún. erőtér révén vesszük figyelembe; ha az elektronokat tekintjük individuálisnak, akkor már kvantumkémiáról (QM) beszélünk.

Molekulamechanika. A molekulamechanikai módszerek hátttere gyakorlatilag a klasszikus newtoni fizika. Ha a vizsgált rendszert le akarjuk írni, szükségünk van az erőtér leíró egyenletek matematikai alakjára, ehhez pedig meg kell választani az ezekben szereplő paramétereket, amelyek viszont kísérletileg meghatározott adatokból származnak. Az erőtér lényege, hogy az elsősorban kisméretű molekulákkal kapcsolatos kísérletes adatok (kötéshosszak, kötésszögek, geometriai és energetikai adatok) halmozódásával felmerült annak lehetősége, hogy egy nagy molekula jellemzői megadhatóak-e egy kisebb molekula mint szerkezeti egység kombinációiként. A molekulát felépítő atomok folyamatos mozgása, a molekula energiatartalmának megváltozását vonja maga után, a klasszikus fizika erőtörvényeivel ezen változások számolhatóak, általuk leírhatóak a kötő és nem kötő kölcsönhatások. Az erőtér standard formulája,

$$V = V_{belső} + V_{külső} \tag{1}$$

ahol $V_{belső}$ a kovalensen kötött atomok közötti (intramolekuláris) kölcsönhatásokat jelenti, $V_{külső}$ pedig az intermolekuláris kölcsönhatásokat. A $V_{belső}$ általában egyszerű harmonikus kifejezéseket tartalmaz, amelyek például a kovalens kötést egy mechanikailag rugalmas objektumként adják meg,

$$V(l) = \frac{1}{2}k(l - l_{eq})^2 \tag{2}$$

ahol k a merevségi állandó, l a kötés hossza, l_{eq} az egyensúlyi kötész hossz. A belső vagy kötő kölcsönhatások közé az egymással közvetlen kötésben lévő atomok között fellépő nyújtási, hajlítási és torziós interakciók tartoznak,

$$V_{belső} = V_{nyújtási} + V_{hajlítási} + V_{torziós} \quad (3)$$

Az egymáshoz közel lévő atomok között taszítás, a távolabbiak között elektrosztatikus (Coulomb-féle kölcsönhatás) vagy diszperziós van der Waals (vdW) kölcsönhatás jön létre, ezek nem kötő kölcsönhatások,

$$V_{külső} = V_{vdW} + V_{elektrosztatikus} \quad (4)$$

A vdW interakciók r távolságra lévő atompárok esetén a Lennard-Jones (LJ) potenciállal modellezhetőek,

$$V(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (5)$$

ahol σ a kölcsönhatás hatótávolsága, ϵ a vonzóhatást kifejtő energia. Az egyenlet az atomokat gömbökként írja le, amelyek kis távolságokon belül taszítják (az elektronfelhők átfednek), nagyobb távolságokon belül vonzzák (diszperziós kölcsönhatás) egymást. A σ és ϵ értékek kísérletes termodinamikai adatokat tartalmaznak, például folyadék halmazállapoton mért sűrűséget és párolgási entalpiát. Az r távolságra lévő i , j atompárok közötti elektrosztatikus erőket a Coulomb potenciállal lehet leírni,

$$V(r) = \frac{Q_i Q_j}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (6)$$

ahol Q_i és Q_j a kölcsönható töltések, ϵ_0 pedig a vákuum permittivitása (LEACH 2001, ORSI 2014).

Energiaminimalizáció. Az energiaminimalizáció az elkészült molekulák termodinamikailag kedvező szerkezetbe történő rendezését jelenti, a kísérletesen meghatározott kötész távolságok és kötész szögek beállításával egyetemben. A molekulák

térszerkezete az atomok vektoraival írható le. Ezek ún. belső koordinátákat alkotnak, amelyek a kötéshosszak/szögek és a torziós szögek vektorainak összességei. Az \mathbf{r} vektorok megadják az atomok pozícióját, tehát az egyes atompozíciók energiaszintje: $E_{\mathbf{r}}$. Az optimalizáció célja, hogy megtaláljuk azokat az \mathbf{r} értékeket, ahol az $E_{\mathbf{r}}$ -nek lokális minimuma van. Az energia és az atompozíció első deriváltjainak hányadosa $\partial E/\partial \mathbf{r}$ a nullvektor, a rendszer mátrixának második deriváltja $\partial^2 E/\partial \mathbf{r}_i \partial \mathbf{r}_j$ pedig leírja a potenciális energia felületének görbületét az adott \mathbf{r} esetén (JENSEN 2013).

Molekuladinamika. A molekuladinamika (MD) gyakorlatilag a newtoni mozgásegyenletek integrálását jelenti. Az energiaminimalizációval ellentétben a modellek nem csak az algoritmus lefutásáig dinamikusak, a szimuláció végpontja itt nem egy stabil szerkezet létrejötte, hanem a megadott időtartam alatt folyamatosan változik a rendszer szerkezete. A módszer gyakorlatilag bármilyen anyag viselkedésének tanulmányozására felhasználható az egyszerű gázok és folyadékoktól (STODDARD és FORD 1973, ADAMS et al. 1979, SOKHAN és TILDESLEY 1997, VEGA és ABASCAL 2011, ORSI 2014), fehérjéken (MACKERELL 2004, SONCINI et al. 2007, DERIU et al. 2010, PARTON et al. 2011), lipid membránokon (NIELSEN et al. 2005, XIANG és ANDERSON 2006, ORSI et al. 2008, LYUBARTSEV és RABINOVICH 2011), polimereken keresztül (KREMER és GREEST 1990, VARNIK et al. 2000, RAPAPORT 2002, BARRAT et al. 2010), a szén nanocsövekig (BELYTSCHKO et al. 2002, ZANG et al. 2013), vagy akár az agyagásványok modellezését is említhetjük (ECKER és FÜLÖP 2014). Az első lépésben a program beolvassa azon adatokat, amelyek meghatározzák az atomok viselkedését a modellben. A második fázis az atomok időbeli mozgását jelenti, az erőter karakterisztikája és a newtoni mozgásegyenletek megoldása alapján (Orsi 2014).

Az egyik legtipikusabb algoritmus matematikai leírása,

$$x(t + \Delta t) = x(t) + \Delta t \left[v(t) + \frac{\Delta t f(t)}{2m} \right] \quad (7)$$

ahol m az atomtömeget jelenti. A lépésköz általában igen alacsony érték ($\Delta t = 10^{-15}$ s), és a szimuláció 10^6 - 10^9 iterációs lépést tartalmaz (SWOPE et al. 1982). A harmadik fázisban megkapjuk a kiértékelt adatokat. Az atomok útvonalát a szimuláció alatt készített állóképeken tanulmányozhatjuk, illetve az érdeklődésünkre számot tartó egyéb paraméterek számértékeit is megkapjuk.

Fehérje-ligandum dokkolás. A dokkolás módszerével előre jelezhető egy adott molekula (ligandum) affinitása/orientációja egy másik (biopolimer) molekulához (LENGAUER és RAREY 1996). Legelterjedtebben a gyógyszerhatóanyagok különböző fehérjékhez való affinitását és aktivitását vizsgálják vele (KITCHEN et al. 2004). A fehérje és a ligandum kapcsolatára gyakran a „kulcs-zár” analógiát használják, amelyben a ligandum a kulcs, ez passzol a fehérje adott részéhez, a zárhoz. Tekintve, hogy mindkét partner flexibilis struktúrákat alkot, elterjedt még a „késztyű” hasonlat is (JORGENSEN 1991). A dokkolás folyamán a partnerek változtatják konformációikat (konformációs szelekció) azon célból, hogy a termodinamikailag legmegfelelőbb szerkezetbe rendeződjenek (indukált illeszkedés) (WEI et al. 2004).

Kétféle megközelítés terjedt el: az egyikben a ligandumot és a célfehérjét szimplán egymással komplementer vagy nem komplementer felületekként írják le (MORRIS et al. 1998, GOLDMAN és WIPKE 2000), a másikban a különböző interakciók energiaszintjeit számolják, tulajdonképpen ez jelenti a konkrét szimulációt (FEIG et al. 2004). Mindkét megközelítésnek vannak előnyei és jelentős korlátai is.

A pusztán geometriai komplementaritásra alapuló módszer esetén a ligandumot és a fehérjét az alak, felület, oldhatóság alapján értékelik, ezek alapján következtetnek, hogy a két struktúrát van-e értelme egymásra dokkolni, kompatibilisek-e egymással. A módszer ugyan meglehetősen gyors, de nem veszi figyelembe a komponensek dinamikus változásait és a konformáció változásának hatását a kötődésre. A konkrét szimuláció esetén a fehérje és a ligandum el vannak szeparálva egymástól, a dokkolás indítása után a ligandumnak meg kell találnia az ideális konformációs állapotot a célszekvencián belül. Minden konformációs változás után a szoftver kiszámolja az aktuális állapot energiáját. A módszer jóval számításigényesebb, de ez a megközelítés kevésbé absztrakt, mint a geometriai alapú (SHOICHET et al. 1992).

3.2. Atommodellek és erőterek

A kémiai rendszerek tanulmányozásának bármely számítási megközelítésének sikere szempontjából kulcsfontosságú a rendszer energiájának kiszámításához használt matematikai modell minősége a rendszer szerkezetének függvényében. Kisebb kémiai rendszerek esetében a QM megközelítések javallottak. Ezek a módszerek azonban jellemzően a körülbelül 100 atomos vagy annál kisebb rendszerekre korlátozódnak, bár már nagy rendszerek kezelésére alkalmas kvantumos

megközelítések is léteznek (DARRIN et al 1996). A biokémiai vagy biofizikai szempontból érdekes rendszerek jellemzően olyan makromolekulákat tartalmaznak, amelyek 1000-5000 vagy annál több atomot és azok kondenzált fázisú környezetét tartalmazzák. Ez 20 000 vagy annál is több atomot tartalmazó biokémiai rendszerekhez vezethet. Ezenkívül a biokémiai anyagok eredendően dinamikus természete és környezetük mobilitása (MCCAMMON és HARVEY 1987, BROOKS et al. 1991) megköveteli, hogy a különböző módszerekkel előállított nagyszámú konformációt energetikai számításoknak vessék alá. Ezért olyan matematikai modell(ek)re van szükség, amely(ek) lehetővé teszi(k) 10^5 atomot tartalmazó rendszereken 10^6 vagy ennél is több számítás elvégzését.

Az empirikus energiafüggvények megfelelnek a biokémiai és biofizikai rendszerek számítási vizsgálatait által támasztott követelményeknek. Matematikai egyenleteik viszonylag egyszerű kifejezéseket tartalmaznak a biológiai molekulák szerkezetét és dinamikai tulajdonságait meghatározó fizikai kölcsönhatások leírására. Ezenkívül az empirikus erőterek atommodelleket használnak mint a rendszer legkisebb részecskéit – a QM-ben használt elektronok és atommagok helyett. Ez a két egyszerűsítés lehetővé teszi akkora számítási sebesség elérését, amely szükséges ahhoz, hogy a biomolekulák környezetében a szükséges számú számításokat el lehessen végezni, és ami még fontosabb, a matematikai modellekben megfelelően optimalizált paraméterek alkalmazásával elérhető a szükséges kémiai pontosság.

A potenciális energiafüggvény egy olyan matematikai egyenlet, amely lehetővé teszi egy kémiai rendszer potenciális energiájának (V) kiszámítását a háromdimenziós (3D) szerkezet (R) függvényében. Az egyenlet tartalmazza a kémiai rendszer szerkezetét és tulajdonságait meghatározó különböző fizikai kölcsönhatásokat leíró kifejezéseket. A meghatározott 3D szerkezetű kémiai rendszer teljes potenciális energiája, $V(R)_{\text{teljes}}$, a belső, $V(R)_{\text{belső}}$, és a külső, $V(R)_{\text{külső}}$, potenciális energiára vonatkozó kifejezésekre bontható az alábbi egyenletek szerint.

$$V(R)_{teljes} = V(R)_{belső} + V(R)_{külső} \quad (8)$$

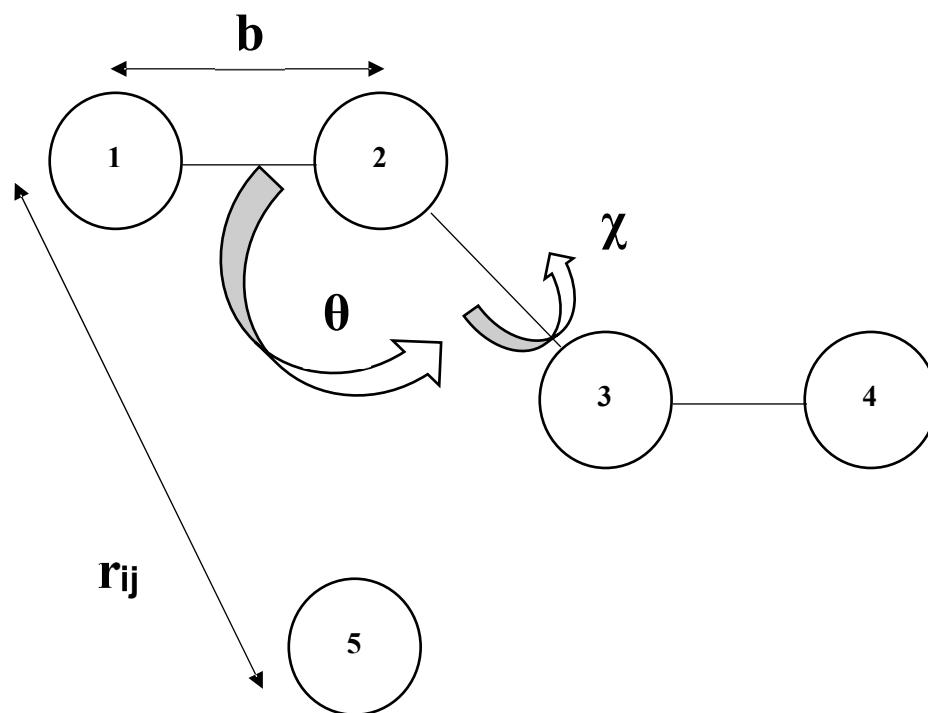
$$V(R)_{belső} = \Sigma_{kötések} K_b (b - b_0)^2 + \Sigma_{szögek} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \Sigma_{torziós\ szögek} K_\chi [1 + \cos(n\chi - \sigma)] \quad (9)$$

és

$$V(R)_{külső} = \Sigma_{nemkötő\ atompárok} \left(\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\varepsilon_D r_{ij}} \right) \quad (10)$$

A $V(\mathbf{R})_{belső}$ tagok a kovalens kötést létesítő atomokat jelentik, a $V(\mathbf{R})_{külső}$ tagok pedig az atomok közötti nem kovalens vagy nem kötő kölcsönhatásokat jelölik. A külső tagokat kölcsönhatási, nem kötött vagy intermolekuláris tagoknak is nevezik.

Az (8)-(10) egyenletek leírt formáján túlmenően fontos hangsúlyozni a különbséget az energiaszámítás tárgyát képező 3D struktúrához, \mathbf{R} -hez kapcsolódó tagok és az egyenletekben szereplő paraméterek között. A 3D szerkezetből kapott kifejezések a kötéshosszok, \mathbf{b} ; a kötésszögek, θ ; a torziós szögek, χ ; és az atomok közötti távolságok, r_{ij} . Az 1. ábrán látható két hipotetikus molekula lehetővé teszi e kifejezések szemléltetését. E kifejezések értékeit jellemzően röntgenkristallográfiás vagy NMR-kísérletekből, modellezett szerkezetekből (pl. egy fehérje homológiamodellezéséből), vagy egy MD vagy Monte Carlo szimuláció során létrehozott szerkezetből kapjuk. A (9) és (10) egyenletekben a további kifejezéseket paramétereknek nevezzük. Ezek a kifejezések az adott atomtípushoz és a hozzá kovalensen kötött atomok típusaihoz kapcsolódnak. Így a különböző paraméterek lehetővé teszik, hogy különböző típusú atomokat és különböző molekulakötéseket kezeljünk a (9) és (10) egyenletek azonos formájával.



1. ábra. Hipotetikus molekulák az (8)-(10) egyenletekben szereplő energia tagok szemléltetésére. A felső molekula az (1-4) atomokból, az alsó pedig az (5) atomból áll. A felső molekulában előforduló belső tagok az 1 és 2, 2 és 3, valamint a 3 és 4 atomok közötti \mathbf{b} kötések; az 1-2-3 és 2-3-4 atomokat érintő θ szögek, valamint az 1-2-3-4 atomok által leírt χ torziós szög. A kötéseket 1,2-es atompárokként vagy 1,2-es kölcsönhatásokként, a szögeket 1,3-as atompárokként vagy 1,3-as kölcsönhatásokként, a torziós szögeket pedig 1,4-es atompárokként vagy 1,4-es kölcsönhatásokként is felfoghatjuk. Az alsó molekula külső kölcsönhatásban áll a felső molekula mind a négy atomjával, ahol a különböző atomok közötti távolságokat, \mathbf{r}_{ij} , ismerni kell. Természetesen a felső molekula 1,2, 1,3 és 1,4 párosai között szintén felléphetnek külső kölcsönhatások (van der Waals- és Coulomb-kölcsönhatások egyaránt). Az 1,2-es és 1,3-as kölcsönhatásokat tartalmazó külső kölcsönhatásokat azonban általában nem számítjuk be a külső energia részeként, az 1,4-es kölcsönhatásokat azonban igen. Gyakran az 1,4 külső kölcsönhatási energiákat skálázzák (1,4-skálázás), hogy csökkentsék ezen külső kölcsönhatások hatását a geometriára, a rezgésekre és a konformációs energetikára. Azt is meg kell jegyezni, hogy a felső molekulában esetlegesen jelen lévő további atomok 1,5 kölcsönhatásokat, 1,6 kölcsönhatásokat stb. képviselnének, és a külső tagokon keresztül ezeket szintén figyelembe kellene venni.

A paraméterek minősége, amelyet a kísérletileg és QM által meghatározott céladatok (pl. a kiválasztott molekulákra vonatkozó információk, amelyek reprodukálására a paramétereket beállítják) reprodukálására való képességük alapján ítélnék meg, végső soron meghatározzák a biológiai molekulák számításon alapuló vizsgálatából kapott eredmények pontosságát.

A (9) és (10) egyenletek matematikai formája kompromisszumot jelent az egyszerűség és a kémiai pontosság között. Mind a kötésnyújtó, mind a szöghajlító tagokat harmonikusan kezeljük, ami hatékonyan tartja a kötéseket és a szögeket az egyensúlyi értékek közelében. A kötés- és szögparaméterek közé tartozik a b_0 és a θ_0 , az egyensúlyi kötéshossz és az egyensúlyi szög. A K_b és K_θ a kötés- és szögtényezőkhöz kapcsolódó erőállandók. A harmonikus kifejezések használata elegendő azon körülményekhez, amelyek között a biológiai számításokat elvégezzük. A MD vagy Monte Carlo szimulációkat általában szobahőmérséklet közelében és kötésbontó vagy kötésképző események hiányában végzik; mivel a kötések és szögek szobahőmérsékleten közel maradnak az egyensúlyi értékükhöz, a harmonikus energiafelületek pontosan reprezentálják a helyi kötés- és szögtorzulásokat. A torziós szögek a kötés körül bekövetkező forgásokat képviselik, amelyek az 1. és 4. atomok relatív helyzetének változásához vezetnek, ahogyan az 1. ábrán látható. Ezek a kifejezések oszcilláló jellegűek ezért pontos modellezésükhöz szinuszos függvényt kell használni.

A (9) egyenletben a torziós tag tartalmazza az erőállandó K_χ ; a periodicitás vagy multiplicitás n ; és a fázis σ paramétereit. A K_χ nagysága határozza meg a kötés körüli rotáció mértékét, így a kettős kötéshez tartozó K_χ jelentősen nagyobb, mint az egyszeres kötéshez tartozó K_χ . A periodicitás, n , a ciklusok számát jelöli 360° -os elfordulásonként a torziós szög körül. A fázis, σ , határozza meg a maximumok helyét a torziós energiafelületen, ami lehetővé teszi, hogy a minimumok helyét egy n 2-es torzió esetében 0° -ról 90° -ra, és így tovább, eltoljuk. Általában a σ 0 vagy 180° , bár a legújabb kiterjesztések lehetővé teszik, hogy σ -hoz 0 és 360° között bármilyen értéket hozzárendeljenek (BLONDEL és KARPLUS 1996). Végül, egy molekula minden torziós szögét kezelhetjük különböző torziós tagok összegével, valamint erőállandókkal és fázisokkal.

A (10) egyenlet a külső vagy nem kötő kölcsönhatási tagokat írja le. Ezek a tagok tekinthetők a biológiai rendszerek számításon alapuló vizsgálatában az energiatagok közül a legfontosabbnak. Ennek oka a környezetnek a makromolekulák tulajdonságaira gyakorolt erős hatása, valamint a molekulák között előforduló nagyszámú másodlagos

kölcsönhatás. Érdekes módon, bár a nem kötő kölcsönhatások megfelelő kezelése elengedhetetlen a sikeres számításokhoz, bebizonyosodott, hogy az ezen kifejezések pontos kezeléséhez szükséges matematikai modell viszonylag egyszerű lehet. A külső feltételekhez kapcsolódó paraméterek az **i** és **j** atomok közötti potenciál gödör mélysége, ϵ_{ij} ; a minimális kölcsönhatási rádiusz, $R_{\min,ij}$; és a parciális atomtöltés, q_i . Szintén ide tartozik a dielektromos állandó, ϵ_D , amelyet általában 1-gyel, a vákuum permittivitásával egyenlőnek tekintünk, bár vannak kivételek.

A (10) egyenletben szögletes zárójelben lévő kifejezés a LJ/vdW kölcsönhatások kezelésére szolgál. Az egyenletben szereplő különleges formát LJ 6-12 tagnak nevezzük. Az $1/r^{12}$ kifejezés az atomok közötti, az egyes atomok elektronfelhőinek átfedésével járó taszítást (azaz a Pauli-féle kizárási elvet) jelenti. A taszítás erős távolságfüggését ezen terminus 12. hatványa jelzi. A London-féle diszperziós kölcsönhatásokat és a dipól-indukált dipól kölcsönhatásokat az $1/r^6$ kifejezés képviseli, amely negatív, utalva a vonzás által okozott energiefelszabadulásra. A LJ 6-12 egyenletben két paraméter van; a potenciálgödör mélysége, ϵ_{ij} , a két **i**, **j** atom közötti kedvező diszperziós kölcsönhatások nagyságát jelzi; $R_{\min,ij}$ pedig az **i** és **j** atomok közötti minimális távolság, ahol LJ kölcsönhatási energia már fellép, és az atom vdW sugarával függ össze. Jellemzően ϵ_{ij} és $R_{\min,ij}$ nem minden lehetséges **i**, **j** kölcsönhatáspárra kerül meghatározásra, hanem a paramétereket az egyes atomtípusokra határozzuk meg, majd kombinációs szabályokat használunk. Ezek a kombinációs szabályok általában nagyon egyszerűek, vagy a számtani középérték [azaz $R_{\min,ij} = (R_{\min,i} + R_{\min,j})/2$], vagy a mértani középérték [azaz $\epsilon_{ij} = (\epsilon_i \epsilon_j)^{1/2}$]. A kombinációs szabályok használata nagymértékben leegyszerűsíti az ϵ_i és $R_{\min,i}$ paraméterek meghatározását.

A külső kölcsönhatásokhoz hozzájáruló utolsó tag az elektrosztatikus vagy Coulomb-törvény. Ez a kifejezés az **i** és **j** atomok q_i és q_j parciális atomtöltései közötti kölcsönhatást foglalja magában, osztva az atomok közötti távolsággal, r_{ij} , a megfelelő dielektromos állandó figyelembevételével. Az egyes atomok vagy monopólusok töltésábrázolásának használata ténylegesen magában foglalja az összes magasabb rendű elektrosztatikus kölcsönhatást, például a dipólusok és a kvadropólusok közötti kölcsönhatásokat. A LJ és a Coulomb kölcsönhatások együttesen bizonyítottan nagyon pontos képet adnak a molekulák közötti kölcsönhatásokról, beleértve a hidrogénkötések (H-kötés) távolság- és szögfüggését is (REIHER 1985).

Ha a molekula 3D szerkezete és az atom- és molekulakapcsolódásokhoz szükséges összes paraméter ismert, a rendszer energiája az (8)-(10) egyenletekkel kiszámítható.

Az energia első deriváltjai a pozíció függvényében lehetővé teszik az atomokra ható erők meghatározását, amely információt az energiainimalizálás vagy a MD szimulációk során használjuk fel. Az energiainimalizálás az atomok olyan elrendezésének megtalálása a térben, ahol a kémiai kötés valamilyen számítási modellje szerint az egyes atomokra ható nettó atomközi erő elfogadhatóan közel van a nullához, és a potenciális energiafelület helyzete egy stacionárius pont. Tehát, gyakorlatilag egy 0 Kelvin hőmérsékletű rendszerről beszélünk, amelyben az atomoknak nincs kinetikus energiája, csak a közöttük lévő elektromágneses kölcsönhatást vesszük figyelembe. Az energia második deriváltjai a pozíció függvényében felhasználhatók az atomokra ható erőállandók kiszámítására, ami lehetővé teszi a rezgési spektrumok meghatározását.

A (9) és (10) egyenletekben bemutatott potenciális energiafüggvény a biológiai rendszerek számításon vizsgálatához használható minimális matematikai modell. Jelenleg a CHARMM (BROOKS et al. 1983), AMBER és GROMOS programokhoz tartozó energiafüggvények a legelterjedtebbek. A munka során a MD szimulációkhoz a CHARMM36 erőteret használtuk (HUANG és MACKERELL 2013).

3.3. Kvantumkémiai modellezés

A QM a jelenleg legpontosabb elméletünk arra, hogy az elektronok és atommagok miért alkotnak atomokat, és hogy az atomok miért alkotnak kémiai kötések, hogy molekulákat hozzanak létre. A QM-ben a klasszikus fizikához képest az elektronok és atommagok hullámként is leírhatók, nem csak részecskeként. A hullámhosszat (λ) a De Broglie-egyenlet adja meg:

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{mv} \tag{11}$$

ahol \mathbf{p} , \mathbf{m} és \mathbf{v} a részecske impulzusa, tömege és sebessége, \mathbf{h} pedig a Planck-állandó. A Planck-állandó nagyon alacsony érték, így csak a nagyon könnyű részecskéknek (kis \mathbf{m}) van mérhető hullámhosszuk, ami azt jelenti, hogy részecskeként kezelni őket pontatlan közelítés. A Planck-állandó értéke ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js) olyan, hogy az elektronok túl könnyűek ahhoz, hogy részecskeként kezeljük őket, míg első közelítésben még egy hidrogénmag is részecskeként írható le.

A QM olyan egyenletek összessége, amelyek megmondják, hogyan számítsuk ki egy tömeggel és töltéssel rendelkező hullám energiáját és "helyzetét". A következőkben a QM kulcsfontosságú egyenletének, a Schrödinger-egyenletnek a magyarázata következik (nem pedig levezetése). A legegyszerűbb hullám az, amely egy dimenzióban (x) mozog, és nem lép kölcsönhatásba semmivel:

$$\Psi(x) = \sin\left(\frac{2\pi}{\lambda}x\right) \quad (12)$$

ahol λ a hullámhossz és $\Psi(x)$ a hullámfüggvény. Ennek a hullámfüggvénynek az energiáját az x -hez viszonyított második deriváltjából és a De Broglie-egyenletből kaphatjuk meg,

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = -\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \Psi = -\frac{p^2}{\hbar^2} \Psi = -\frac{2m}{\hbar^2} T\Psi \quad (13)$$

ahol T a mozgási energia ($\frac{1}{2}mv^2$), és \hbar pedig $h/2\pi$ (redukált Planck-állandó). Mivel a hullám nem lép kölcsönhatásba semmivel, nincs potenciális energia, és a teljes energia $E = T$, így következik, hogy

$$\begin{aligned} \left(-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2}{dx^2}\right) \Psi(x) &= E\Psi(x) \\ -\frac{1}{2} \nabla^2 \Psi(x) &= E\Psi(x) \\ \hat{H}\Psi(x) &= E\Psi(x) \end{aligned} \quad (14)$$

ami egy izolált elektron Schrödinger-egyenlete, ahol \hat{H} a Hamilton-operátor.

Valójában a Schrödinger-egyenletet "fordítva" használják. Először definiáljuk a Hamilton-egyenletet a rendszerünkhöz, majd megkeressük azt a hullámfüggvényt, amely kielégíti a Schrödinger-egyenletet. Tehát egy x irányban mozgó izolált elektron esetében definiáljuk a Hamilton-operátort, majd megoldjuk a Schrödinger-egyenletet az azt "kielégítő" hullámfüggvény megkeresésével. Ez azt jelenti, hogy olyan függvényt találunk, amelynek második deriváltja a függvény egy konstanssal (E) megszorozva, ami történetesen egy $\sin(x)$ függvény. Tehát a Hamilton-egyenlet

megmondja nekünk a hullámfüggvényt és az energiát is. Vegyük észre, hogy a $\sin(2x)$, $\sin(3x)$ stb. is működik, azaz a Schrödinger-egyenletnek sok megoldása van

$$\hat{H}\Psi_n(x) = E(n)\Psi_n(x) \quad n = 1, 2, \dots \quad (15)$$

különböző energiákkal és hullámfüggvényekkel.

$$\Psi_n(x) = \sin\left(\frac{2\pi}{\lambda}nx\right) \quad (16)$$

n egy egész szám, és kvantumszámnak nevezzük. Az energia a kvantumszám növekedésével nő, és a legkisebb kvantumszámú energiát alapállapotú energiának nevezzük (JENSEN 2010).

Ahhoz, hogy egy ligandum (többnyire 100 atomnál kisebb molekula) egy makromolekula (tömege legalább 1000 Dalton) mellett partnerként alkalmazható legyen MD szimulációkban, rendelkeznie kell azokkal a paraméterekkel, amelyeket a megválasztott erőter egy azzal kompatibilis paraméter fájlból be tud olvasni. A ligandum paramétereinek kiszámítása valamilyen QM szoftverrel (Gaussian, GAMESS stb.) történik.

A LJ/vdW paramétereket gyakran már nem számolják ki, ugyanis az adott ligandumban található atomok és azok környezete szinte bizonyosan előfordul rengeteg másik, már paraméterezett molekulában, így analógia alapján hozzá lehet rendelni az ismeretlen paraméterekhez valamilyen konkrét, már korábban megállapított, az erőter által már ismert értéket (HALGREN 1995).

A QM szinten végzett geometriaoptimalizálás egy olyan eljárás, amelynek célja a molekula lokális vagy globális energiaminimumának megfelelő konfiguráció megtalálása egy kezdeti struktúra hullámfüggvényének és energiájának kiszámításával és egy alacsonyabb energiájú új geometria keresésével (KÄSTNER et al. 2007).

A parciális töltések meghatározhatók kisméretű ligandum-víz komplexek létrehozásával (explicit oldószer), amelyeket QM számításoknak vetünk alá. Az így kapott kölcsönhatási energiákat és geometriákat, valamint a rendelkezésre álló dipólusmomentumokat ezután a parciális töltések optimalizálásához céladatként felhasználhatjuk (MACKERELL és KARPLUS 1991).

A geometriaoptimalizálás által eredményezett struktúra általában nem rendelkezik olyan kötéshosszokkal és szögekkel, amelyek közvetlenül megfelelnek az egyensúlyi

kötés- és szögparamétereknek. A kötések és szögek kiszámításához a kötések és szögek mentén bekövetkező torzulásokhoz kapcsolódó potenciális energiafelület rekonstrukciójára van szükség, vagyis a potenciális energia második deriváltjának (ld. Hesse-féle mátrix) QM számításaira van szükség (BAKER et al. 1998).

A torziós szögek (gyakorlatilag a síkok által bezárt szögek) a kötés körül bekövetkező forgásokat jelölik, amelyek az 1. és 4. atomok relatív helyzetének megváltozásához vezetnek. A paraméterezés során egyetlen torziós szögre vonatkozó tagok összegzését, egy Fourier-sorozatot érdemes használni, amely nagymértékben növeli a torziós tag rugalmasságát, lehetővé téve a QM energetikai céladatok pontosabb reprodukálását a paraméterezés végső fázisában (BLONDEL és KARPLUS 1996).

A bemeneti atomadatokon kívül minden QM számítást egy ún. elméleti modell és egy ún. báziskészlet határoz meg. Az elméleti modell egy rendszer modellezésének vagy reprezentálásának egy módja, amelyhez közelítések egy meghatározott készletét használják, amelyeket egy számítási algoritmussal kombinálnak, és az alapkészlet által meghatározott atompályákra (AO) alkalmaznak a molekulapályák (MO) és az energia kiszámítása érdekében. A módszerek négy fő típusba sorolhatók: félempirikus, ab initio, sűrűség-funkcionál alapú és hagyományos mechanikai (LEHTOLA 2019).

A Hartree-Fock (HF) módszer egy alapvető ab initio modell. Ebben a közelítésben az elektronok taszítás átlagolható, ahelyett, hogy explicit taszító kölcsönhatásokat vennénk figyelembe, de ezáltal kizárja az elektronok közötti kölcsönhatásokat (HARTREE 1928, FOCK 1930).

A pontosabb adatokhoz való jutás érdekében egy HF-számítással induló modellt használnak, de az elektronkorrelációs hatások hozzáadásával fel lehet javítani az általános eredményeket. A Møller-Plesset (MP) perturbációs elmélet a HF-módszert javítja azáltal, hogy a Rayleigh-Schrödinger perturbációs elmélet segítségével elektronkorrelációs hatásokat ad hozzá, amelyek a HF-ből hiányoznak (MØLLER és PLESSET 1934).

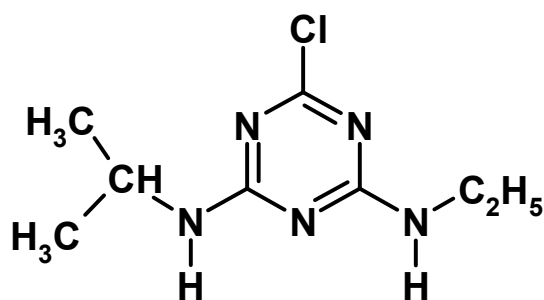
A báziskészlet olyan hullámfüggvények halmaza, amelyek leírják az AO-k alakját. A MO-kat a kiválasztott elméleti modell segítségével számítják ki az AO-k egyszerű lineáris kombinálásával, így ún. Gauss-típusú pályák (GTO) jönnek létre. Az úgynevezett Pople-báziskészletek lehetővé teszik, hogy a mag- és a vegyértékelektronokra külön-külön megadjuk a GTO-k számát. Általános jelölésük: **K-LMG**, ahol **K** = az sp-típusú belső héj GTO-k száma; **L** = a belső vegyérték s- és

p-típusú GTO-k száma; **M** = a külső vegyérték s- és p-típusú GTO-k száma és **G** = azt jelzi, hogy GTO-kat használunk (pl. 6-31G) (DITCHFIELD 1971, HEHRE 1972).

A Pople-báziskészletek módosíthatók egy polarizációs funkció hozzáadásával, és az AO-k eredeti alakjuktól való eltorzításával. A polarizáció hozzáadható * karakterként vagy (betű) alakban. A (d) vagy * típus: d-típusú funkciók hozzáadása a hidrogénektől eltérő atomokhoz és f-típusú funkciók hozzáadása az átmeneti fémekhez, és a (d,p) vagy ** típus: p-típusú funkciók hozzáadása a hidrogénekhez, d-típusú funkciók hozzáadása az összes többi atomhoz, f-típusú funkciók hozzáadása az átmeneti fémekhez. Például a 6-31G* jelölés jelentése: 6 GTO a belső, lezárt héjakhoz; 3 GTO a belső vegyértékhez (ld. az átmeneti fémek vegyértékelektronjai másst jelentenek, mint a főcsoportbeli elemeké); 1 GTO a külső vegyértékhez és a * szimbólum jelöli a program számára a (d) típusú polarizációs funkció használatát (HARIHARAN és POPLE 1973).

3.4. Peszticidok és enzimek: az atrazin és a lignin-peroxidáz

Számos, intenzív mezőgazdasággal rendelkező országban a fotoszintézis II-es fotorendszerét gátló atrazin (ATZ) (2. ábra) az egyik legszélesebb körben használt gyomirtószer, amelyet a gazdálkodók más hatóanyagokkal kombinálva használnak. Több mint 50 növényfajt kezelnek ATZ-nal, köztük citrusfélét, kukoricát, szóját, cukornádat, szőlőt és erdészeti fajokat. Az ATZ kapcsán számos környezeti és ökológiai problémát azonosítottak, ezért biológiai lebomlása és lebonthatósága széleskörűen kutatott téma. Az ATZ koncentrációjának csökkenése a talajban kémiai, fizikai és biológiai folyamatok eredménye. Az ATZ számos mechanizmus szerint kötődhet különböző (szerves vagy szervetlen) talajkomponensekhez, és egyes eredmények szerint változó erősségű kötések jönnek létre. Több kötőhely létezik, de ezek egyéni kötése erőssége eltérő. Az ATZ, más peszticidokhoz hasonlóan, csak a nagy energiájú helyeken képes megmaradni (retenció) (BELZUNCES et al. 2016), egyébként deszorbeálódik és biológiailag hozzáférhetővé válik (KOSKINEN et al. 1995).



2-klór-4-etilamino-6-izopropil-amino-1,3,5-s-triazin

2. ábra. Az atrazin molekula konstitúciós képlete.

Az ATZ egy nagyon gyenge bázis. Elmondható, hogy az ATZ adszorpciója savas pH-jú talajokban sokkal jelentősebb, mint semleges vagy lúgos pH-jú talajokban (MCGLAMERY és SLIFE 1966, CLAY et al. 1988, GOETZ et al. 1989, CLAY és KOSKINEN 1990, LIU et al. 1995). Továbbá az ATZ hidrolízise savas körülmények között gyorsabb, mint semleges körülmények között, és a reakció terméke a hidroxiatrazin (LEI et al. 2001).

Számos mikroorganizmust vizsgáltak az ATZ metabolizálására való képességük szempontjából, beleértve a *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Rastonia* és *Nocardioides* nemzetségek tagjait (EATON és KARNIS 1991, YANZE-KONTCHU és GSCHWIND 1994, BOUQUARD et al. 1997, STRUTHERS et al. 1998, STRONG et al. 2002). Egyes vizsgálatokban a talajban élő gombák dominánsan az ATZ dealkilezését okozták, míg a további lebontásért és mineralizációért a baktériumok voltak felelősek (MASAPHY et al. 1993). Számos, az *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* és *Phanerochaete* nemzetséghez tartozó gombáról megállapították, hogy képesek az ATZ lebontására (KAUFMAN és BLAKE 1970, MOUGIN et al. 1994).

A *Phanerochaete chrysosporium* (*P. chrysosporium*) (*Basidiomycota*) számos szennyező vegyületet (dioxinok, poliklórozott bifenilek) képes lebontani széles specifitású enzimeivel, mint a lignin-peroxidáz (LiP), a mangánfüggő peroxidáz, lakkáz (AUST 1990, REDDY 1995, POINTING 2001). A lignin lebontása széles körben kutatott téma (WANG et al. 2013), és intenzíven vizsgálják, hogy ez a három enzim hogyan lép kölcsönhatásba végső szubsztrátjával, a ligninnel.

Chen és munkatársai (2011) tanulmányukban meghatározták a lignin kötődését a lakkázhoz, mangán-peroxidázhoz és a LiP-hoz. A kötődési módok robusztusságát MD szimulációkkal igazolták. A lakkázban a Ser113, Pro346, Glu460, a LiP-ban az Asp183, Arg43, Ala180 és a mangán-peroxidázban az Arg177, Arg42, His173

aminosavak voltak a legkritikusabbak a lignin kötődésében. A kölcsönhatási elemzések azt mutatták, hogy a hidrofób kölcsönhatás döntő szerepet játszik a szubsztrát-specifikusság meghatározásában. Ez az információ referenciaként használható a jobb ligninbontó tulajdonságokkal rendelkező enzimek tervezéséhez (CHEN et al. 2011).

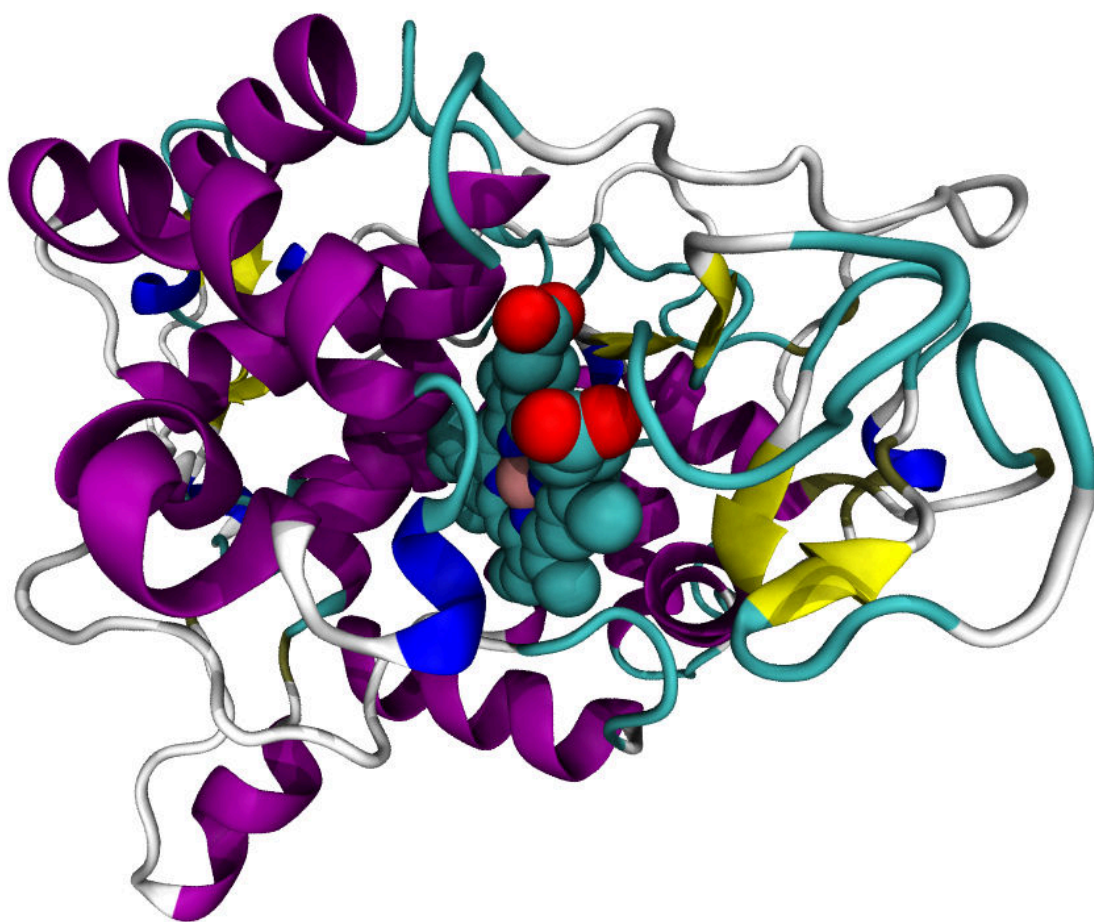
A LiP részt vehet az oldható, részben lebomlott lignin fragmentumok oxidációjában, azonban nem zárható ki annak lehetősége, hogy a LiP közvetlenül oxidálja a részben lebomlott növényi sejtfalakban lévő lignint. A LiP rendelkezik egy úgynevezett ligandum-hozzáférési csatornával, amely lehetővé teszi a szubsztrát és a hem kofaktor közvetlen kölcsönhatását. A His82, Ile85, Glu146, Phe148, Asp183, Val184 és Gln222 aminosavak ebben a csatornában helyezkednek el. A csatorna szterikusan korlátozott, és nem teszi lehetővé a nagy méretű szubsztrátokhoz való hozzáférést (POULOS 1993). Két konzervált hisztidin, a proximális (His177), a disztális (His48) és a disztális oldali arginin (Arg44) aminosavak konzerváltak a peroxidatív katalitikus funkcióhoz, hasonlóan az I. és III. osztályú hemeperoxidázokhoz (DE ROPP et al. 1991). A magas redoxpotenciálú szubsztrátok, például a már említett veratril-alkohol esetében a LiP-ban az oxidációs hely az enzim felszínén egy katalitikusan aktív triptofán (Trp171) helyén található (CHOINOWSKI et al. 1999). Egy második szubsztrát-oxidációs hely a hem peremén található, egy felszíni Glu146 közelében (DOYLE et al. 1998).

A LiP dinamikus tulajdonságai azt mutatják, hogy az enzim természetes szubsztrátja, a veratril-alkohol könnyen megközelíti a hemet a ligandum hozzáférési csatornán keresztül. A MD szimulációk eredményeinek elemzése a csatorna jelentős fluktuációit is kimutatta (GERINI et al. 2003), ahol a ligandum-hozzáférési csatorna nyitott és zárt állapota állandó egyensúlyban van az oldatban. Ez a jelenség számos enzimre jellemző (pl. a szerkezetileg nagyon hasonló citokróm C-peroxidázra). NMR-kísérletek igazolják, hogy a ligandum képes a nyitott konformerhez kötődni, és hozzáfér az aktív centrumhoz, majd a kötődés folyamata az egyensúlyt a nyitott konformer felé tolja el (CAO et al. 1998).

Egy hagyományos folyadékkultúrás kísérletben a *P. chrysosporium* képes volt az ATZ lebontására oxidatív N-dealkilezéssel. A gomba az etil-csoportot hasította, de a heterociklusos gyűrűt nem tudta felnyitni. Az ATZ biotranszformációs rátája azonban nem volt jelentős, és a kísérlet azt sem tudta bizonyítani, hogy a LiP bármilyen módon hozzájárult volna a folyamathoz (MOUGIN et al. 1994). Egy másik fontos kísérleti eredmény azt mutatta, hogy a tisztított peroxidázok önmagukban egyáltalán nem

voltak képesek az ATZ lebontására, mivel sem metabolitokat, sem szén-dioxidot nem mutattak ki (HICKEY et al. 1994). Jelentős mennyiségű Mn^{2+} -ion represszálta a LiP termelését, és közel tízszeresére serkentette a mangán-peroxidáz expresszióját (PEREZ és JEFFRIES 1992).

A LiP teljes szekvenciája és szerkezete ismert (3. ábra). Az enzim egy homodimer, amely két, egyenként 351 aminosavból álló alegységből áll. Mindkét alegység két-két Ca^{2+} ionkötő helyet és egy-egy, vasiont tartalmazó hem kofaktort hordoz, és a másodlagos szerkezetet nagyrészt α -hélixek határozzák meg (BLODIG et al. 2001).

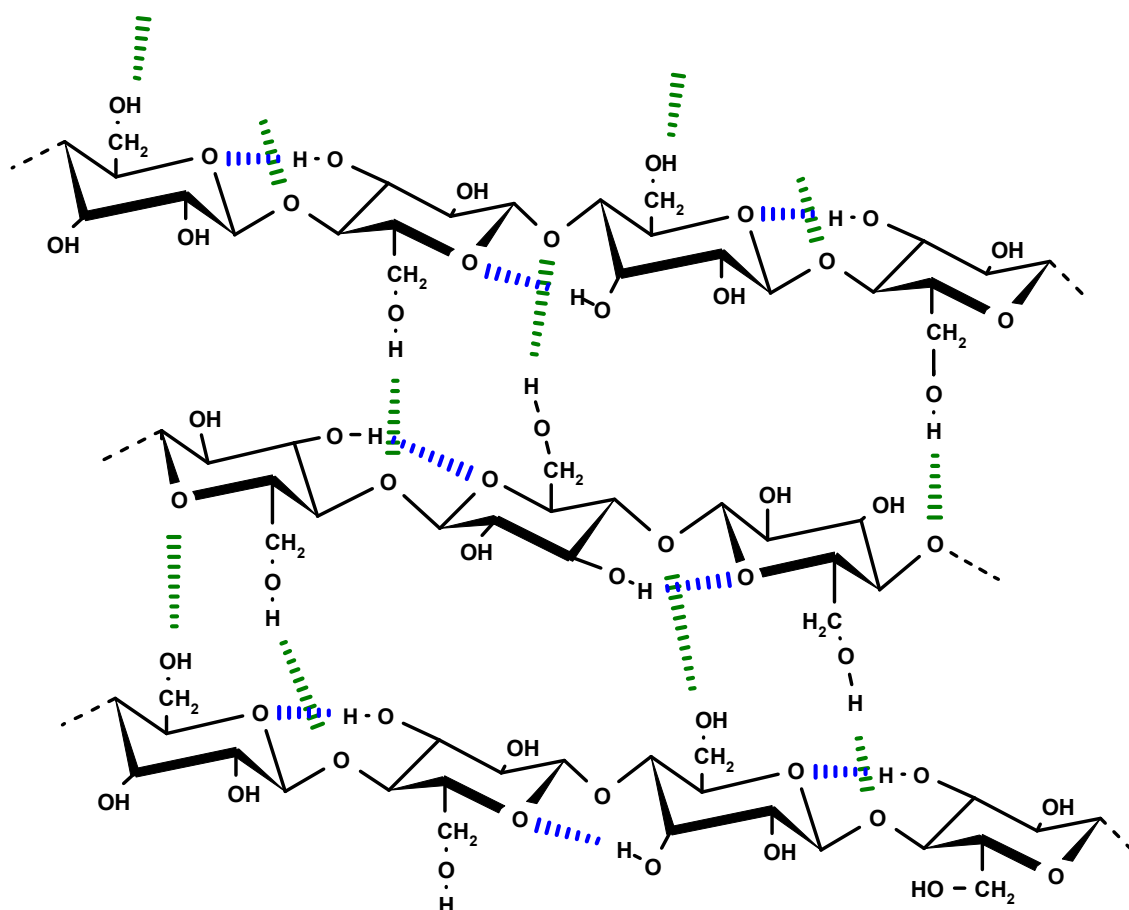


3. ábra. A lignin-peroxidáz egyik alegységének másodlagos szerkezete, kiemelve a hem vázat. A fehérjerész NewCartoon ábrázolásmóddal jelenik meg; α -hélixek lilák, β -lemezek sárgák, 3-10-hélixek kékek, kanyarok (turn) ciánkékek, a csavarok (coil) fehérek. A hem kofaktor vdW felületekkel van ábrázolva, a különböző atomok különböző színekkel vannak jelölve. A könnyebb áttekinthetőség végett a hidrogénatomokat nem tüntettük fel. Az ábra a Visual Molecular Dynamics szoftverrel készült (HUMPHREY et al. 1996) BLODIG et al.

2001 alapján. PDB azonosító: 1B82.

3.5. Biopolimerek, molekulamodellőzés alkalmazása

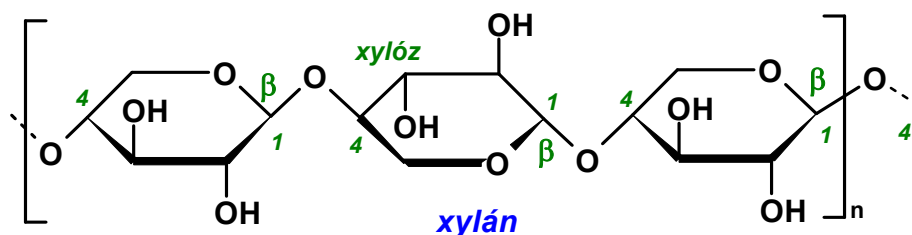
A cellulóz az egyik legstabilabb molekula a Földön. A β -1,4-O-glikozidos kötésekkel kapcsolódó glükóz alkotja a cellulózt (HEINZE et al. 2018). A polimermolekulán belül a gyűrű oxigénje és a 3-OH csoport között H-kötés, míg a láncok között az O-glikozidos kötésen és a 6-OH csoporton keresztül szintén H-kötés jön létre (4. ábra) (SHUANGXI et al. 2020). Ez a keresztköteses szerkezet hatékonyan megakadályozza a polimermolekula enzimátikus lebontását, mivel az O-glikozidos kötésekhez az enzimek nehezen férnek hozzá (ROSENAU et al. 2018). Így a cellulózmolekulák hidrolízise segítség nélkül nehezen kivitelezhető. A cellulóz lebontását az is nehezíti, hogy az O-glikozidos kötések hidrolízise a molekulák rigiditása miatt megfordítható.



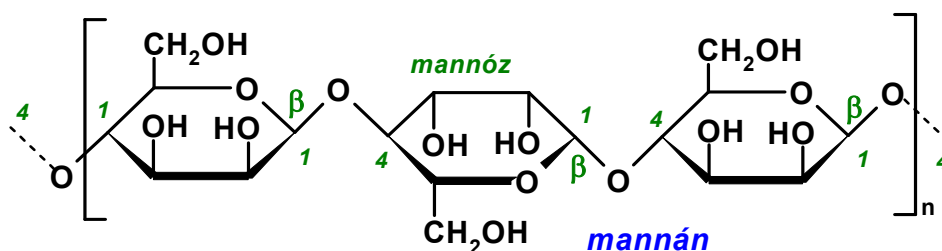
4. ábra. A cellulóz szerkezete. A kék szaggatott vonal a cellulózmolekulán belüli hidrogénkötést, a zöld szaggatott vonal a cellulózsálak közötti hidrogénkötést jelzi.

A hemicellulózok olyan poliszacharidok, amelyek a cellulóz mellett szintén részt vesznek a sejtfal felépítésében (HOUFANI et al. 2020). Szerepük a sejtfal vázának

rögzítése és összekapcsolása a cellulózrost-hálózattal. A cellulóz és a hemicellulóz gyakorlati megkülönböztetését az teszi lehetővé, hogy a cellulóz NaOH-oldatban nem oldódik, míg az alacsonyabb molekulatömegű poliszacharidok és a hemicellulóz különböző poliszacharidjai oldódnak (KOJIMA et al. 2019). Másrészt a hemicellulózok savas hidrolízise enyhébb körülmények között zajlik, mint a cellulózé; híg kénsavval a hemicellulóz szinte teljes egészében monomerekké alakítható további enzimes vagy savas kezelés nélkül. A cellulóz csak tömény sósavval vagy 60-80%-os kénsavval hidrolizálható 100 °C-nál magasabb hőmérsékleten és nagy nyomáson (LEE és YU 2020).

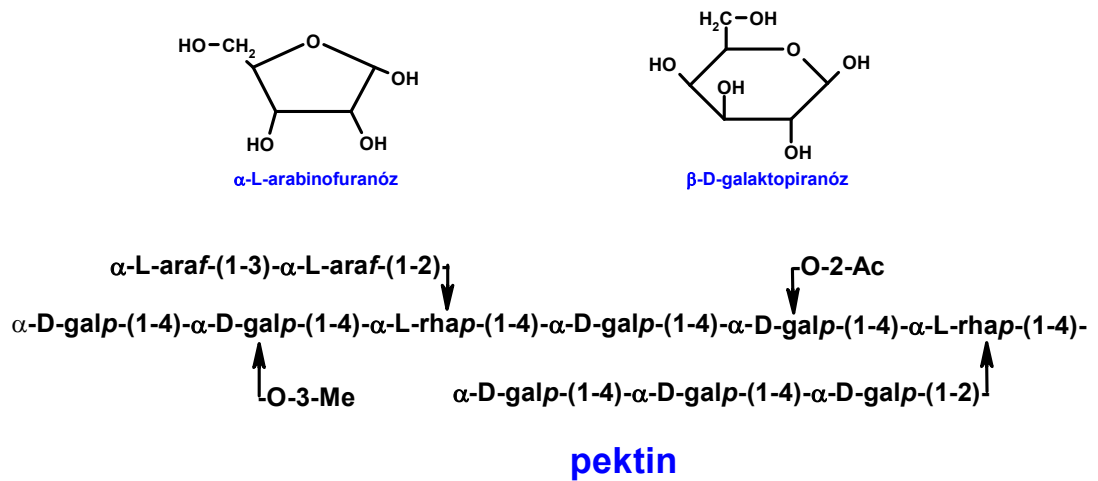


5. ábra. A xylán szerkezete.



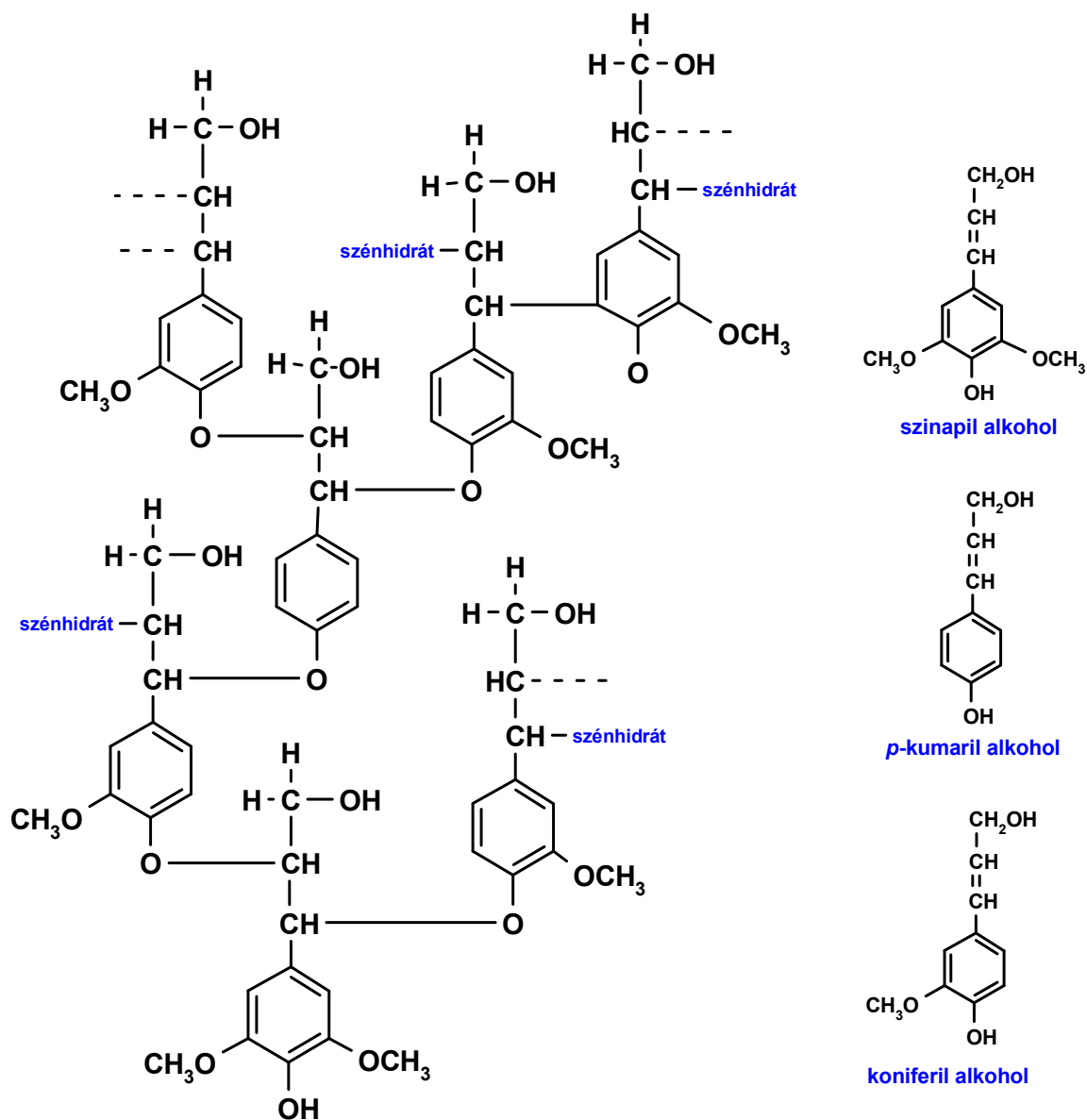
6. ábra. A mannán szerkezete.

A növények hemicellulóz-tartalma túlnyomórészt pentozán, így az arabinán 1,2-, 1,3- és 1,5-O-glikozidos kötésekkel kapcsolódó L-arabinózból képződik. A xylán β -1,4-O-glikozidos kötésekkel összekapcsolt xylózból áll (5. ábra). A lánc kapcsolódhat α -L-arabinózhoz és α -D-glükózhoz (SERNA-SALDÍVAR és HERNÁNDEZ 2020). A xyloglükán és az arabino-galaktán szintén öt és hat szénatomból álló monoszacharidokat tartalmaz. A galaktomannánok β -D-mannózból (6. ábra) állnak, amelyek β -1,4-O-glikozidos kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz, amelyeket β -D-galaktózzal kötött oldallánc alkot 1,6-O-glikozidos kötésekkel (7. ábra) (RODRIGUEZ-CANTO et al. 2019).



8. ábra. Hipotetikus pektin szerkezete.

A lignin a főleg cellulózból és hemicellulózból felépülő sejtfa molekulaméretű üregeiben rakódik le, növelve annak mechanikai ellenállóságát (SETÄLÄ et al. 2020). A különböző fajokban vagy növényi részekben található lignin eltérő szerkezetű, de vannak alapvető hasonlóságok: az aromás gyűrűket gyakran metoxi-csoport vagy fenolos hidroxil-csoport köti össze (LI et al. 2020). A lignin a növények szöveteinek alkotórésze. A lignin felépítésében három fahéjalkohol-származék (szinapil-alkohol, p-kumaril-alkohol és koniferil-alkohol) vesz részt (9. ábra). Ezekből egy dehidrogenáz enzim hatására alakul ki a makromolekuláris lignin (ELDER et al. 2020). A lignin többféleképpen is kölcsönhatásba léphet a cellulózzal és a hemicellulózzal.



9. ábra. A lignin lehetséges szerkezete. Háromféle cinnamil-alkohol-származék vesz részt a lignin felépítésében.

A bioüzemanyag-előállítás költségeinek csökkentése érdekében növelni lehet az enzimek szubsztrát-specifikusságát és aktivitását. Az enzimek különböző tulajdonságai javíthatók, beleértve a specifitást, a katalitikus aktivitást és a termostabilitást – mindezt ipari körülmények között (PRAJAPATI et al. 2018).

A lignin jelenlétében a celluláz adszorpciója és inaktíválódása a fő probléma a lignocellulóz bioüzemanyaggá történő átalakítása esetén. Viszonylag kevés kutatás foglalkozik a szükséges enzim szerkezet-funkció összefüggésekkel. Molekulamodellezéssel magas aktivitású, alacsony ligninkötő képességű cellulázok határozhatók meg (HAARMEYER et al. 2017).

Az enzimmechanizmusok molekuláris szintű megértése alapvető követelmény a cellulázok és ligninázok esetében, hogy a megújuló biomasszából hatékonyabban lehessen üzemanyagot előállítani, és a növényi biomasszát fenntartható energiaforrásként lehessen hasznosítani. Az enzimek és a szubsztrátok 3D szerkezetének, valamint az enzim-szubsztrát kölcsönhatásoknak a tanulmányozására általában olyan számítási módszereket használnak, mint a MD szimulációk, az enzim-ligandum dokkolás és a QM számítások, amelyek részletesebb leírást adnak az enzim és a szubsztrát közötti interakciók mechanizmusáról (MENG et al. 2011).

Néhány kiválasztott, gomba eredetű celluláz esetében a savas karakterüket *in silico* fizikai-kémiai jellemzéssel határozták meg. Egy molekuláris dokkolási vizsgálat kimutatta, hogy a cellulázok cellulózzal kölcsönhatásba lépő aminosav-oldalláncainak jellege függ attól, hogy az enzim milyen organizmusból származik (TAMBOLI et al. 2017).

A cellulázok hidrolitikus aktivitása leginkább az enzim cellulózhoz való kötődési affinitásától függ (KRISHNARAJ et al. 2017). Ezeket az eredményeket molekuláris dokkolással kapjuk, és ez a módszer hasznos az ipari biotechnológiában a hatékonyabb enzimszerkezetek tervezéséhez (AMORE et al. 2017).

A xylanázok aktivitása különböző körülmények között jellemezhető. A számítógépes modellek segíthetnek a kísérleti költségek csökkentésében és az időmegtakarításban azáltal, hogy tudományos és ipari felhasználás szempontjából megfelelő aktivitású enzimeket azonosítanak (ARIAEENEJAD et al. 2018).

A különböző oldószerek és a cellulóz oligomerek közötti kölcsönhatások energetikájának és mértékének meghatározására Liu és munkatársai (2010) kifejlesztettek egy erőteret ionos folyadékokra. A cellulóz viselkedését egy sor glükóz oligomer MD szimulációjával vizsgálták. A szimuláció két olyan oldószerben – metanolban és vízben – lévő cellulóz oligomereket tartalmazott, amelyek képesek a cellulózt kicsapni az ionos oldatokból. Az eredmények azt mutatták, hogy egyes kationok hidrofób kölcsönhatásokon keresztül erős kontaktusba kerültek a poliszacharidokkal, és a folyadék és a poliszacharid-lánc közötti kölcsönhatási energia erősebb volt, mint tiszta metanol vagy víz esetén. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kationos kölcsönhatások domináns szerepet játszanak a cellulóz oldódásában (LIU et al 2010).

Hasonlóképpen Jaeger, Burney és Pfaendtner (2015) MD segítségével vizsgálták a *Trichoderma viride*, *Thermotoga maritima* és *Pyrococcus horikoshii* három, 5. családba tartozó cellulázának (Cel5A) ionos folyadékkal szembeni tűrőképessége

közötti különbségeket. Elemzésük azt mutatja, hogy az ionos folyadékok enzimekre gyakorolt hatása minden esetben a helyi szerkezeti zavaroktól egészen az enzim másodlagos szerkezete nagy részének elvesztéséig terjed. A negatívabb felületi töltéssel rendelkező enzimek sokkal nehezebben destabilizálódnak ionos folyadékok hatására. A vizes oldatokban lévő ionok befolyásolják az enzimek specifikusságát (JAEGER et al. 2015).

Wohlert és Berglund (2011) a MARTINI, ún. durva szemcsés erőteréből (coarse-grained force field) (LÓPEZ et al. 2009) származó cellobióz felhasználásával, a cellulóz durva szemcsés modelljét építették fel MD szimulációkhoz. A modellt hosszabb cellooligomerekre extrapolálták, és olyan modellt kaptak, amely a cellulóz rendezett szerkezetét adja meg vízben (WOHLERT és BERGLUND 2011).

Payne és munkatársai (2011) a triptofánok alaninná történő mutációjával kiszámították a 6. családba tartozó cellulázok (Cel6A) relatív ligandumkötési szabad energiáját. Eredményeik azt sugallják, hogy az aktív hely előtt közvetlenül elhelyezkedő aromás aminosavak nem vesznek részt közvetlenül a kötődésben. Ez azonban szükséges a katalízisben szerepet játszó glükopiranoz gyűrű torzulásához. Az enzimsatorna be- és kijáratánál lévő aromás aminosavak eltávolítása nagymértékben befolyásolja a kötési affinitást. Ez arra utal, hogy ezek az aminosavak szerepet játszanak a cellulózlánc felismerésében és a termék stabilizációjában. MD-vel és Normál Módus Analízis elemzéssel megerősítették a kötési affinitásbeli különbségekből feltételezett szerepeket. Az aromás aminosav-szénhidrát kölcsönhatások az enzimsatornában lévő aminosavak helyzetétől függenek. Ezek az eredmények hatással vannak a szénhidrát-anyagcsere fehérjeszerkezet-funkció összefüggéseinek megértésére és a biomasza hasznosítására irányuló fehérjemérnöki stratégiákra, mivel az aromás aminosav-szénhidrát kölcsönhatások minden, szénhidrátot szubsztrátként használó enzimben jelen vannak (PAYNE et al. 2011).

A magas hőmérséklet optimális a termofil cellulázok számára a cukrok cellulózból történő hidrolíziséhez, amint azt Batista és munkatársai (2011) leírták. A hőálló cellulázban (Cel9A-68) a cellulóz-kötő domén (Cellulose-binding Domain, CBM) és a katalitikus domén Pro-Ser-Thr gazdag linkerrel kapcsolódik egymáshoz. E domének között kooperatív kapcsolat van. A CBM hatásmechanizmusának leírása még hiányzik. A szimulációkkal magasabb hőmérsékleten nagyobb kollektív mozgásokat detektáltak. A mozgások elemzése egy olyan doménközi tartományt mutatott ki, ahol a linker régióban található Gly460 és Asp459 a domének közötti flexibilitásért leginkább felelős (hinge region) aminosavak. Ezért a termofil cellulázok hasznos

modellek a két domén kölcsönhatásainak vizsgálatára, mivel magasabb hőmérsékletre van szükség ahhoz, hogy ezek a kollektív mozgások és a kooperatív kapcsolat kimutatható mértékűek legyenek (BATISTA et al. 2011).

A linker funkció vizsgálatára Payne és munkatársai (2013) MD szimulációkat végeztek a 6. és 7. család cellulózhoz kötött cellobio-hidrolázain. A cellulózhoz kötött glikozilált linker szekvenciák jelenléte az enzim működésében egy eddig ismeretlen funkcióra utalhat. A Cel7A CBM és a natívan glikozilált Cel7A CBM-linker kötési affinitásának mérésével ezt a feltételezést kísérletileg megvizsgálták. A kristályos cellulózon lévő glikozilált linker növeli a CBM kötődési affinitását. Az így módosított linker az enzimműködést az enzim fluktuációjának jelentős csillapítása által befolyásolhatja, amint azt a MD szimulációk is sugallják. A szénhidrátot bontó enzimek glikozilált linkerei segíthetik a dinamikus kötődést a növényi sejtfalak enzimatis lebonthatása során (PAYNE et al. 2013).

Ezen tanulmány alapján Costa, Silva és Batista (2018) azonosított két olyan aminosavat (Gly460 és Pro461), amelyek a linkerben helyezkednek el, és hinge-pontként működnek, és feltételezték, hogy a Cel9A-68 Pro461Gly és Gly460+ (egy extra glicinnel) konstrukciói fokozott domének közötti mozgást mutatnának, míg a Gly460Pro mutáns rigid lenne. A Pro461Gly mutáció a konformációs tér kiterjedését eredményezte, amit a klaszterezés és a szabadenergia-elemzések is megerősítettek. Ha az enzimnek több lehetséges konformációja van, akkor a szubsztrátkötési és lebontási potenciálja is nagyobb lehet. A mérnöki beavatkozás hatékony módszernek tűnik az enzimaktivitás megváltoztatására, és a cellulózsálak bontásának megkönnyítésére (COSTA et al. 2018).

A celluláz enzimszatórna katalitikus részét a monoszacharidok és diszacharidok gátolják, ezért a celluláz cellulózra gyakorolt hatásának kulcsfontosságú összetevője. A cellobióz és a glükóz abszolút kötési szabad energiáját a 7-es családba tartozó cellobio-hidroláz (Cel7A) katalitikus szatórnájához két különböző megközelítéssel számolták ki: Steered Molecular Dynamics szimulációkat (a rendszeren időfüggő külső erőket alkalmaznak, pl. húzás valamilyen irányba) és szabad energia perturbációs MD szimulációkat. A húzási pályák elemzése arra utal, hogy több aminosav kulcsszerepet játszik a glükóz és a cellobióz katalitikus helyhez való kötődésében. Öt mutációt végeztek számítással, hogy mérni tudják a szabad energia változásait a termék leválása során. Az eredmények azt mutatták, hogy az új enzimek hatékonyabbá tehetik a biomasza átalakítását (BU et al. 2011).

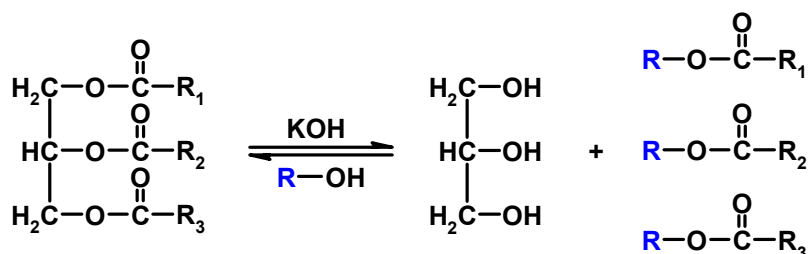
Silveira és Skaf (2015) MD szimulációkkal gyűjtöttek adatokat a cellobióznak a *Trichoderma reesei* Cel7A (TrCel7A) cellobio-hidrolázhoz való kötődéséről, valamint az olyan mutációk hatásairól, amelyek csökkenthetik a cellobióz kötődését anélkül, hogy befolyásolnák az enzim integritását. A termékkötő hely belső rugalmasságot mutat, amely sztérikusan megakadályozhatja a cellobióz felszabadulását. Az enzim-szubsztrát kölcsönhatások pontmutációkkal csökkenthetők, és nem feltétlenül őrzik meg az enzim szerkezetét. A TrCel7A termékkötő hely töltéssel rendelkező aminosavainak mutációja olyan perturbációkat okoz, amelyek befolyásolják a szubsztrátkötő csatorna szerkezetét, és befolyásolhatják a TrCel7A működését a hidrolízis egyéb lépéseiben. Az eredmények azt mutatják, hogy kapcsolat van a termékgátlás és a katalitikus teljesítmény között, és ezek kijelölhetik a celluláz-mérnökség irányait (SILVEIRA és SKAF 2015).

3.6. Modellezés alkalmazása bioüzemanyagok előállításában

Az üzemanyagként is felhasználható etanol előállítása még mindig szinte kizárólag erjesztésen alapul. Ehhez a nyersanyagot (szacharózt és keményítőt) cukornádból, cukorrépából, gabonafélékből és burgonyából nyerik (ARNOLD et al. 2019). Ezek az úgynevezett első generációs bioüzemanyag-technológiák szükségszerűen etikai, környezetvédelmi és politikai aggályokat vetnek fel az ezekben a folyamatokban felhasznált nyersanyagok miatt. Ezért a második generációs technológiák (SATARI et al. 2019) folyamatos fejlesztés alatt állnak. Ezek a technológiák a mezőgazdaság és az erdészet lignocellulóz-tartalmú melléktermékeit, valamint ipari hulladékokat vagy maradékokat használhatnak fel olyan növényekkel együtt, amelyeket nem használnak fel élelmiszertermelésre. Az első generációs módszerekkel ellentétben, amelyek a növényeknek csak egy viszonylag kis részét (gyökér, szár, termés) dolgozzák fel, a második generációs technológiákkal a teljes biomassza feldolgozása lehetséges. A harmadik generációs módszereket (MAHJOUR et al. 2020) az algák és mikroorganizmusok bioüzemanyaggá történő feldolgozására használják. A harmadik generációs bioüzemanyagok alternatív megoldást kínálnak a mikroalgák feldolgozásával, amelyek rendkívül gyorsan nőnek, és évente többször is betakaríthatók (YANG et al. 2021). A mikroalgák olajhozama egy, de akár két nagyságrenddel is magasabb, mint a nagy termőképességű trópusi növényeké (BOUSTEIJN et al. 2017). A mikroalgák növekedése nagyon gyors, naponta képesek megduplázni a súlyukat, így hetente betakaríthatóak, szemben más

növényekkel, amelyek csak évente egyszer. Mindezt figyelembe véve a mikroalgák nagyon kedvező bioüzemanyag-forrásként szolgálhatnak.

A mikroalgák által termelt semleges trigliceridek a glicerín három zsírsavmolekulával alkotott észterei. A biodízel előállítása olajokból átészterezési reakcióval valósítható meg (10. ábra).



10. ábra. Az átészterezési reakció.

A metanollal történő reakció több lépésben zajlik (O’FALLON et al. 2007). A trigliceridek először digliceridekké, majd monogliceridekké, végül glicerinné és zsírsav-metilészterekké, azaz biodízellé alakulnak (CHISTI 2008). A mikroalgák semleges lipidtartalmának átészterezési reakcióihoz bázikus katalizátorként NaOH-ot és KOH-ot használnak, de mellékreakcióként szaponifikációs reakció is bekövetkezhet. Az olyan alkoxidok, mint a NaOCH₃ vagy más bázisok használatával elkerülhetőek ezek a folyamatok, ezért egyre gyakrabban alkalmazzák őket katalizátorként. Emellett ezen folyamatok modellezése segíthet a megfelelő módszer kiválasztásában. Kívánatos lenne enzimeket használni és modellezni, mivel ennek nincsenek mellékhatásai, de a magas költségek miatt ez még nem kivitelezhető.

A negyedik generációs bioüzemanyagok közé pedig fotobiológiai és/vagy elektroüzemanyagok tartoznak. A negyedik generációs bioüzemanyag-előállítási eljárások genetikailag módosított algákat használnak az üzemanyag-termelés további fokozására. Hogyan lehet a biomassza alapú üzemanyag-előállítási módszereket a nagyobb hatékonyság vagy termelékenység érdekében fejleszteni? Az egyik lehetőség a feldolgozási körülmények (hőmérséklet, pH, fizikai és kémiai paraméterek) módosítása vagy a szubsztrát fizikai és kémiai módszerekkel történő módosítása. Egy másik lehetőség a biomassza hasznosítására szolgáló újabb és specifikusabb enzimek keresése. A harmadik megközelítés a meglévő enzimek módosítása és hatékonyságuk növelése.

4. Anyag és módszer

4.1. A felhasznált szoftverek bemutatása

Ebben az alfejezetben röviden bemutatjuk azokat az alkalmazásokat, amelyek előállították a munka különböző fázisaihoz szükséges adatokat és modelleket. A QM adatok előállításával kezdődő, és egészen a MD szimulációk kiértékeléséig tartó folyamat egyes állomásait különböző szoftverek jelzik, amelyek számára mindig az előző programmal előállított adatok szolgálnak bemenetként, ezért ezen alkalmazásokat is a felhasználásuk sorrendjében tárgyaljuk, ugyanis a szoftverek ismerete egyúttal átláthatóvá teszi a munkafolyamat logikáját, és tisztázza a bemeneti adatok eredetét is.

Avogadro. Egyszerűen kezelhető modellező program, amely képes a kézzel rajzolt molekulák szerkezeti és energetikai optimalizálására. Az ATZ molekula 3D szerkezetének előállításához használtuk, amely aztán a Visual Molecular Dynamics-hez (VMD) került.

Visual Molecular Dynamics. A VMD egy molekuláris modellező és vizualizáló számítógépes program, amelyet elsősorban a MD szimulációk eredményeinek megtekintésére és elemzésére fejlesztettek ki. Tartalmaz továbbá eszközöket nukleinsav és fehérje szekvenciaadatokkal és tetszőleges grafikus objektumokkal való munkához.

Force Field Toolkit. A Force Field Toolkit (ffTK) a VMD-en belüli olyan bővítmény, amely segíti a felhasználókat a CHARMM-kompatibilis paraméterek, köztük töltések, kötések, szögek és torziós szögek megállapításában. Ezekhez az eszközökhöz a mellékelt grafikus felhasználói felületen keresztül lehet hozzáférni, ami nagyban leegyszerűsíti az alapul szolgáló számítások beállítását és elemzését. A beállított paraméterek QM szoftverhez kerülnek a kvantum adatok megállapításához, majd visszakerülnek a ffTK-hez, ahol egy végső optimalizáció során CHARMM36 erőterrel válnak kompatibilissé.

Gaussian 09. A Gaussian 09 (G09) elsősorban QM modellezésre használt szoftver, amely a ffTK-tal beállított adatok alapján megállapítja kvantum szinten a töltéseket, kötéseket, szögeket és torziós szögeket. Az adatokat végül a ffTK kompatibilissé teszi

a CHARMM36 erőtérrrel. Az adatok alkalmassá válnak MD szimulációkban való részvételre.

Nanoscale Molecular Dynamics. A Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) egy MD szimulációra szolgáló szoftver, amely a Charm++ párhuzamos programozási modell segítségével készült. Hatékony párhuzamosíthatóságáról ismert, és gyakran használják több millió atomot tartalmazó rendszerek szimulációjára. Grafikus felülettel nem rendelkezik, parancssorból indítható. Kimeneti fájllai a VMD-szel elemezhetők.

Docking Server & Autodock Tools. Fehérje-ligandum dokkolásra alkalmas szoftverek. A Docking Server csak online érhető el, egy központi szerveren fut, ezért a nagy számítású dokkolásokat is gyorsabban és precízebben végzi, mint egy hagyományos PC-n futó szoftver. A bemeneti struktúrák (enzim és ligand) a VMD-ből is származhatnak, kimeneti fájllai pedig szintén megjeleníthetők és elemezhetők a VMD-szel, valamint előkészíthetők MD szimulációra a NAMD-szal.

Az Autodock szintén egy dokkoló szoftver, azonban ezt nem használtuk. Ennek grafikus felülete az Autodock Tools, amelyet a Docking Server által generált adatok megjelenítéséhez használtunk.

4.2. Az atrazin paramétereinek kiszámítása

Az erőtér kiválasztása gyakran azon alapul, hogy az adott erőtér egyáltalán milyen molekulákat képes kezelni. A CHARMM erőtér nem tartalmazza azokat az adatokat, amelyeket additív módon alkalmazni tudnánk az ATZ molekulára, ezért az erőtér bővítése szükséges, hogy az új molekulát is kezelni tudja. Az optimalizálási eljárásnak meg kell egyeznie azzal, amit az adott erőtér (CHARMM) fejlesztéséhez használtak. A munka során ezt a standard eljárást alkalmaztuk (BECKER et al. 2001).

A paraméterezési munkafolyamat a következő lépéseket és számításokat tartalmazza: 1. Hiányzó LJ/vdW paraméterek hozzárendelése, 2. Geometria optimalizálása, 3. Víz kölcsönhatási energia számítása, 4. Töltések optimalizálása, 5. A potenciális energia második deriváltjának számítása, 6. Kötések és szögek optimalizálása, 7. Torziós vizsgálat, 8. Torziós szögek optimalizálása. Az ATZ paraméterezését a VMD (v1.9.3) szoftver Molefacture (v1.3) és fTK (v1.1) bővítményei, valamint a NAMD (v2.12) segítségével végeztük (HUMPHREY et al. 1996, PHILLIPS et al. 2005, MAYNE et al. 2013). Az fTK bemeneti QM adatait a G09 (Revision B.01) segítségével számoltuk ki (FRISCH et al. 2009). Az ATZ 3D

szerkezetét és a VMD-hez tartozó bemeneti fájlját az Avogadro (v1.1.1) programmal állítottuk elő (HANWELL et al. 2012). Az ATZ töltéseinek ábrázolását a VMD Tachyon Parallel/Multiprocessor Ray Tracer nevű bővítményével rendereltük (STONE 1998).

Hiányzó Lennard-Jones/van der Waals paraméterek hozzárendelése. A Molefactory segítségével a nem poláros hidrogének parciális töltéseit +0,09-re rögzítettük a CHARMM-erőtérrel való kompatibilitás érdekében. Erre azért van szükség, mert a CHARMM esetében a hidrogéneket nem mindig ábrázoljuk explicit módon, hanem inkább úgy kezeljük őket, mint a nem-hidrogénatom részét, amelyhez kovalensen kötődnek. Például egy metil-csoportot négy önálló atomként is lehet kezelni (egy szén és három hidrogén), vagy akár egyetlen atomként, a LJ/vdW paramétereket és töltéseket pedig a hidrogének kihagyásának figyelembevételével módosíthatjuk. Bár ez a megközelítés minden hidrogénre alkalmazható, jellemzően csak a nem poláros (alifás és aromás) hidrogénekre alkalmazzuk; a H-kötéses kölcsönhatások szempontjából fontos poláros hidrogének külön atomként vannak jelen a rendszerben.

A CHARMM36 teljes topológiájának és paraméterkészletének keresztellenőrzése után 6 kötés, 11 szög, 11 torziós szög és 3 LJ/vdW paraméter hiányzott. A redundáns adatokat nem vettük figyelembe. A LJ/vdW paramétereket analógia útján rendeltük hozzá, a referenciákat szintén a CHARMM36 topológiai és paraméteradataiból kaptuk.

Geometria optimalizálása. A G09 számításokat MP2/6-31G* elmélet-báziskészlet kombinációval végeztük.

Víz kölcsönhatási energia számítása. Az ATZ parciális töltéseinek meghatározásához szükséges a molekula vízkölcsönhatási helyeinek jellemzése kétdimenziós optimalizálással.

Minden parciálisan pozitív töltésű atom kölcsönhatásba léphet a víz oxigénjével, ezért azokat donornak, és minden parciálisan negatív töltésű atom kölcsönhatásba léphet a víz hidrogénjeivel, ezért azokat akceptornak határoztuk meg. Az egyetlen kivételt az etil-amin és az izopropil-csoportok sp^3 szénatomjai jelentik, ahol a vízmolekulák megközelítését a velük kötésben lévő hidrogének akadályozzák, ezért ezeket a csoportokat nem vettük be az optimalizálásba. A QM számításokat HF/6-31G* kombinációval végeztük.

Töltések optimalizálása. Az ATZ nettó töltését nullára állítottuk, és a nem poláris hidrogének rögzített töltéseit eltávolítottuk. Az optimalizálási rutint addig ismételtük, amíg két iterációs lépés nem mutatott különbséget, és a szerkezeti és a topológia fájlt (PSF, TOP) frissítettük a végleges töltések értékeivel.

A potenciális energia második deriváltjának számítása. A potenciális energia második deriváltjának számítása hatékony módszer a kötések és szögek mentén bekövetkező torzulásokhoz kapcsolódó potenciális energiafelület rekonstruálására.

A számítást az ATZ korábban már optimalizált geometriájára alkalmaztuk. Az MP2/6-31G* szinten végeztük el a frekvenciák számítását, a molekuláris szimmetria számításon belüli felhasználása nélkül.

Kötések és szögek optimalizálása. A Geometry Weight értéket 1,0-ról 2,0-ra állítottuk, az Angles-Eq. Deviation tőrésáthárát pedig 10,0-ról 5,0-ra csökkentettük. Az első módosítás nagyobb súlyozást jelent, amely ahhoz kapcsolódik, hogy a hagyományos mechanikával optimalizált geometria mennyire egyezik a QM-optimalizált geometriával. Az utóbbi érték határozza meg azt a küszöbértéket, amely alatt az eltérések már nem járulnak hozzá az objektív függvényhez. A túl szoros Eq. Deviation küszöbértékek általában nagy erőállandókat eredményeznek, így az észszerű küszöbértékek kritikusak a megfelelően közeli optimalizált geometriák elérése és a környező potenciális energiafelület reprodukálása közötti kölcsönhatás kiegyensúlyozásához. Az iterációkat NAMD-szal végeztük, amíg az értékek konvergáltak egy minimumhoz.

Torziós vizsgálat. Mivel a fTK kizárja a hidrogénekre végződő torziós szögeket, amikor az adatokat közvetlenül a készülőben lévő paraméterfájlból olvassa be, a korábban talált 11 torziós szöget kézzel adtuk hozzá. A szkennelési intervallumokat (+/-) 180°-ra, a lépésközt pedig 10°-ra állítottuk be, így összesen 22 szkennelést készítettünk elő a QM számításokhoz (MP2/6-31G*).

Torziós szögek optimalizálása. A paraméterezés utolsó fázisában a G09 által szolgáltatott adatokat a NAMD hagyományos mechanikai módszerével kell finomítani, hogy a QM profilhoz illeszkedjenek. A torziós szögek teljes leírásához gyakran több olyan kifejezésre van szükség, amelyek a megfelelő periodicitást (\mathbf{n}) és fáziseltolódást (σ) hordozzák egy erőállandó mellett (\mathbf{k}).

A bemeneti n és σ értékeket a CHARMM36 analóg torziós paramétereiből vettük. A finomítási algoritmust „downhill”-re, a toleranciaértéket pedig 0,0001-re állítottuk. A folyamatot addig iteráltuk, amíg a mechanikai profil kellően közel nem került a QM profilhoz.

4.3. Az atrazin és a lignin-peroxidáz interakcióinak vizsgálata

Az ATZ 3D modelljét és a szerkezet energiaminimalizálását az Avogadro programmal végeztük. A dokkolási eljárást a Docking Server webes alkalmazással végeztük (BIKÁDI és HAZAI 2009), az eredményeket pedig az Autodock Tools (v1.5.6) segítségével elemeztük (MORRIS et al. 2009). Az alkalmazott enzimszerkezetet az RCSB PDB adatbázisából (PDB: 1B82) nyertük 1,8 Ångström (Å, 10^{-10} m) felbontással. Az enzim *Phanerodontia chryso sporium* organizmusból származott és egy, a jelen munka szempontjából nem releváns R114A mutációt tartalmazott (BLODIG et al. 2001). A LiP MD szimulációit a NAMD szoftverrel végeztük el a CHARMM36 erőterrel. Az ATZ CHARMM-kompatibilis paramétereit a VMD szoftver fftk bővítményével és a G09 szoftverrel számoltuk ki a 4.2. fejezetben már ismertetett módon. A képek renderelése a Tachyon Parallel/Multiprocessor Ray Tracer és az Autodock Tools programokkal történt.

Előkészítés dokkolásra. A hisztidineket protonáltuk (HSD forma; hisztidin hidrogénnel a delta nitrogénnel), az enzimszerkezetet (hemmel és két Ca^{2+} ionnal) szolvatáltuk, a töltéseket semlegesítettük, és a NaCl koncentrációt 0,15 mol dm^{-3} -ra (fiziológiás érték) állítottuk be. Energiaminimalizálást 30 000 lépésig futtattunk Conjugate Gradients módszerrel. Ez a módszer lineáris (azaz $\mathbf{Ax} = \mathbf{b}$ alakú) egyenletrendszerek megoldására alkalmas; a kerekítési hibák miatt iterációs módszernek tekintendő. A hőmérsékletet 288 K, 298 K és 308 K értékre állítottuk be, hogy három különböző konformert hozzunk létre. Ezután MD szimulációt futtattunk minden egyes minimalizált szerkezeten 10 nanoszekundumig (ns, 10^{-9} s). A hidratált komplexek esetében jól használható izoterm-izobár NPT-sokaságot (állandó N részecskeszám, P nyomás és T hőmérséklet) alkalmaztunk periodikus peremfeltételekkel (Periodic Boundary Conditions), amelyek egy praktikusán végtelen nagy rendszert feltételeznek, hiszen az oldatban lévő makromolekula körül vákuum van, azonban az oldatot mint elemi cellát vesszük figyelembe, ezáltal mégis minimalizáljuk a felületi hatásokat, emellett részecskerácsos Ewald-elektrosztatikát (Particle Mesh Ewald Electrostatics) alkalmaztunk, 1 bar állandó nyomással.

Lehetőség van biológiai molekulák szimulációjának elvégzésére a kondenzált fázisban úgy, hogy a nem kötő kölcsönhatásokat gyakorlatilag mind meg lehet tartani. Régebben ugyanis az erőforrások megtakarítása érdekében a számításokban nem vették figyelembe a meghatározott távolságon túli atom-atom nem kötő kölcsönhatásokat; a Particle Mesh Ewald használata szükségtelenné teszi ezt az egyszerűsítést, azaz nincs távolság alapú csonkítás a nem-kötő kölcsönhatásoknál (DARDEN et al. 1993). A 10 ns hosszúságú szimulációk mindegyikéből 1-1 olyan szerkezetet választottunk ki, amelynek a ligandum hozzáférési csatornája nyitott állapotban van. Ezek a konformerek voltak a dokkolási eljárás bemeneti struktúrái.

Enzim-ligandum dokkolás. A dokkolás módszerével előre jelezhető egy adott molekula (ligandum) affinitása/orientációja egy másik (biopolimer) molekulához (LENGAUER és RAREY 1996). A pusztán geometriai komplementaritásra alapuló módszer esetén a ligandumot és a fehérjét az alak, felület, oldhatóság alapján értékelik, ezek alapján következtetnek, hogy a két struktúrát van-e értelme egymásra dokkolni, kompatibilisek-e egymással. A módszer ugyan meglehetősen gyors, de nem veszi figyelembe a komponensek dinamikus változásait, a konformáció változásának hatásait a kötődésre. A konkrét szimuláció esetén a fehérje és a ligandum el vannak szeparálva egymástól, a dokkolás indítása után a ligandumnak meg kell találnia az ideális konformációs állapotot a célszekvencián belül. Minden konformációs változás után a szoftver kiszámolja az aktuális állapot energiáját. A módszer jóval számításigényesebb, de ez a megközelítés kevésbé absztrakt, mint a geometriai alapú (SHOICHET et al. 1992).

A dokkoláshoz a LiP-nak csak az „A” alegységét használtuk (a két alegység azonos) oldószer nélkül. A szimulációs doboz (Simulation Box) középpontja a His82 aminosav volt, amely a ligandum hozzáférési csatornájának bejárata, és a doboz méretét 20 20 20 Å-re állítottuk be. A LiP és az ATZ parciális atomtöltéseit a hagyományos Gasteiger-módszerrel számoltuk ki, amely az atomok elektronegativitását veszi figyelembe (GASTEIGER és MARSILI 1978). Minden LiP konformer esetében a teljes dokkolási folyamat 255 dokkolási pályát tartalmazott. A folyamat során a LiP szerkezete merev maradt, csak az ATZ volt rugalmas, ezért volt szükséges korábban egy nyitott állapotú ligandum csatornát tartalmazó konformer kiválasztása.

Molekuladinamikai finomítás és energetikai kiértékelés. A legnagyobb frekvencia értékkel rendelkező dokkolási eredményt választottuk ki, majd az ATZ-LiP komplexet szolvatáltuk és minimalizáltuk azonos körülmények között. A komplexet 5 ns hosszúságú MD szimulációval finomítottuk, ugyanazzal a hőmérsékleti értékkel és beállításokkal, amelyeket az adott konformer létrehozása során használtunk, hogy tanulmányozzuk a stabilitását. A kötési szabadenergiákat szolvatált fázisban a NAMD Energy bővítmény segítségével számoltuk ki. A kötési szabadenergiák a vdW, elektrosztatikus, poláris és nem poláris tagokból tevődnek össze. Végül az 5 ns-os finomítás mellett egy 100 ns hosszú MD szimulációt is végeztünk a kanonikus NVT-sokasággal (állandó N részecskeszám, V térfogat és T hőmérséklet), hogy némileg több információt gyűjtsünk az ATZ viselkedéséről nagyobb időskálán (ECKER és FÜLÖP 2018). A NVT-t csak egyfajta durva és gyors szimuláció céljából alkalmaztuk; nem igazán elterjedt, mivel nem teszi lehetővé a rendszer számára a megfelelő relaxációt, és nem reprezentál kísérleti körülményeket. Mivel az NPT-sokasággal végzett 5 ns-os szimuláció ekkorra már tisztázta, hogy az ATZ hogyan viselkedik az enzim ligandum csatornájában, ezért ezt a 100 ns-os NVT szimulációt már csak egy gyorsabb (bba)n lefuttatható és könnyen kiértékelhető megerősítésnek szántuk.

4.4. Biopolimerázok modellezése

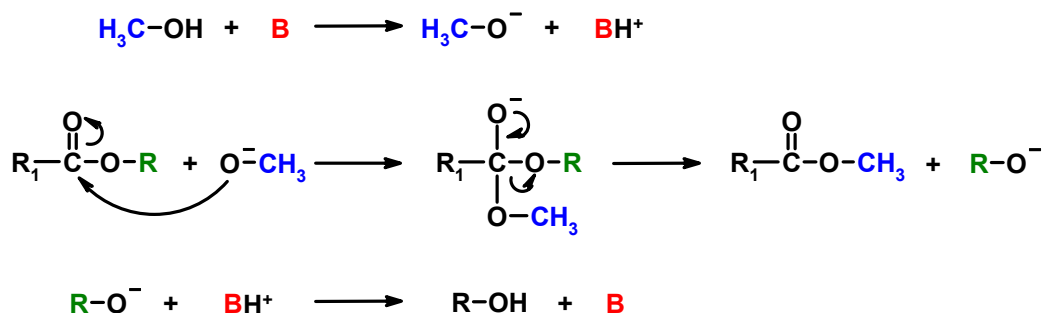
Az adatbázisokban való kereséshez a következő keresőszavakat használtuk: *polysaccharides, cellulose hemicellulose lignin biodegradation, modification, immobilization, industry, O-glucosyl hydrolase, cellulase enzyme modeling, molecular modeling, computation, cellulase modification, cellulose enzyme modification modeling*. A keresést OR (VAGY) és AND (ÉS) kifejezésekkel kombináltuk. A kereséseket 2020-ig végeztük. A cikkeket és az azokban szereplő hivatkozásokat is áttekintettük. A fent kiemelt problémakör szempontjából érdekesnek talált cikkeket a következő kategóriákba soroltuk: *Poliszacharidok biológiai lebontása; Szubsztrátok mechanikai és fizikai-kémiai módosítása; Cellulóz, hemicellulóz, lignin módosítása; Enzimek módosítása; Enzimek immobilizálása; Enzimek molekuláris modellezése*. Ezekből a cikkekből állítottuk össze tanulmányunkat (FÜLÖP és ECKER 2020), hogy megvizsgáljuk az extracelluláris enzimek modellalapú módosításának és a racionális tervezésük alkalmazásának elterjedtségét a hagyományos módszerekkel szemben.

A tanulmányban szereplő adatok alapján az alábbi enzim-ligandum dokkolásokat végeztük el azon célból, hogy eredményeik alapján felvázolhassuk az extracelluláris

enzimekkel kapcsolatos kutatások további lehetőségeit: egy korábban már tanulmányozott (FÜLÖP et al. 1996, FÜLÖP és PONYI 1997) *Cellulomonas* sp. CelB7 celluláz katalitikus doménjére dokkoltunk külön-külön egy cellulóz és egy lignin részletet, egy xylanáz (PDB: 1J01) (WILLIAMS et al. 2000) katalitikus doménjére külön-külön egy xylán és egy lignin részletet, egy mannanáz (PDB: 2X2Y) (HEKMAT et al. 2010) aktív centrumára külön-külön egy mannan és egy lignin részletet, valamint az ATZ-nal kapcsolatos munkában már használt LiP-ra (PDB: 1B82) (BLODIG et al. 2001) külön-külön egy lignin és egy celluláz részletet. A dokkolások során az enzim mindkét alegysége jelen volt. A dokkolásokat a Patch Dock programmal végeztük el (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al. 2005).

4.5. Modellezés a bioüzemanyagok előállításában

Szemléltetésképpen elkészítettük a 11. ábrán látható átészteresítéssel reakció energiainimalizációval nyert modelljét. Van perspektíva azon megközelítésben, hogy bioüzemanyagokat részben vagy egészben olyan enzimekkel állítsunk elő, amelyeket előzetesen molekulamodellezéssel optimalizáltunk, majd csak ezután szintetizáltunk.



11. ábra. A metanolízis reakció mechanizmusa. A katalizátor által az alkoholból képzett alkoxidion nukleofil szubsztitúcióval kapcsolódik az észter karbonil-csoportjához. A tetraédres köztitermék átrendeződéséből metil-észter és a megfelelő anion keletkezik.

5. Eredmények és azok megbeszélése

5.1. Az atrazin CHARMM36-kompatibilis paraméterei

A MD számítások során a CHARMM36 erőter által beolvasott konkrét paramétereket négy fájl tartalmazza: PDB (atrazin.pdb), szerkezet (atrazin.psf), topológia (atrazin.top) és CHARMM36-kompatibilis paraméter fájl (par_charmm36_atrazine.par). Ezeket a fájlokat szabadon elérhetővé tettük (ECKER 2016) és a tartalmuk elérhető az M4-M7. mellékletekben.

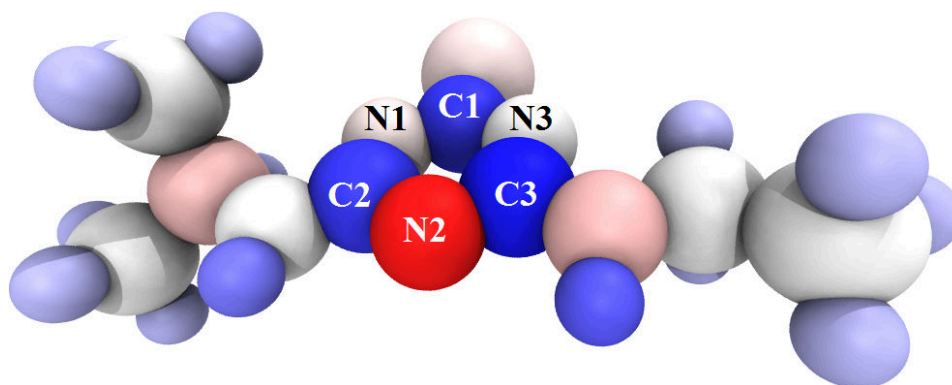
Hiányzó Lennard-Jones/van der Waals paraméterek hozzárendelése. A paraméterek keresztellenőrzése során 3 LJ/vdW paraméter hiányzott: egy C2 (sp²-hibridállapotú szén), C3 (sp³-hibridállapotú szén) és egy Npl (sp²-hibridállapotú nitrogén három másik atomhoz kötődve, formálisan semleges) típust. A hozzárendelt paramétereket (1. táblázat) a CHARMM36 erőter topológiai és paraméteradataiból nyertük.

1. táblázat. Az atrazin hiányzó Lennard-Jones/van der Waals paramétereinek hozzárendelése. Az ϵ érték a potenciálgödör mélysége kcal mol⁻¹-ban, R_{\min} pedig az a távolság, ahol a potenciál eléri a minimumot Å-ban. Az 1-4 kölcsönhatások a végatomok között értendők, amelyek részt vesznek egy-egy torziós szög kialakításában (lásd Lennard-Jones-potenciál).

Típus	ϵ	$R_{\min}/2$	$\epsilon, 1-4$	$R_{\min}/2, 1-4$
C2	-0,04	2,1		
C3	-0,078	2,04	-0,01	1,9
Npl	-0,07	1,98		

A C2 típust 2 vagy 3 nitrogén között elhelyezkedő 6 tagú gyűrűben lévő aromás szénnek, az egyikhez kétszeres kötéssel kötődve; a C3 típust sp³-hibridállapotú szénnek, az Npl típust pedig semleges nitrogénnek jelöltük, az ATZ-t aromás aminnak tekintve.

Töltések optimalizálása. Az ATZ atomjai töltéseinek értékei megtalálhatók a PSF fájlban, valamint az M5. mellékletben, és vizuálisan is hangsúlyozza őket a 12. ábra. Az 1,3,5-triazin gyűrű szénatomjai és N2-je rendelkeznek a legnagyobb abszolút értékű töltésekkel (2. táblázat).



12. ábra. Az atrazin atomjainak parciális töltései. A színek intenzitása az atomok töltéseinek abszolút értékével arányos. A pozitív töltések kék, a negatív töltések piros színűek. Az 1,3,5-triazin gyűrű atomjait szimbólumaik és számaik is jelölik.

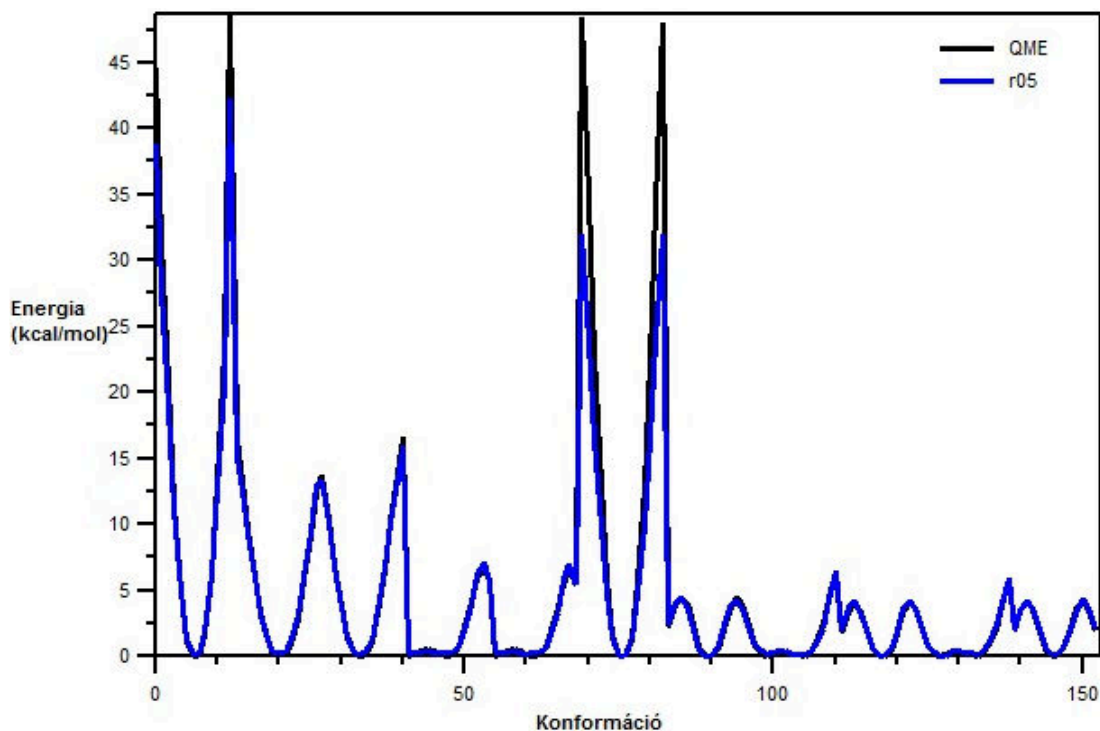
2. táblázat. Az atrazin parciális töltéseinek értékei. Az 1,3,5-triazin gyűrű szénatomjai és N2-je rendelkeznek a legnagyobb abszolút értékű töltésekkel.

Atom	Töltés
C1	0,405
N1	-0,244
C2	0,401
N2	-0,759
C3	0,483
N3	-0,190

Ha megállapítjuk az ATZ s-triazin gyűrűjének parciális töltéseit egy polimerek modellezésére már nem alkalmas erőterrel pl. MMFF94 (HALGREN 1996 a, b, c, d, e) vagy MMFF94s (HALGREN 1999), akkor szimmetrikus töltéseloszlást kapunk, és egy nagyon kicsi pozitív töltéserőteret, ha összeadjuk a gyűrű atomjainak töltését, ugyanis ezek a programok egy egyszerűbb matematikai modellel dolgoznak. Ennél az ATZ modellnél is egy nagyon kicsit pozitív töltést mutat a gyűrű (0,096), de az atomok közötti töltéskülönbségek nem olyan szimmetrikusak. Az egyszerűbb erőterek és szoftverek ezeket a különbségeket nem is veszik figyelembe, egyszerűen kiátlagolják őket, ez viszont ronthatja az adott mérés pontosságát, mert az atomi szintű kölcsönhatásokat torzítja.

Torziós szögek optimalizálása. Az átlagos négyzetes eltérés gyöke (Root Mean Square Deviation, RMSD; a variancia négyzetgyöke) értéke az első optimalizálás után 0,446; a végső (5.) optimalizálás után pedig 0,225 volt. Az RMSD a modell által

megjósolt értékek és a megfigyelt értékek közötti különbségek gyakran használt mérőszáma; az előre jelzett és megfigyelt értékek közötti különbségek második mintavételi pontjának négyzetgyökét vagy e különbségek négyzetes átlagát jelenti. A végső finomítás eredménydiagramja (13. ábra) megfelelő illeszkedést mutat a QM céladatokhoz.



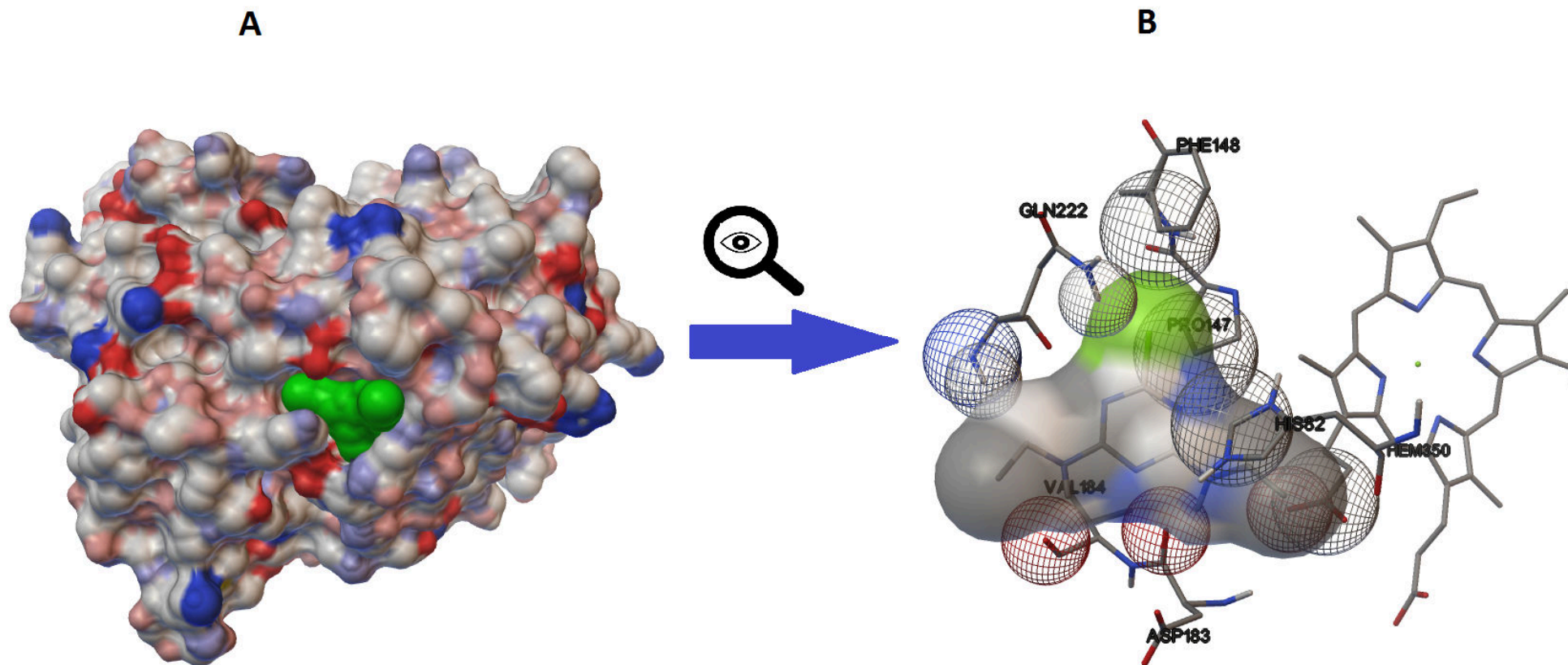
13. ábra. Az atrazin torziós szögeinek végleges illesztési adatai. A végső finomítás eredménye (**r05**, kék) jó illeszkedést mutat a kvantumkémiai céladatok profiljához (**QME**, fekete), de két maximum esetében az illeszkedés nem tökéletes. A tökéletlenség oka nem határozható meg, de hatása elhanyagolható: a két konformer energiataralma a molekuladinamikai szimulációk során valamivel alacsonyabb lesz, mintha az illesztés tökéletes lenne.

5.2. Az atrazin – lignin-peroxidáz komplex dinamikája

Az enzim-ligandum dokkolás értékelése. A három ATZ-LiP komplex energetikai adatait a 3. táblázat foglalja össze. A negatív értékek olyan energiafelszabadulást jeleznek, amely termodinamikailag kedvező abban az értelemben, hogy az ATZ beépül a His82 környezetébe (14. ábra). Minden konformer esetében az ATZ kötődése a LiP célhelyéhez termodinamikailag kedvező, de a gyakorisági érték csak 16% és 10% 288 K, illetve 308 K hőmérsékleten. Ezen komplexek kialakulásának a valószínűsége tehát alacsony. (A termodinamikailag kedvezőtlen adatokhoz automatikusan alacsony frekvenciaértékeket rendel a Docking Server.)

3. táblázat. Az atrazin – lignin-peroxidáz dokkolási eredmény legjobb helyezést elért adatainak összefoglalása. A hőmérsékleteket Kelvinben, az energiákat kcal mol⁻¹-ben adtuk meg. A frekvencia az azonos geometriát eredményező dokkolások aránya, és az adott eredmény valószínűségének tekintendő. A nagyobb frekvencia megbízhatóbb eredményt jelent, és specifikusabb kötődésre utal.

Hőmérséklet	Kötési szabadenergia	vdW+H-kötés+oldáshő	Elektrosztatikus energia	Teljes intermolekuláris energia	Frekvencia	Interakciós felület
288	-5,55	-6,30	+0,02	-6,29	16%	552,103
298	-5,54	-6,07	-0,05	-6,12	53%	575,72
308	-5,40	-5,93	-0,03	-5,96	10%	541,415



14. ábra. A [298 K] atrazin – lignin-peroxidáz komplex szerkezete a dokkolási eljárás után. A komplexet (A) a komponensek molekuláris felülete szemlélteti. A lignin-peroxidáz aminosavak parciális töltései pirossal (negatív) és késsel (pozitív), a beépült atrazin zölddel van kiemelve. A kölcsönhatásba lépő oldalláncokat (B) pálcikamodellek ábrázolják; Wireframe ábrázolásmódú gömbök jelölik a kölcsönhatásban részt vevő aminosavak atomjait. A gömbök méretét az olvasó szemétől való távolságuk határozza meg.

A 298 K-en létrehozott LiP konformer esetében a frekvencia 53%, ezért ez volt az 5 ns-os finomítási folyamat bemeneti szerkezete, a komplex stabilitásának és az ATZ kölcsönhatásának tanulmányozására a ligandum csatorna aminosavaival.

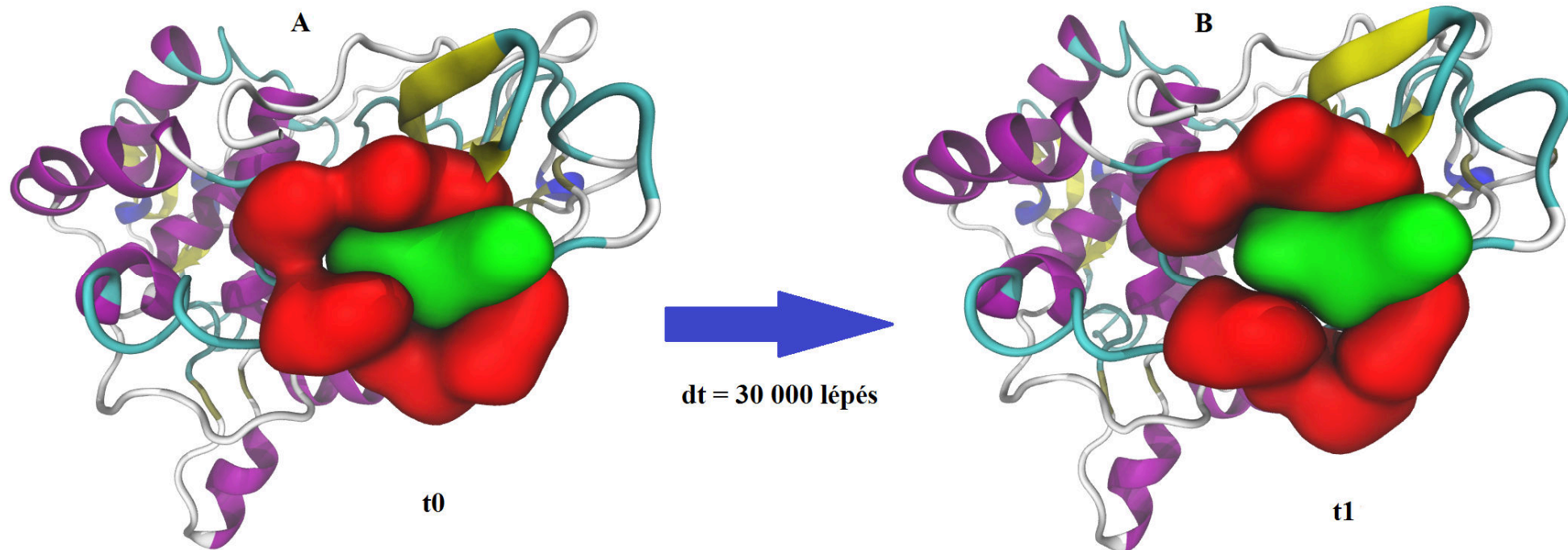
Az ATZ és a LiP kölcsönható oldalláncainak aminosavai közötti fehérje-ligandum kölcsönhatások a következő kategóriákba sorolhatók: H-kötés, poláros, hidrofób és egyéb (4. táblázat).

4. táblázat. Az [298 K] atrazin – lignin-peroxidáz komplex dokkolásának kölcsönhatási energiái kcal mol⁻¹-ben. ^aAz aminosav a ligandum hozzáférési csatorna része. ^bA kölcsönhatások típusa nem meghatározható.

H-kötések	Poláros	Hidrofób	Egyéb ^b
GLN222 ^a (-1,1768)	HIS82 ^a (-0,6902)	PRO147 (-0,7052)	ASN221 (-0,8759)
VAL184 ^a (-1,1032)		ILE85 ^a (-0,1785)	PHE148 ^a (-0,2982)
ASP183 ^a (1,8798)			

Az Asp183 C α karbonil-csoportja H-kötéseken keresztül érintkezik az ATZ izopropilamin nitrogénjével. A C α karbonil-csoport oxigénje és az s-triazin gyűrű 1-es számú nitrogénje között is van egy meghatározatlan kapcsolat. E két atom közötti távolság mindössze 2,68 Å. Mivel a nitrogén és az oxigén között nincs közvetlen kapcsolat, és mindkét atom negatív parciális atomtöltéssel rendelkezik, ezért ez az állapot energetikailag kedvezőtlen, és egy teljesen dinamikus rendszerben nem maradhat fenn.

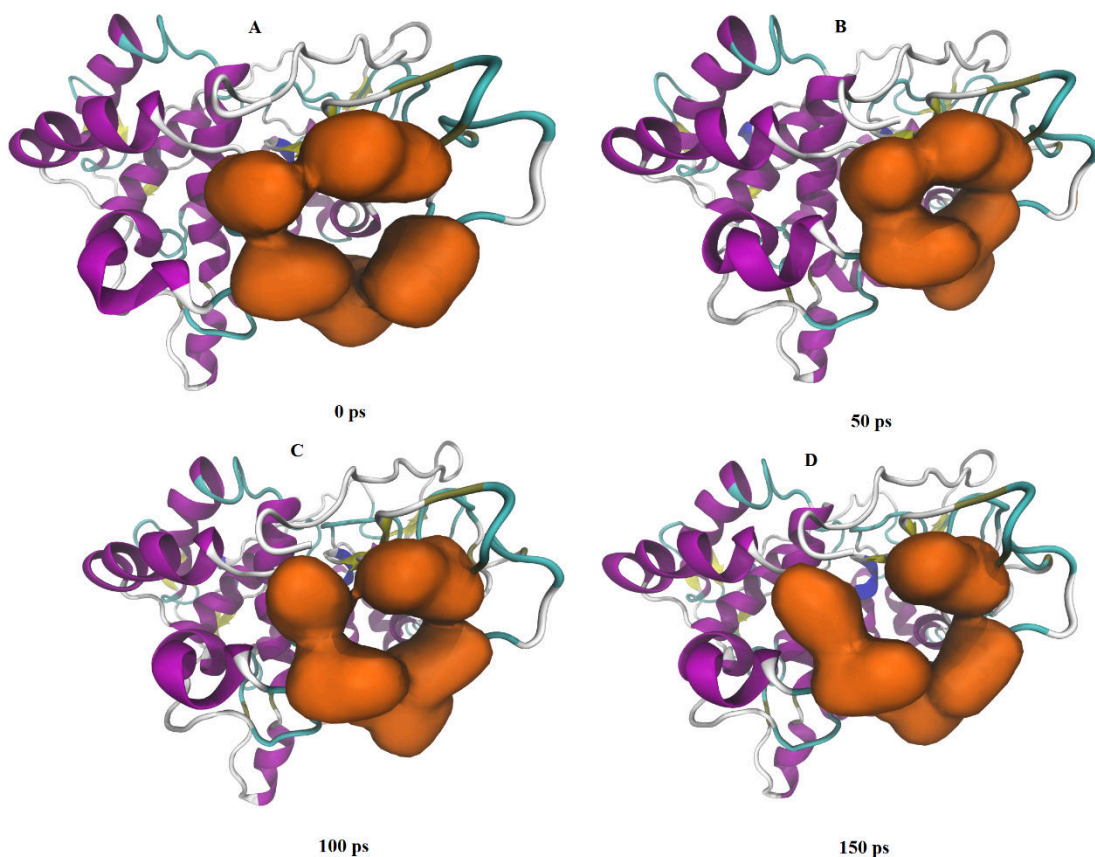
A dokkolási komplex szerkezeti stabilitása. A ligandum csatorna aminosavak C α RMSD értékei és az ATZ minimalizálása azt mutatta, hogy a kiindulási szerkezet – a [298 K] dokkolási komplex – nem volt optimális állapotban. A 30 000 lépés elegendő volt ahhoz, hogy a komplex elérje a relaxált állapotot. A minimális RMSD érték 0,040 Å volt, a maximális érték 1,490 Å. A rendszer 29,55 pikoszekundum (ps, 10⁻¹² s) alatt érte el a maximális értéket, és körülbelül 20 ps után a rendszer már relaxált állapotban volt. Mivel a LiP teljesen rigid volt a dokkolási eljárás során, a dokkolás és a minimalizált komplex közötti szerkezeti különbség (15. ábra) azt jelzi, hogy egy teljesen dinamikus rendszerben a **t0** állapot kedvezőtlen. A **t1** állapot egy relaxált állapot, de mivel a **t1** komplex az energiaminimalizálás eredménye, ahol az atomok nem rendelkeznek kinetikus energiával, a következtetéseket csak a MD által kapott eredményekből lehet levonni.



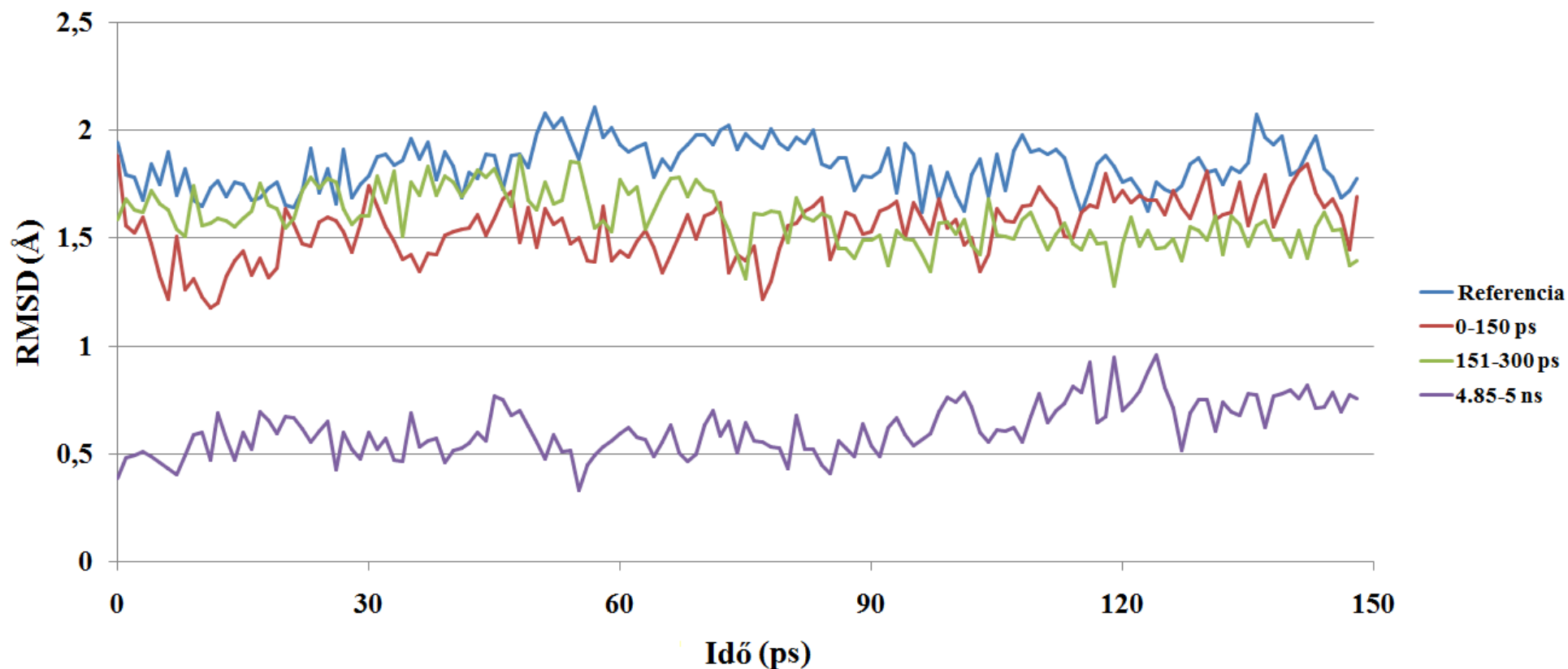
15. ábra. A [298 K] komplex dokkolás utáni állapota (A) és szerkezete 30 000 lépéses energiainimalizálás után, oldószer nélkül (B). A ligandum csatorna és az atrazint alkotó aminosavak Quick Surf ábrázolással piros és zöld színnel vannak kiemelve. Az enzim többi része New Cartoon ábrázolással és a másodlagos szerkezetet hangsúlyozó színezéssel van kiemelve. Az α -héliceket lila színnel, a β -lemezeket sárgával, a 3-10 héliceket késsel, a kanyarokat (turn) ciánkékkel, a csavarokat (coil) pedig fehérrel színeztük. A ligandum csatorna aminosavak atrazinnal alkotott komplexének felbontását szándékosan csökkentettük, hogy hangsúlyozzuk a **t0** és **t1** állapotok közötti szerkezeti különbséget, és az aminosavakat az áttekinthetőség érdekében nem jelöltük.

A ligandum csatorna viselkedése atrazin jelenlétében. A LiP ligandum csatorna aminosavainak fluktuációja és deformációja vizes oldatban egy ismert jelenség, amelyet Gerini és munkatársai (2003) írtak le. A csatorna a kristályszerkezethez képest figyelemre méltó torzulásokat mutat még egy 150 ps hosszú MD szimuláció során is (16. ábra). A ligandum csatorna aminosavainak ilyen gyors konformációs változásai jellemzőek a LiP-re, amikor a csatorna környezetében nincs jelen potenciális szubsztrát vagy egyéb, kisméretű molekula. Bizonyos molekulák jelenlétében (pl. veratril-alkohol, amely a LiP enzim természetes szubsztrátja) a megfigyelt jelenségek a ligandum és a ligandum csatorna aminosavak között kialakult különböző kölcsönhatásoknak megfelelően eltérőek lehetnek (GERINI et al. 2003).

Az ATZ jelenlétében a csatorna fluktuációja rövid idő alatt csökken, és a finomító (5 ns) MD szimuláció utolsó 150 ps-ja jelentősen alacsonyabb RMSD-értékeket mutat a különböző időskálákból származó adatokhoz képest (17. ábra).

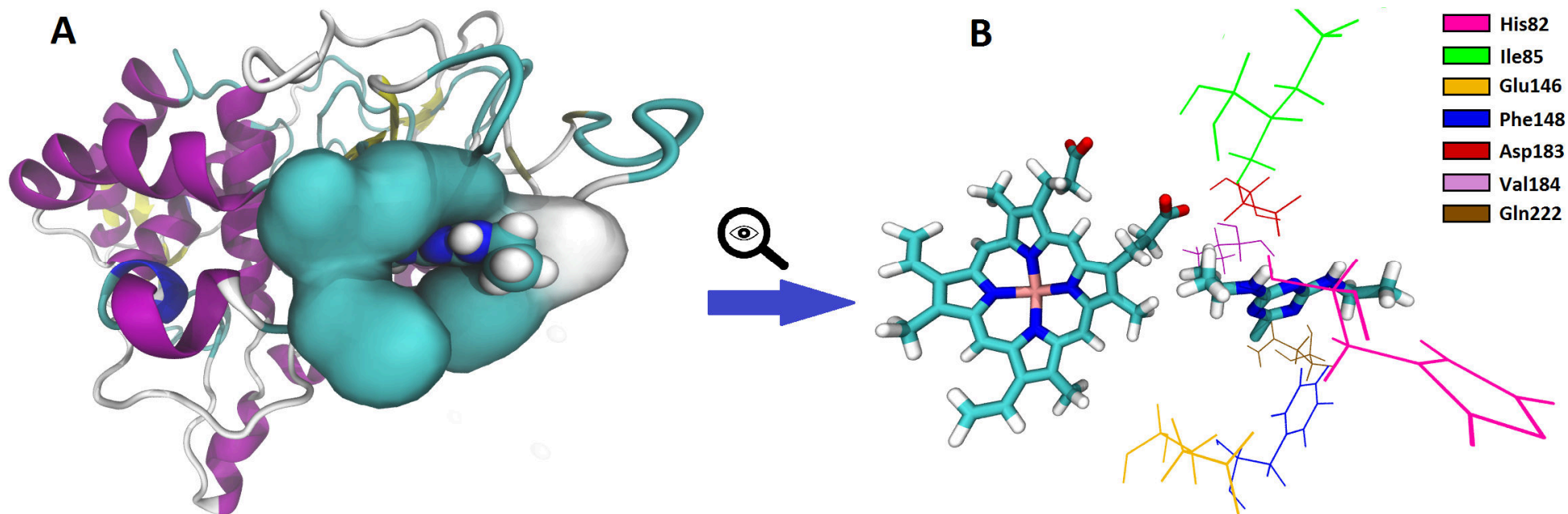


16. ábra. A lignin-peroxidáz ligandum csatorna aminosavainak szerkezeti változásai egy 150 ps hosszú molekuladinamikai szimuláció során. A kiindulási pont (**A**) az enzim szolvatált és minimalizált kristályszerkezete. A szerkezeti különbség 50 ps után látható (**B**); az aminosavak közelebb kerültek egymáshoz, de 150 ps után (**D**) a csatorna állapota a kiindulási szerkezethez hasonló. Az **A** és **B** között végbemenő változás egy zárószekvencia kezdeteként értelmezhető, a **C-D** állapotok pedig a folyamatos nyitószekvencia pillanatai. A csatornát alkotó aminosavak sötét narancssárga színnel, Quick Surf ábrázolással láthatóak. A felbontásukat szándékosan csökkentettük, hogy hangsúlyozzuk a konformációs változásokat a négy állapot között.



17. ábra. A ligandum-csatorna fluktuációja atrazin jelenlétében különböző időskálákon. A referencia (kék) a lignin-peroxidáz 150 ps hosszúságú molekuladinamikai szimulációja volt atrazin nélkül. Az ingadozás egyértelműen kimutatható volt a 150 ps-os szimuláció során. A másik szerkezet, amely atrazin tartalmú volt, már az első 150 ps alatt is kevésbé jelentős fluktuációt mutat, és csak enyhe fluktuációt az 5 ns szimuláció hátralévő részében. A 0-150 (piros) és a 151-300 (zöld) ps intervallumokban csak minimálisan csökkent a csatorna fluktuációja. A folyamat utolsó 4,85-5 ns (lila) jelentősen alacsonyabb értékei azonban egyértelműen jelzik, hogy atrazin jelenlétében az aminosavak fluktuációja kis szerkezeti különbségekkel változik az állapotok között.

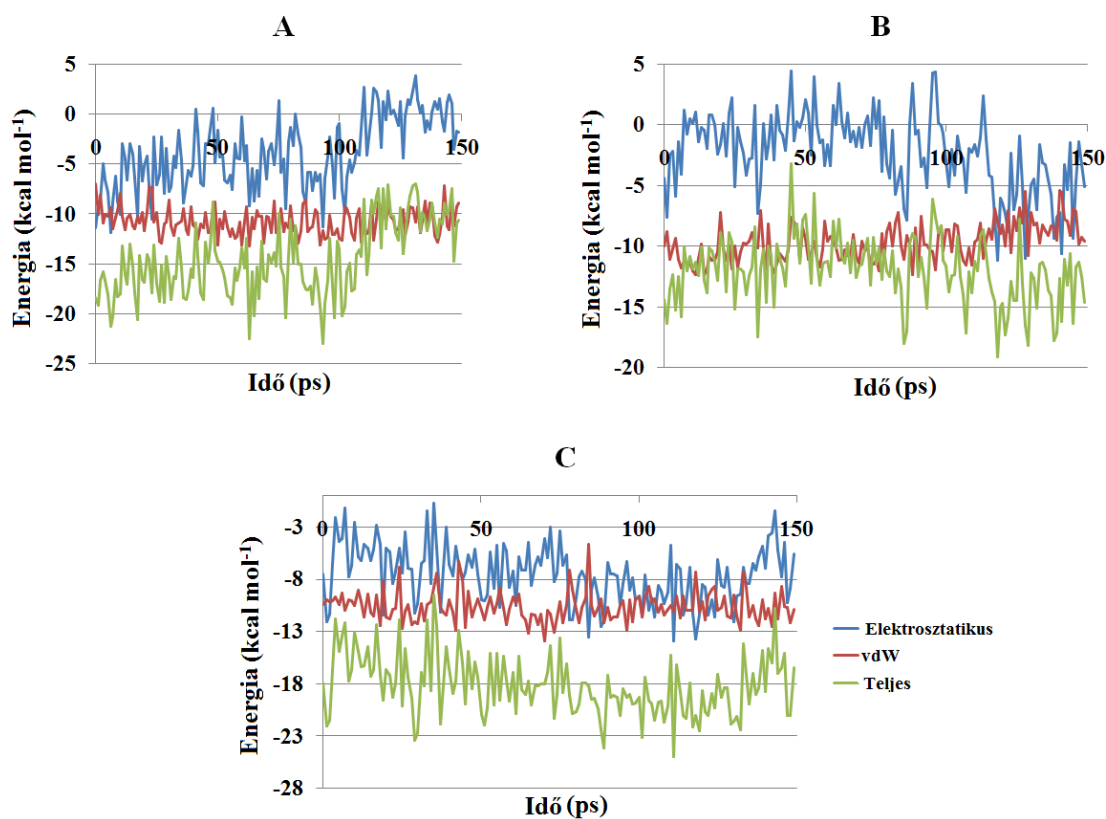
Mivel a ligandum csatorna aminosavainak gyors konformációs változásai ATZ hiányában egyértelműen kimutathatók voltak (16. ábra), az ATZ nélküli MD szimuláció első 150 ps-át használtuk referenciaként. Az ATZ jelenlétében a finomítás első 150 ps-a kevés különbséget mutat, és a 151-300 ps intervallum értékei a teljes tartományban egyértelműen alacsonyabbak a referenciánál. Körülbelül 80 ps után ezek a változások többnyire az első 150 ps értékei alatt maradnak (M2. melléklet). Az ATZ-LiP komplex végállapotának vizualizációja (18. ábra) megerősíti, hogy az ATZ molekula nem jut el a csatornán keresztül a hemet tartalmazó aktív centrumba, mert a ligandumot az enyhén fluktuáló ligandum csatorna aminosavai veszik körül (18.A ábra). Ez az aktív centrumnak a ligandumtól való szterikus akadályozását okozza. A ligandum csatorna aminosavak zsugorodása rövid idő alatt (ps skálán) következik be ATZ jelenlétében, és ez az enyhe fluktuáció 4-5 ns alatt stabilan fennmarad. Az ATZ és a hem váz relatív helyzete (18.B ábra) azt mutatja, hogy csak az ATZ hidrofób izopropil-amin csoportja és a hem néhány oldallánca orientálódik egymás felé.



18. ábra. A [298 K] atrazin – lignin-peroxidáz komplex végső állapota az 5 ns-os, finomító szimuláció után. **(A)** Az atrazin stabilan integrálódik a ligandum csatorna aminosavai közé, ezért nem tud átjutni a csatornán. A csatornát alkotó aminosavak Quick Surf ábrázolással vannak kiemelve. A ligandum csatorna aminosavak felbontását szándékosan csökkentettük, hogy kiemeljük a ligandum pozícióját az aminosavak között. **(B)** Az atrazin izopropil-amin oldallánca a ligandum egyetlen olyan csoportja, amely átjut a csatornán, így az atrazin nem tud kölcsönhatásba lépni a hem vázzal. Az atrazin és a hem Licorice ábrázolásban láthatóak. A színezés az atomtípusok alapján történt. A hét, csatornát alkotó aminosavat színes vonalakkal ábrázoltuk.

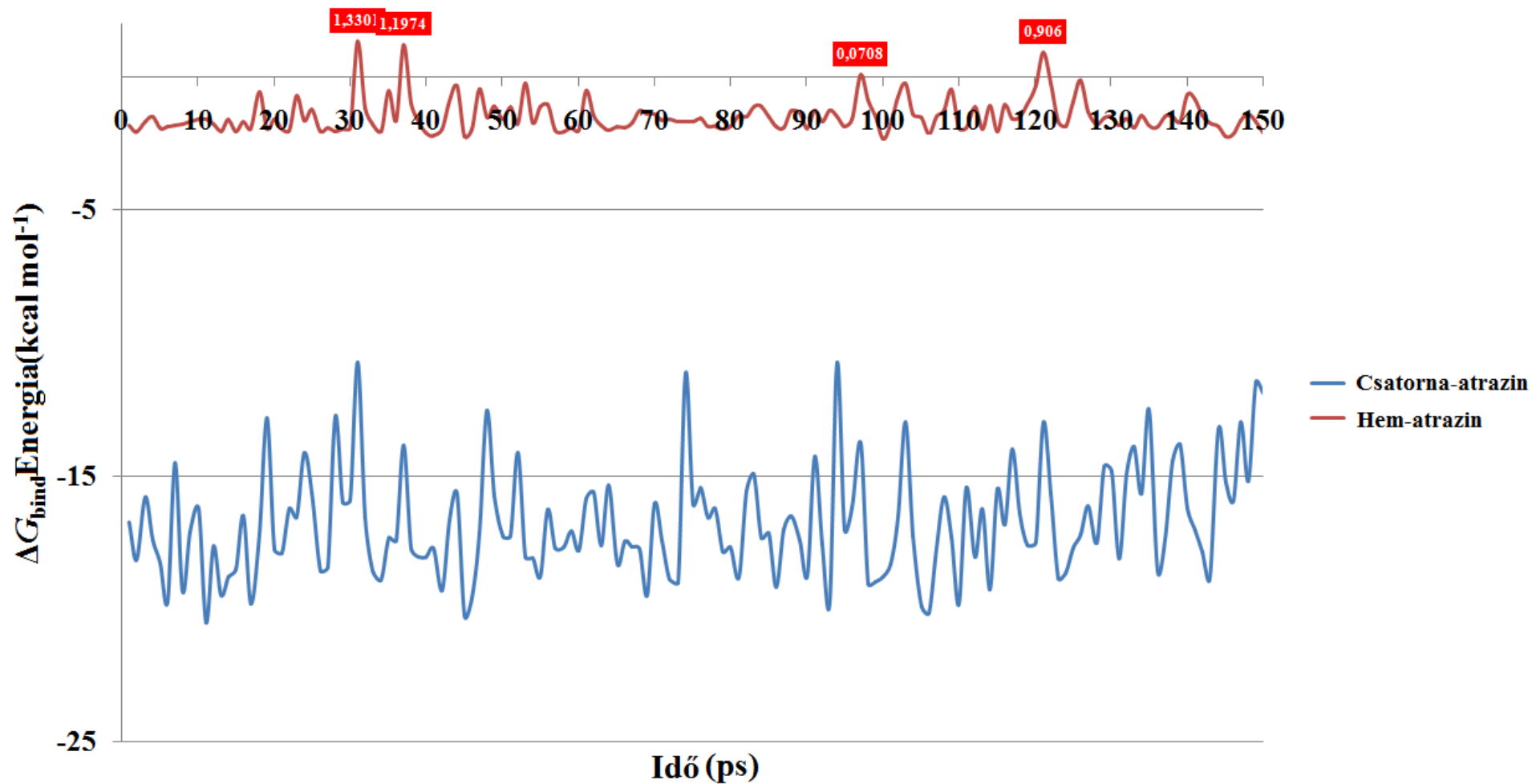
A szubsztrátok a LiP felszíni Trp171 aminosavának közvetítésével történő elektronátvitel útján oxidálódhatnak, amely hipotézis azon a megfigyelésen alapul, hogy ezen aminosav mutációja a veratril-alkohol oxidációjával szembeni enzimikus aktivitás elvesztéséhez vezetett. A mutánsok azonban továbbra is képesek voltak két olyan szubsztrát, a 2,2'-azinobisz(3-etil-benzotiazol-6-szulfonát) és a 4-[(3,5-difluor-4-hidroxifenil)azo]benzol-szulfonsav oxidációjára, amelyek a veratril-alkoholhoz képest alacsonyabb redoxpotenciállal rendelkeztek, ahogyan az ATZ is (CHOINOWSKI et al. 1999, BLODIG et al. 2001, GERINI et al. 2003). A Trp171 hiányában a LiP még mindig képes katalizálni a reakciókat, de a ligandum csatornán keresztül a hem pereme és a ligandum közötti közvetlen kapcsolat elengedhetetlen. A Trp171 pontos funkciója nem teljesen tisztázott, mivel ez az enzim rigid területe, és a W171A mutáció nem okoz releváns szerkezeti változást (GERINI et al. 2003). Merev karaktere alapján nem valószínű, hogy a Trp171-es terület kompetitív ligandum csatornaként működhet.

Az energiaadatok (19. ábra) azt sugallják, hogy a ligandum csatorna aminosavainak csökkent fluktuációja ATZ jelenlétében a kedvező kölcsönhatásoknak és az aminosavak és a ligandum közötti stabil kontaktusnak köszönhető. Az 5 ns hosszú szimuláció utolsó 150 ps-ának energiaeredményei azt mutatják, hogy a komplex egyensúlyi állapotban van, ugyanis az energiaértékek a teljes tartományban negatívak (M3. melléklet).



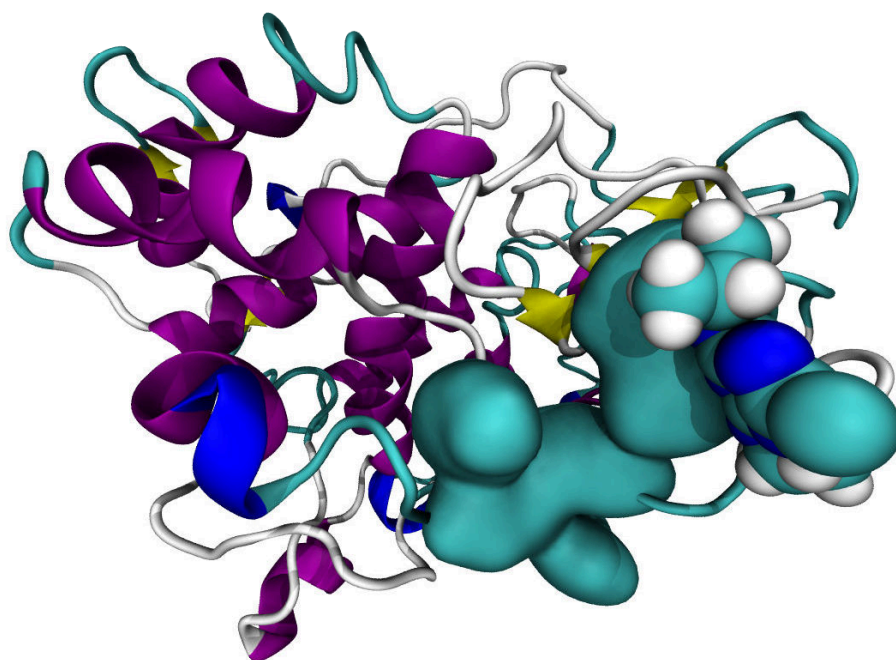
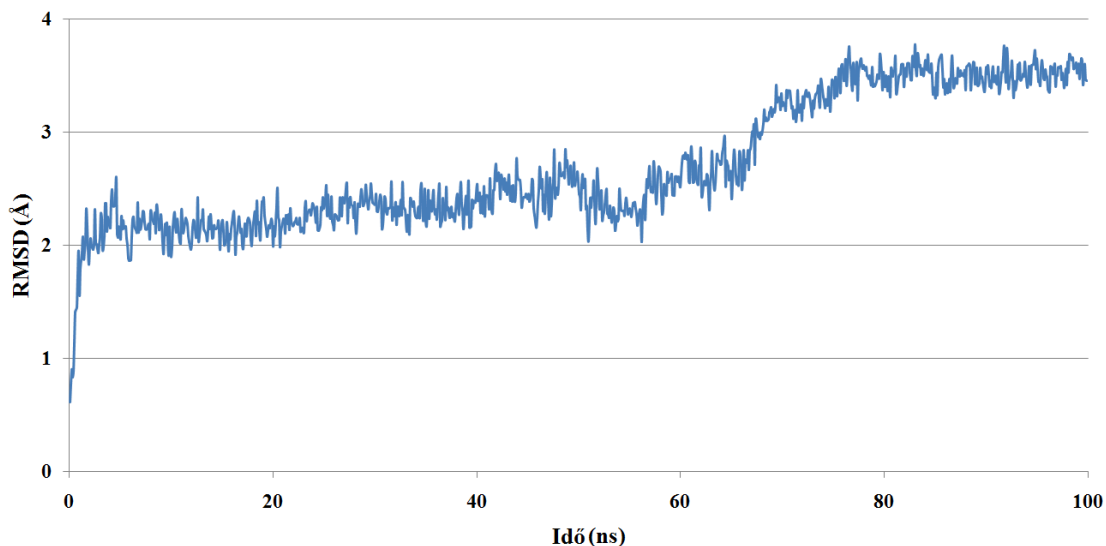
19. ábra. A ligandum csatorna aminosavak atrazinnal alkotott komplexének nem kötő kölcsönhatásainak energiatartalma (kcal mol⁻¹) különböző időskálákon. Az elektrosztatikus (kék) és van der Waals (piros) energiák összege jelenti a komplex teljes nem kötő energiáját (zöld). Látható, hogy közvetlenül a minimalizálás után a 0-150 és 150-300 ps intervallumokban (**A**, **B**) a rendszer magasabb energiatartalommal rendelkezik, az 5 ns-os szimuláció utolsó 150 ps-a (**C**) azt mutatja, hogy a rendszer stabil, egyensúlyi állapotba került.

A számított kötési szabadenergiák (ΔG_{bind}) megerősítik, hogy az ATZ képes beépülni a ligandum csatorna környezetébe, azonban a MD utolsó 150 ps-ában a kötési szabadenergiák lassan emelkedő tendenciája figyelhető meg. Emellett az ATZ és a hem váz között a ΔG_{bind} bizonyos időpontokban pozitív értéket mutat; ezek az eredmények energetikailag kedvezőtlen és átmeneti kapcsolatra utalnak (20. ábra).



20. ábra. Az atrazin és a ligandum csatorna (kék) aminosavai közötti kötődés energetikailag kedvező. Az atrazin-hem kötési szabadenergiák (piros) számítása révén több pozitív értéket is kimutattunk (az értékek ábrázolva), ami kedvezőtlen, átmeneti kapcsolatra utal.

A további, 100 ns hosszú MD szimuláció azt mutatja, hogy 5,6-5,7 ns után az ATZ és a ligandum csatorna közötti kapcsolatok kezdenek felbomlani. A szimuláció vizualizációja és RMSD értékei egyértelműen jelzik, hogy a ligandum integrálódása csak átmeneti jelenség. Az ATZ parciális atomtöltései egy ideiglenes ATZ-csatorna komplexet hoznak létre, de az enzim kinetikus energiája az ATZ izopropil-amin csoportjával kölcsönhatásba lépő néhány hem oldallánc atomból származó kedvezőtlen kölcsönhatásokkal együtt rövid idő alatt legyőzi ezeket a hatásokat, ezért az ATZ nem tudja elérni a hem peremét. Az ATZ kiszorulhat a csatornából, és az enzim visszatér eredeti állapotába, a ligandum csatorna aminosavainak fluktuálásával, valamint a nyitott és zárt állapotok periodikus váltakozásával (21. ábra). A 100 ns alatt az enzim másodlagos szerkezete már nem változott jelentősen.



21. ábra. A további 100 ns-os szimuláció RMSD-értékei (fent) egyértelműen azt mutatják, hogy a ligandum csatorna aminosavak kinetikus energiája képes legyőzni az atrazin parciális atomtöltéseinek stabilizáló hatását. Miután az atrazin eltávolításra kerül a csatornából, a csatorna fluktuációja gyorsan növekszik, és az enzim visszatér eredeti állapotába. Az atrazin végső állapotát (lent) is megjelenítettük.

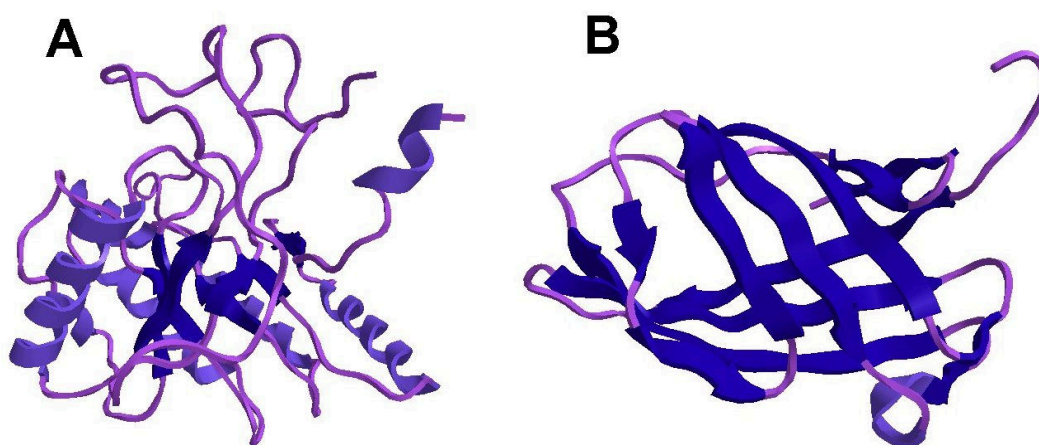
A ligandum csatorna három aminosavának van a legjelentősebb hatása az ATZ hozzáférhetetlenségére: Phe148, Asp183 és Gln222. A Phe148 fenil-csoportja kölcsönhatásba lép az s-triazin gyűrű delokalizált elektronrendszerével. Az Asp183 karboxil-csoportjának szénatomja 0,62 parciális töltéssel rendelkezik, és kölcsönhatásba lép az s-triazin gyűrű N1 atomjával, amelynek parciális töltése -0,759. A Gln222 amino-csoportjának hidrogénjei 0,32, illetve 0,30 parciális töltéssel

rendelkeznek. Ezek az atomok az s-triazin gyűrű N1, N2, N3 és Cl atomjaival lépnek kölcsönhatásba, amelyek parciális töltései -0,759, -0,244, -0,19, illetve -0,26.

Fontos megjegyezni, hogy az ATZ delokalizált s-triazin gyűrűjében lévő szénatomok és az 1-es számú nitrogén korábban kiszámított parciális atomtöltései a vegyület többi atomjához képest jelentősen magasabb abszolút értékeket mutatnak (C1: 0,405, C2: 0,401, C3: 0,483, N1: -0,759) (12. ábra, 2. táblázat). A beépített ATZ helyzete (18. ábra) arra utal, hogy ezek a delokalizált elektronrendszer által generált parciális töltések lehetséges korlátozó tényezők, és felelősek lehetnek a ligandum hozzáférhetetlenségéért.

5.3. Biopolimerázok és molekulamodellezés

Cellulázok. A növényi sejtfalban található biopolimerek három fő csoportra oszthatók: cellulóz, hemicellulóz és lignin. Ezek szoros összekapcsolódása teszi olyan nehezzé a biomassza hasznosítását.



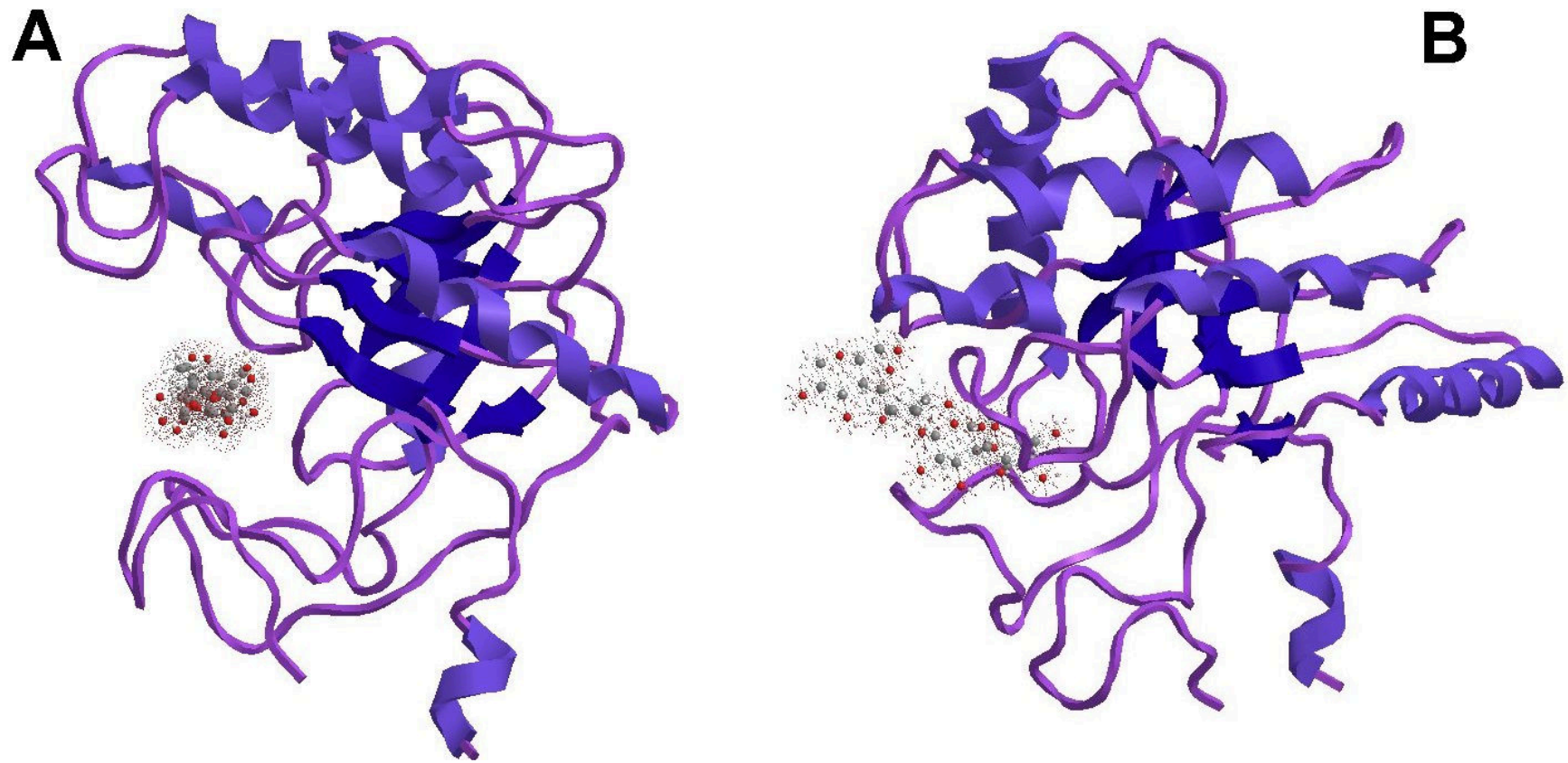
22. ábra. A *Cellulomonas* sp. CelB7 celluláz katalitikus doménjének (A) és CBM-jének (B) másodlagos szerkezete, Cartoon ábrázolási móddal megjelenítve.

Az általunk használt baktérium törzset (*Cellulomonas* sp.) úgy választottuk ki, hogy ebben a baktériumban a biopolimerek bontásához szükséges enzimek jó része megtalálható, így könnyebben nyomon tudtuk követni a különböző enzimek 3D szerkezetét és hasonlóságait is. Elsőnek egy korábban már tanulmányozott (FÜLÖP et al. 1996, FÜLÖP és PONYI 1997) celluláz katalitikus doménjét és CBM-jét használtuk fel a modellezésre. Ezek 3D szerkezete látható a 22. ábrán.

A kétféle domén alapvetően különbözik egymástól. A katalitikus doménben elsősorban α -hélix részek találhatók, míg a CBM-ben inkább a β -lemez szerkezet

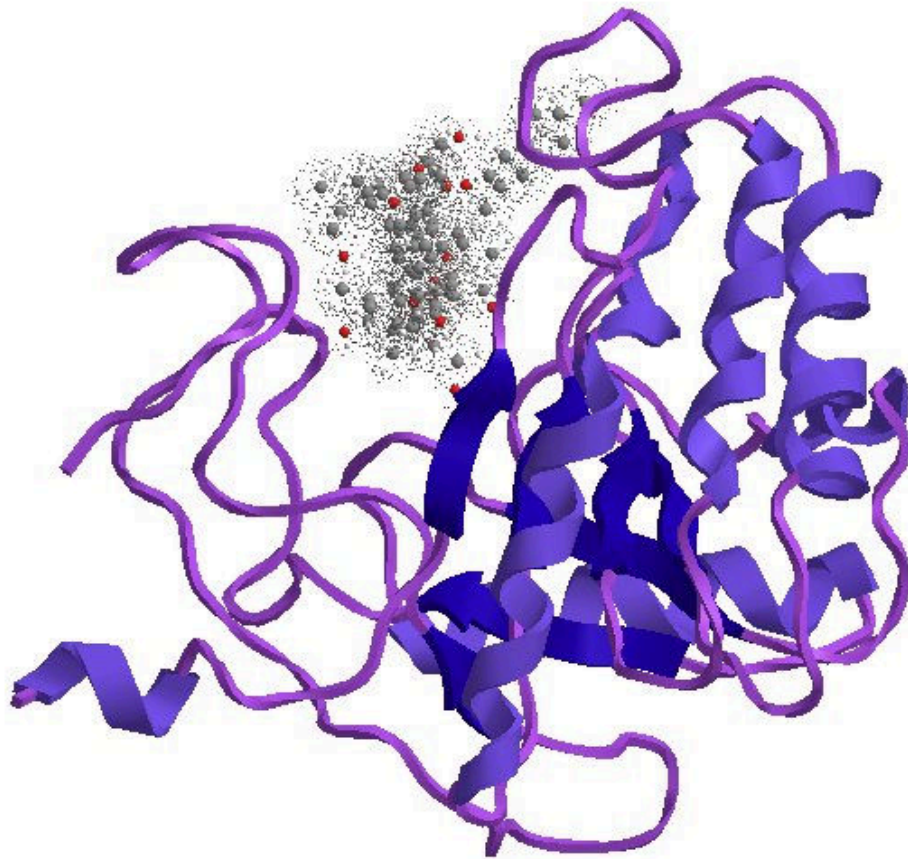
dominál. Ez általánosságban igaz más O-glikozil hidrolázok kötő és katalitikus doménjeire is. A cellulóz lebontásában számos más enzim is részt vesz a cellulázokon kívül, többek között – a teljesség igénye nélkül – különféle β -glükánázok, β -glükózidázok és cellobiohidrolázok is. A cellulázok igen fontosak a biomasza degradációjában; a CBM odakapcsolja az enzimet a cellulóz rostokhoz, fellazítja azokat, hogy a katalitikus domén aktív centruma elvégezhesse a katalízist (23. ábra). A celluláz katalitikus doménjének egy celluláz-részlettel alkotott komplexének modellje a 23. ábrán látható. A ligandum az enzim azon részébe illeszkedik, ahol a hidrolízisben fontos szerepet játszó, már korábban leírt Asp255 és Glu87 aminosavak találhatóak (SAHARAY et al. 2010).

A cellulázok tevékenysége folytán a keletkező kisebb oligomerek sokszor gátolják (AGRAWAL et al. 2021) az enzim további működését azáltal, hogy ezek a kisebb fragmentumok kötődnek az enzimhez (23. ábra), ezáltal gátolva annak működését.



23. ábra. A *Cellulomonas* sp. CelB7 celluláz katalitikus doménjének egy cellulóz-részlettel alkotott dokkolási komplexe két különböző nézőpontból (A, B). A ligandum (cellulóz-részlet) az aktív centrumba illeszkedik, és kitölti azt.

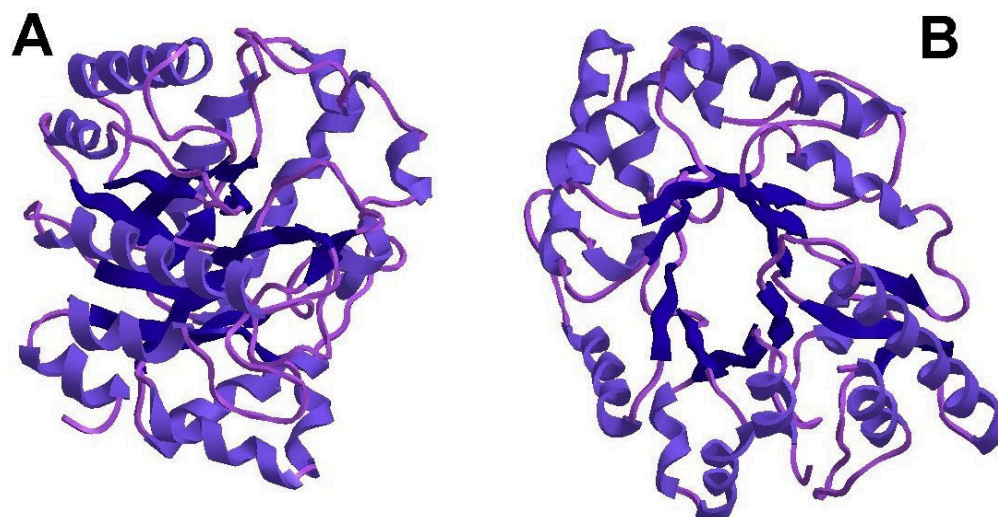
A lignin nagyobb koncentrációban gátolja a celluláz működését (BOTELLA et al. 2005), ezt a tényt több esetben is kimutatták (BERLIN et al. 2006). Modellezéssel igazoltuk azt, hogy a lignin képes kapcsolódni (24. ábra) a *Cellulomonas* sp. CelB7 celluláz katalitikus doménjéhez bizonyos esetekben. A kapott dokkolási eredmények kisebb mértékben mutatták ezt a kapcsolódást, így ez igazolhatja azt, hogy a lignin kevésbé gátolja a celluláz működését, vagy nagy koncentráció kell ahhoz, hogy a lignin számottevően gátolhassa a celluláz enzimet.



24. ábra. A *Cellulomonas* sp. CelB7 celluláz katalitikus doménjének egy lignin-részlettel alkotott dokkolási komplexe. A lignin-részlet az aktív centrumhoz kapcsolódik, ezzel megakadályozhatja a celluláz működését.

Jól látható a 24. ábrán, hogy a lignin a celluláz aktív centrumában található, és ott képes megkötődni. Egyelőre erről a kötőerősségről kevés információnk van és arról is, hogy mennyi ideig található az aktív centrumban. Gyakorlati kísérletekkel lehetne eldönteni, hogy a lignin csak egyszerűen egy kompetitív inhibitor vagy tartósan gátolja is az enzim működését.

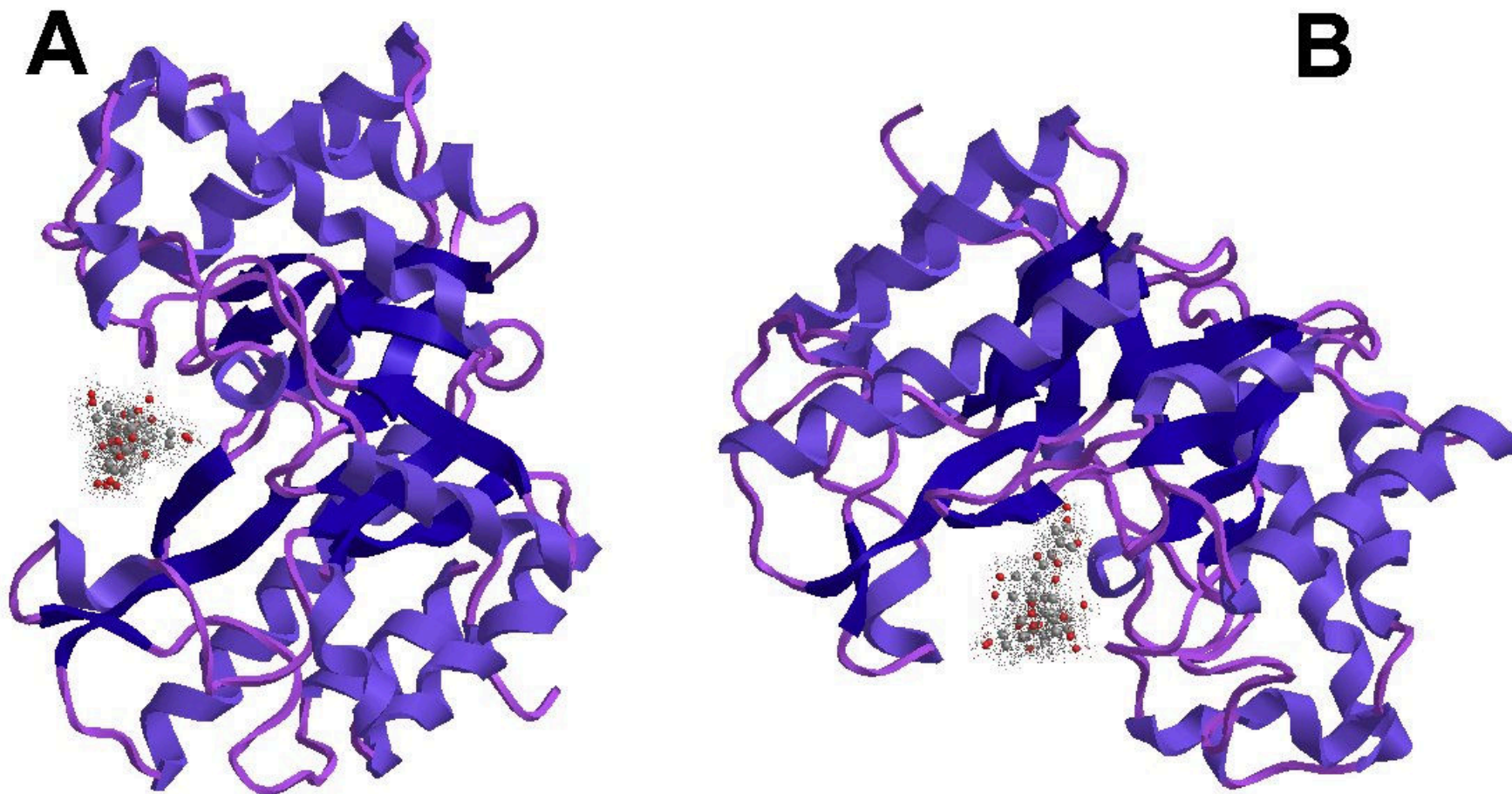
Xylanázok. A biopolimerek lebontásában szerepet játszó másik fontos enzimcsoportot a különböző xylanázok alkotják. A xylanázok a hemicellulóz xylán részeint bontják le különböző módon. A xyloglükán oldalláncok a hemicellulózban jelentős részek, így a xylanázok fontos enzimek a biomassza lebontásában.



25. ábra. *Cellulomonas fimi* xylanáz (PDB: 1J01) katalitikus doménjének másodlagos szerkezete, két különböző nézőpontból (A, B), Cartoon ábrázolási móddal megjelenítve.

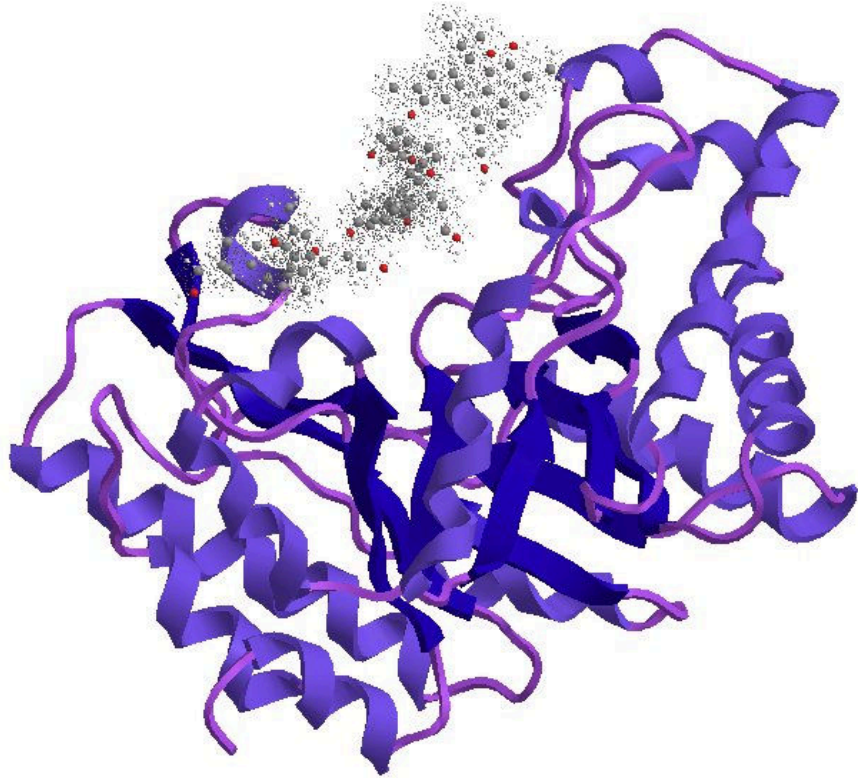
A 25. ábrán megfigyelhető, hogy a xylanáz enzim katalitikus doménje is elsősorban α -hélix másodlagos szerkezeti elemeket tartalmaz. Más mikroorganizmusok esetében is hasonló eredményre jutottak (MUHAMMAD et al. 2020). Sok hasonlóság van a cellulázok és a xylanázok között, ez tulajdonságaikban is megmutatkozik. A modellen jól látható a xylanáz enzim egy xylán-részlettel alkotott dokkolási komplexe (26. ábra). Ez igen hasonlít a celluláz hasonló komplexére. Talán ez magyarázza azt a tényt, hogy a celluláz enzimek között található több olyan is, melynek van xylanáz aktivitása is. A cellulolitikus és a hemicellulolitikus enzimek között vizsgálták az együttműködés lehetőségét (ROSS et al. 1992), és kimutatták a kölcsönös szinergizmust.

A *Cellulomonas fimi* xylanáz katalitikus doménje erős affinitást mutat a ligninnel szemben (27. ábra). Ezt szintén kimutattuk enzim-ligandum dokkolással. A modell nagy hasonlóságot mutat a cellulóz ligninhez való kötődéséhez, mely nem meglepő, hiszen sok celluláznak van xylanáz aktivitása is.



26. ábra. A *Cellulomonas fimi* xylanáz (PDB: 1J01) katalitikus doménjének egy xylán-részlettel alkotott dokkolási komplexe két különböző nézőpontból (A, B).

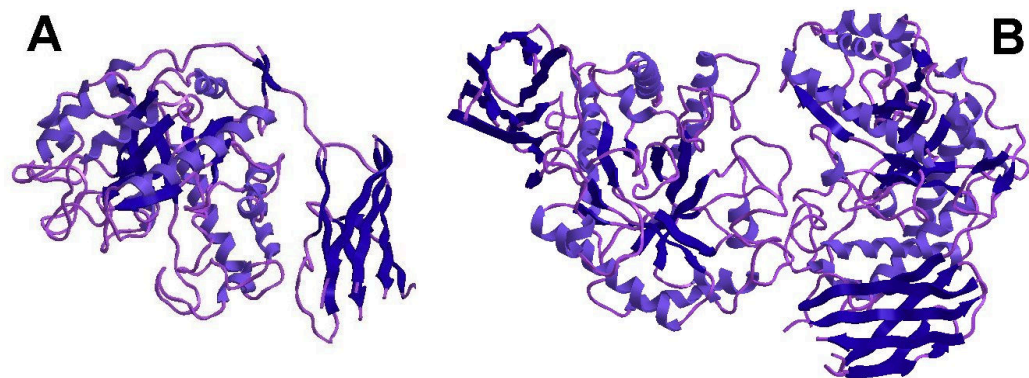
A kapcsolat részben az enzimeknek (celluláz és xylanáz) a lignin felületére való adszorpciójával magyarázható, de a kötődés részletes mechanizmusai még mindig kevésbé ismertek, a kölcsönhatások mögött meghúzódó mechanizmusok továbbra is tisztázatlanok (KELLOCK et al. 2017, LI és ZHENG 2017).



27. ábra. A *Cellulomonas fimi* xylanáz (PDB: 1J01) katalitikus doménjének egy lignin-részlettel alkotott dokkolási komplexe. A lignin-részlet hozzákapcsolódik az aktív centrumhoz, és ezzel megakadályozhatja az enzim működését.

A cellulázok és xylanázok nem specifikus adszorpciója a ligninhez megakadályozza a biomassza enzimatikus átalakítását. A számítások azt mutatják, hogy a negatívan töltött felülettel rendelkező celluláz és xylanáz csökkentheti a lignin általi gátlást. Lehetséges olyan nagy aktivitású cellulázok és xylanázok előállítása, amelyek ellenállnak a lignin által közvetített inaktiválásnak, bár további munkára van szükség ezen probléma megértéséhez (WHITEHEAD et al. 2017).

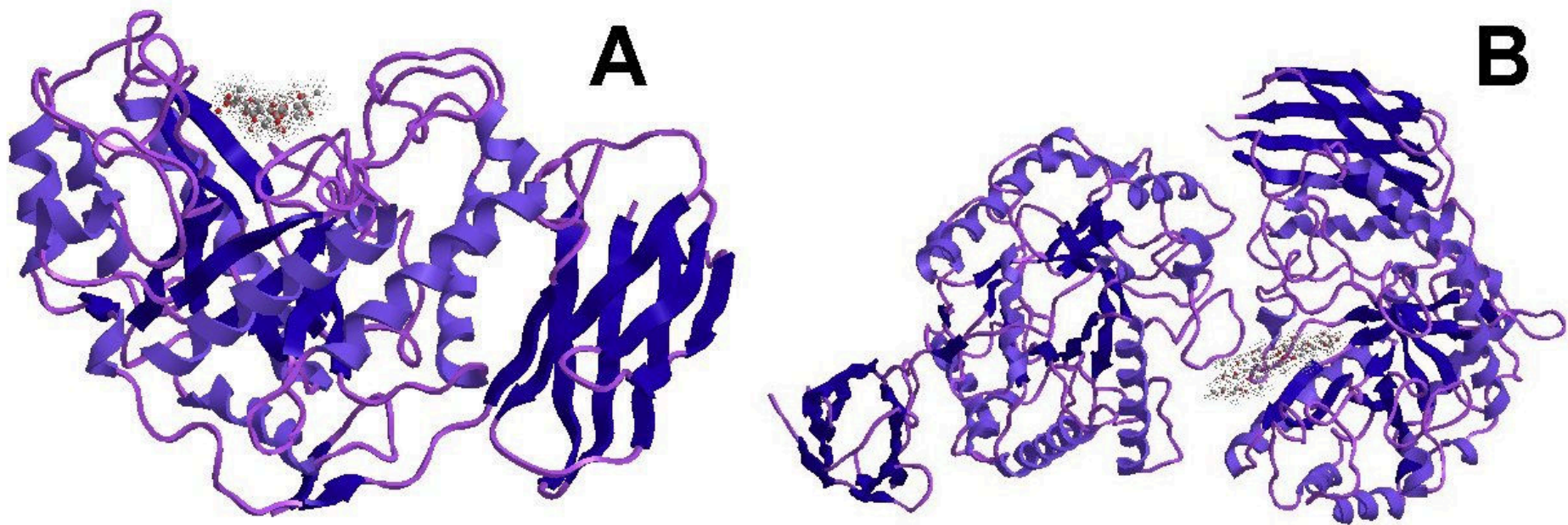
Mannanázok. A mannánok szintén a hemicellulózok közé tartoznak. A mannanázok a hemicellulóz ramnogalakturonán részeihez oldalláncként kapcsolódó mannopiranoz oligomerek lebontásában vesznek részt. A mannanázok monomer és dimer formában is megtalálhatók (28. ábra). A mannanáz-mannóz dokkolási komplex többféle is lehet (29. ábra), attól függően, hogy a mannán a monomer enzimhez vagy a dimer enzimhez kapcsolódik. A 28. és 29. ábrákon megfigyelhető, hogy a mannanáz enzim tartalmaz egy katalitikus és egy szubsztrátkötő részt is. A dokkolási komplex az eddig tárgyalt többi enzim-szubsztrát kapcsolathoz hasonlóan stabil és alkalmas lehet a szubsztrát bontására.



28. ábra. A *Cellulomonas fimi* endo-béta-1,4-mannanáz (PDB: 2X2Y) másodlagos szerkezete monomer (A) és homodimer (B) állapotban, Cartoon ábrázolási móddal megjelenítve.

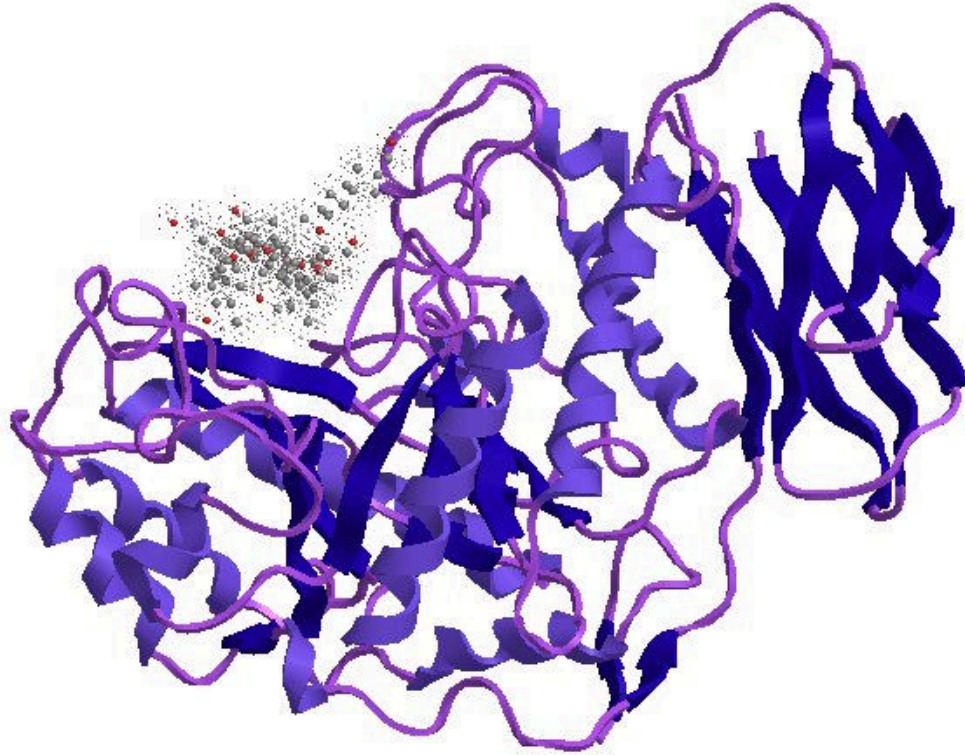
A xylanáz és a mannanáz között szinergikus hatást írtak le (VÁRNAI et al. 2011). Ennek ellenére a két enzim kevésbé hasonlít egymásra (25. és 28. ábra), így a kooperatív működésükre ez aligha lehet magyarázat.

A hemicellulózokkal és azok lebontásában szereplő idáig ismertett enzimekkel nem merülnek ki a lehetőségek. Az eddig tárgyaltakon kívül a hemicellulózban a teljesség igénye nélkül vannak még glüko-piranozid, galakto-piranozid, ramno-piranozid és arabino-furanozid oldallánccok is. A gélszerű pektin főként galakturonsavból álló heteropoliszacharid – több ponton is kapcsolódik a hemicellulózokhoz. Az ezen oldallánccok lebontásában szereplő további enzimek is igen sokrétűek. A hemicellulózok és hemicellulázok változatossága, valamint azok modellezése egy későbbi tennivaló lesz, amely kihívásokkal teli feladatok elé állíthat.



29. ábra. A *Cellulomonas fimi* endo-béta-1,4-mannanáz (PDB: 2X2Y) egy mannán-részlettel alkotott dokkolási komplexe két különböző nézőpontból. Monomer enzim és mannán (A) és homodimer enzim és mannán (B) kapcsolata. Mindkét esetben a ligandum (mannán) az aktív centrumba illeszkedik, és kitölti azt.

Szinte semmilyen irodalmi hivatkozás nincs arra vonatkozóan, hogy a lignin-mannanáz kapcsolat létezik-e, és milyen hatásai vannak. Sikerült modellezni ezt a kapcsolatot (30. ábra). Jól látható az ábrán, hogy a lignin-részlet milyen jól illeszkedik a mannanáz aktív centrumához, bár a kölcsönhatás jellege még nem teljesen tisztázott, és további vizsgálatokra van szükség.

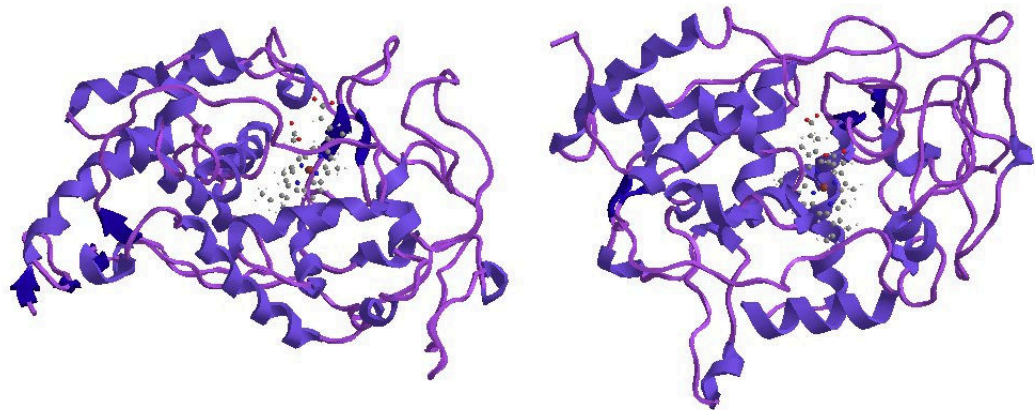


30. ábra. A *Cellulomonas fimi* endo-béta-1,4-mannanáz (PDB: 2X2Y) egy lignin-részlettel alkotott dokkolási komplexe. A lignin-részlet hozzákötődik az aktív centrumhoz, és ezzel blokkolhatja az enzim működését.

Beszámoltak arról, hogy a vízoldható (kis molekulatömegű) lignin fokozza az enzimatikus emészthetőség sebességét, azonban a lignin-enzim kölcsönhatás katalitikus mechanizmusa továbbra is megfoghatatlan (LI et al. 2022). Ebben nyújthat segítséget a molekulamodellezés is (24., 27. és 30. ábra), mely talán magyarázatot adhat a jelenségre. A lignin negatív hatásainak mérséklése érdekében kiterjedt kutatásokat végeztek a lignin-enzim kölcsönhatások alapvető mechanizmusainak feltárására, hogy olyan technológiákat fejlesszenek ki, amelyek leküzdhetik a lignin enzimatikus hidrolízisre gyakorolt negatív hatásait (LI és ZHENG 2017).

Lignin-peroxidázok. A biopolimerek harmadik csoportját a lignin alkotja. A LiP-t az ún. fehérrothadást (fehér korhasztó) okozó gombák termelik. Katalizálja a veratril-alkohol oxidációját, valamint a lignin lebomlását, és akadályozza a lignin depolimerizációját is. (Megjegyzés: a barna korhasztó gombák bontják a fában lévő cellulózt és hemicellulózt. A cellulózt és hemicellulózt hidrogén-peroxiddal (H_2O_2) bontják le, így nem keletkeznek szacharidok, nincs hasznosulás, csak oxidáció).

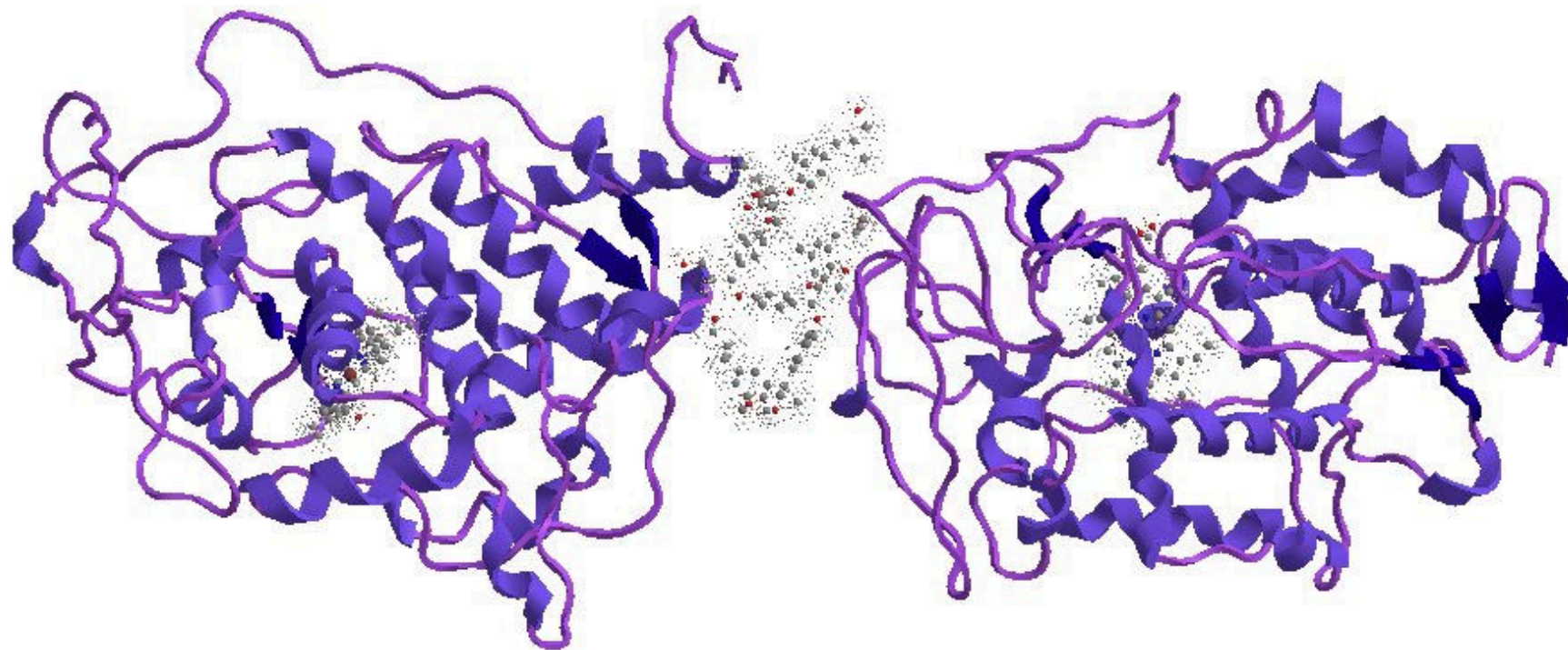
A 31. ábrán látható a LiP enzim 3D modellje; a két monomer azonos, így alkotnak homodimert. Jól látszik az, hogy mindkét monomer tartalmaz egy-egy hem vázát, így ezeket az enzimeket hem-peroxidázoknak nevezik, amelyek H_2O_2 -t igényelnek oxidánsként.



31. ábra. A *Phanerochaete chrysosporium* lignin-peroxidáz (PDB: 1B82) másodlagos szerkezete. Az enzim homodimer állapotban van jelen, Cartoon ábrázolási móddal megjelenítve.

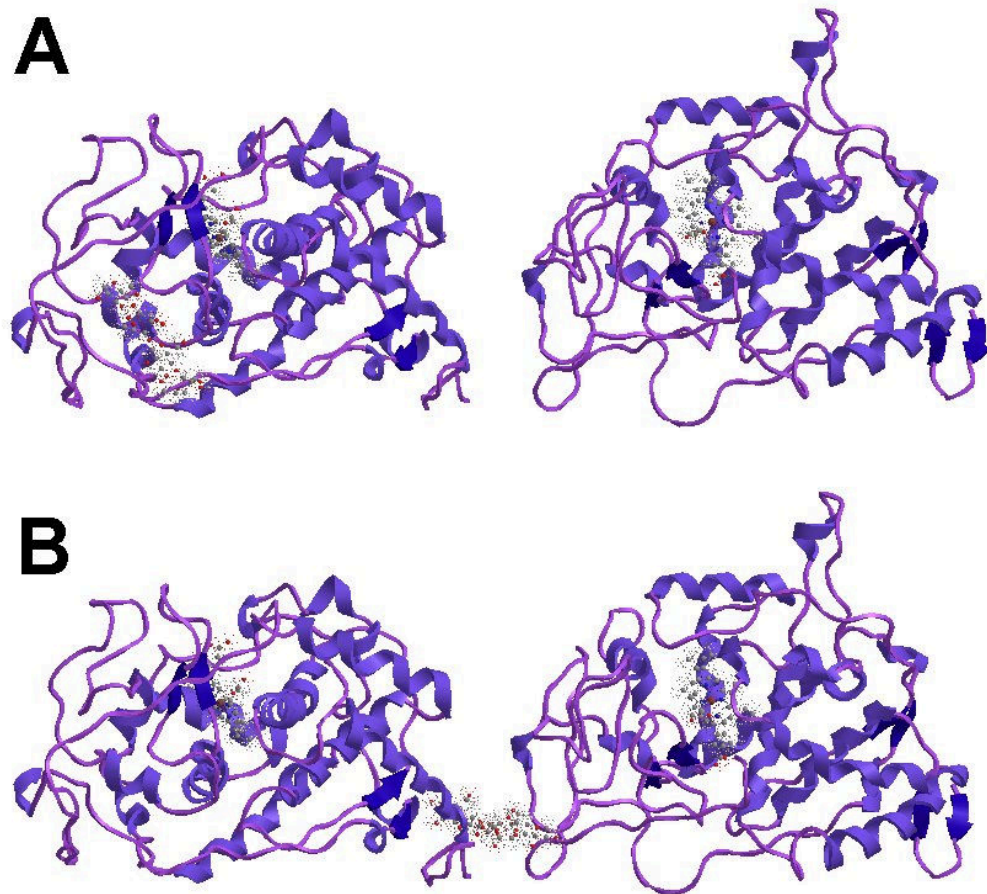
A LiP enzim mindkét alegységének egy lignin-részlettel alkotott komplexének modellje a 32. ábrán látható. A ligandum a két alegység közé illeszkedik. Felmerül annak lehetősége, hogy mindkét (azonos szekvenciájú) alegység jelenléte szükséges lehet a lignin felismeréséhez és lebontásához – ennek megállapításához további mérések szükségesek.

Rendkívül savas körülmények között a LiP nem katalizál megfelelően. Azonban, ha kicserélik a LiP hem vázát a mangán-peroxidázban lévő vázra, úgy a katalitikus hatékonyság jelentősen megnő (PHAM et al. 2018).



32. ábra. A *Phanerodontia chrysosporium* lignin-peroxidáz (PDB: 1B82) egy lignin-részlettel alkotott dokkolási komplexe. A lignin-részlet a két alegység közé illeszkedik, felismerhető az 1-1 hem váz az alegységekben.

Ha már vizsgáltuk a lignin cellulázra történő hatását, akkor megpróbáltuk a cellulóz LiP-ra gyakorolt hatását is modellezni. Meglepődve tapasztaltuk, hogy létezik valamilyen kapcsolat a cellulóz és a LiP között (33. ábra). A cellulóz az esetek többségében a LiP homodimer nem katalitikus helyére kötődött (33A. ábra), de néhány esetben a cellulóz az aktív centrum közelében kapcsolódott az enzimhez (33B. ábra). Ha nem is kapcsolódik a cellulóz szorosan az aktív centrumhoz, képes lehet a lignin kapcsolódását részlegesen vagy teljesen megakadályozni.



33. ábra. A *Phanerodontia chrysosporium* lignin peroxidáz (PDB: 1B82) egy cellulóz-részlettel alkotott dokkolási komplexe. A cellulóz-részlet nem kötődik hozzá az aktív centrumhoz (A); a cellulóz-részlet hozzákötődik az aktív centrumhoz (B).

Ez a jelenség teljesen új, nem írtak le hasonló eredményt. Ezt a molekulamodellézéstette lehetővé. Természetesen ezt a gyakorlatban is igazolni kell, sok kísérletet kell végezni ahhoz, hogy ezt pontosan le lehessen írni. Mindenesetre a modellezés mutatja azt, hogy milyen új lehetőségek rejlenek ebben a módszerben.

Későbbi kutatásaink egyik célja annak felderítése, hogy véletlenszerű aminosavcserék okoznak-e eltérő térszerkezetet, valamint az eltérő térszerkezet okoz-e az enzim aktivitásában, szubsztrátkötő képességében eltéréseket, és ezeket meg tudjuk-e molekuláris szinten magyarázni. Emellett érdekes lenne megvizsgálni, hogy a lignin jelenléte miért okozza a cellulázok (és más hidrolázok) jelentős részének aktivitás-csökkenését (HAARMEYER et al. 2017). Ha sikerülne véletlen aminosavcserékkel hatékonyabb cellulázokat előállítani, azzal lehetségessé válna, hogy a lignin-celluláz interakciókról is többet tudjunk meg.

Új lehetőségek feltárása. A biomassa újrahasznosítása manapság nemcsak azért nélkülözhetetlen, mert a fosszilis energiaforrások fokozatosan kimerülnek, hanem mert csökkenteni kell a növekvő energiafelhasználás okozta környezetszennyezést. Cikkünk a jelenleg használatos növényi biomassa-feldolgozási módszerek eredményeit kívánja áttekinteni. Célunk volt a jelenleg nem használt, de publikált módszerek áttekintése is. Feltártuk a biomassa újrahasznosításában alkalmazható új módszereket és az enzimek modellezését felhasználva az újabb lehetőségeit. Ennek az áttekintésnek az eredményei szinte minden területen megdöbbentőek. Előrelépés történt a biomassa előkezelésében, valamint a felhasznált enzimek sokféleségében és alkalmazásában. Viszont a molekuláris modellezés alapján történő fejlődésben nagyon kevés előrelépés történt. Szintén minimális az előrelépés a meglévő enzimek módosításában, a biomassa feldolgozása során a megváltozott működés és a környezeti feltételekhez való alkalmazkodás érdekében (FÜLÖP és ECKER 2020). Alig van olyan publikáció, amelyben molekuláris modellezési technikákat alkalmaznának az enzimműködés módosításra, javítására és az enzimek különféle környezeti feltételekhez való adaptálására. Véleményünk szerint a modern számítási, biokémiai és biotechnológiai módszerek segítségével hatékonyabb és biomassa-feldolgozásra alkalmas enzimek célirányos tervezése lenne lehetséges.

A közelmúltban vizsgált és alkalmazott módszerekkel együtt feltártuk a növényi szerkezeti biomassa hasznosításának legújabb lehetőségeit, eredményeit (FÜLÖP és ECKER 2020). Minden területen történt előrelépés, és ez a terület folyamatos fejlődést mutat. Új fizikai és kémiai módszereket fejlesztettek ki a biomassa előkezelésére, amelyek a biomassa anyagok hatékonyabb kinyerését eredményezhetik. A mikroorganizmusokban található enzimek széles skáláját izolálták és használták fel a biomassa feldolgozásában. Tanulmányozták az enzimek működési mechanizmusát, emellett új és hatékonyabb módszereket fejlesztettek ki. Véleményünk szerint van

néhány olyan terület, ahol az utóbbi időben kevesebb fejlődés történt. Ezek közé tartozik a meglévő enzimek tulajdonságainak megváltoztatása racionális tervezéssel, amely a szerkezetmodellezésen, MD szimulációkon, enzim-szubsztrát kölcsönhatásokon és virtuális mutagenezisen alapul.

Kiaknázatlan és óriási lehetőségek vannak olyan módosított enzimek előállítására, amelyek hatékonyabban működnek a biomassza feldolgozásához használt ipari körülmények között (FÜLÖP és ECKER 2020). Az enzimek racionális módosításával jelentősen növelhető a biomassza átalakításának, az enzimek vagy a folyamatok hatékonysága. Fizikai, kémiai, biokémiai, biotechnológiai és molekuláris biológiai módszerek állnak rendelkezésre az enzimek fehérje oldalláncainak módosítására a biomassza hatékonyabb hasznosítása érdekében, amelyek jobban megfelelnek az alkalmazott technikáknak.

E módszerek széles körű alkalmazásával további fejlődés várható ezen a területen, és csak támogatni lehet, hogy *in silico* modellezéssel, a molekulák virtuális módosításával, molekuláris szimulációkkal vizsgálják az enzimek működését különböző környezeti és/vagy ipari körülmények között (FÜLÖP és ECKER 2020). Ez segítené az eddig alkalmazott ipari biomassza hasznosítási módszerek fejlesztését anélkül, hogy a módszert kellene megváltoztatni, csupán az adott enzimeket kellene úgy módosítani, hogy azok az adott körülmények között hatékonyabban működjenek, így növelve a termelékenységet és csökkentve a költségeket.

A biomassza feldolgozásához jelenleg használt enzimek javítására számos lehetőség van. A számítógépes tervezési és modellezési technikák felhasználhatók az enzimek módosítására, hogy azok az adott fizikai-kémiai körülmények között hatékonyabban működjenek. Az enzimek működésének és a katalitikus körülményeknek a tanulmányozásával az enzim szerkezetének a tényleges művelethez jobban illeszkedő módosításával lehet beavatkozni a kémiai reakciókba (FÜLÖP és ECKER 2020). Ehhez ismerni kell az alkalmazott enzimátikus folyamatokat, és számítógépes modellezéssel és tervezéssel módosítani kell az enzimek működését a jobb felhasználás reményében.

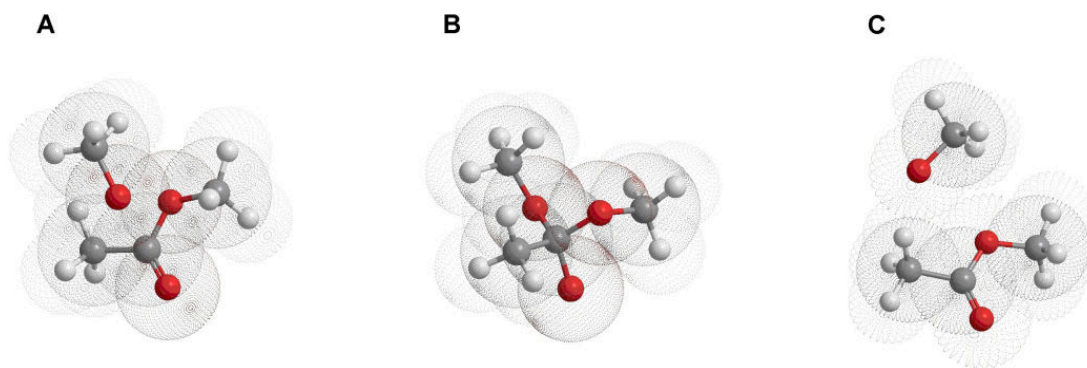
A poliszacharidokat lebontó enzimek gyakran kapcsolódnak a glikozilációval, az N- és O-kötésű glikánokhoz, amelyek szerepe csak részben ismert. A glikánok befolyásolhatják az enzimek kritikus tulajdonságait: az N-glikoziláció javítja a termikus és proteolitikus stabilitást, az O-glikoziláció a proteolitikus stabilitás mellett javítja a CBM-kötési affinitást és stabilitást, de jelenlétük nem feltétlenül befolyásolja

a katalitikus aktivitást (AMORE et al. 2017). A glikozilált cellulázok modellezése javíthatja ismereteinket a glikánok különböző funkcióiról.

Chung és munkatársai (2019) leírtak egy glikozilált cellulázt, amelyben főként galaktóz-diszacharidokat lehetett találni. Ez a glikoziláció drámaian befolyásolta az oldhatatlan szubsztrátok hidrolízisét, a proteolitikus és termikus stabilitást, és szükségesnek bizonyult ahhoz, hogy ez az enzim zord környezetben, többek között ipari környezetben is működjön (CHUNG et al. 2019). Megjegyzendő, hogy az immobilizált celluláz-polimetakrilát részecskék a szabad cellulázhoz képest kiváló pH-adaptálhatóságot mutatnak (CHAN et al. 2019).

5.4. A modellezett metanolízis

A 34. ábrán látható egy átészterezési reakció modellje. Az ilyen reakciót katalizáló lipáz enzimek esetében szintén felmerül a molekulamodellezés-alapú fejlesztések lehetősége. A triacilglicerol lipáz például egyaránt megtalálható állatokban, növényekben, gombákban és baktériumokban. A triglicerideket digliceridekre, majd monogliceridekre és szabad zsírsavakra hidrolizálja. Az enzim vízben jól oldódik, és az olajcseppek felszínén fejt ki hatását. Az aktív helyhez való hozzáférést egy ún. fedél nyitása szabályozza, amely, ha zárva van, elrejt az aktív helyet körülvevő hidrofób felületet. A fedél akkor nyílik ki, amikor az enzim olaj-víz határfelülettel érintkezik (határfelületi aktiváció) (CHANDRA et al. 2020).



34. ábra. A báziskatalizált reakciótípus energiminimalizált állapota. **A:** nukleofil támadás egy alkoxiddal. **B:** Tetraéderes köztes termék. **C:** Távozó csoport eltávolítása. A megjelenítés az ún. golyó & pálcika (Ball & Stick) ábrázolással történt, a színek az atomtípusokat jelölik, a Wireframe ábrázolásmódú gömbök pedig az atomok és atomcsoportok van der Waals felületeit ábrázolják.

Lehetőség lenne – a cellulázokhoz és ligninázokhoz hasonlóan – aminosavak lecserélésére az enzim releváns pontjain, majd az így kapott (mutáns) modellek változó környezeti feltételek (pH, hőmérséklet, nyomás) közötti tesztelésére. Amennyiben a szimulációk eredménye alapján az adott módosítások egy vagy több nagyobb aktivitású enzimváltozatot eredményeznek, amelyek a 34. ábrán látható reakciót gyorsabban, könnyebben előállítható körülmények között tudják katalizálni, úgy már célzottan tudnánk szintézissel létrehozni ezeket az enzimpopulációkat (DANCS et al. 2022).

6. Következtetések és javaslatok

Az atrazin kvantumkémiai paramétere. A legtöbb publikáció a Param Chem webszerverről származó paraméterekre hivatkozik, amely egy olyan forrás, amely kizárólag analógián alapuló kezdeti paraméterekhez való hozzáférést tesz lehetővé. A probléma az, hogy ezek az eredmények tartalmazznak egy úgynevezett büntetőpontot (penalty score), mivel a feltöltött ligandumok csak a CHARMM általános erőterrel (CgenFF) vannak összevetve, ezért további számítások lennének szükségesek a paraméterek finomításához az új kémiai kontextusban. Ebben a munkában az analógián alapuló adatmennyiség a három nem kötő paraméterre korlátozódik, az ATZ a CHARMM36 erőter minden topológiájával és paraméteradatával keresztellenőrzésre került, (beleértve a CgenFF-et is), a többi kimeneti számadat pedig precíz optimalizációs módszerek és QM számítások eredménye.

A bemutatott munkafolyamat végeredménye az ATZ MD szimulációjához szükséges teljes paraméterkészlet. A szükséges adatokat négy, szabadon hozzáférhető fájlba integráltuk (ECKER 2016): atrazine.pdb, atrazine.psf, atrazine.top és par_charmm36_atrazine.par.

A lignin-peroxidáz és az atrazin összeférhetlensége. Az enzim képes különböző xenobiotikumok lebontására, de a katalízishez szükséges enzim-szubsztrát kapcsolatok nem teljesen ismertek. Mivel a LiP nem képes az ATZ lebontására, a molekuláris szintű kölcsönhatások leírása jobb megértést adhat a ligandum csatorna szerkezet-funkció kapcsolatáról, valamint az egyes ligandumok hozzáférhetőségét meghatározó vagy korlátozó tényezőkről. Az enzim-ligandum dokkolás eredményei alapján az ATZ energetikailag kedvező pozíciót találhat a ligandum csatorna aminosavainak környezetében, bár ezen komplexek kialakulásának matematikai valószínűsége nem jelentős (10%, 16% és 53%-os gyakorisági értékek három különböző hőmérsékleten). Az ATZ-LiP komplex 5 ns-os MD szimulációja során a legjobb dokkolási eredménnyel (53%-os gyakoriság 298 K hőmérsékleten) az ATZ integrálódott az aminosavak közé, és nem tudott átjutni a csatornán. Ez a jelenség némileg ellentmond annak, hogy a kisméretű szubsztrátoknak szabad hozzáférésük van a hem felé (GERINI et al. 2003), amikor a csatorna nyitott állapotú konformációban van (CAO et al. 1998). Az ATZ delokalizált heterociklusos s-triazin gyűrűjének parciális atomtöltései stabil enzim-ligandum komplexet hozhatnak létre, és ez lehet a magyarázata az ATZ hozzáférhetetlenségének.

Mivel az ATZ képes kötődni azokhoz az aminosavakhoz, amelyek a szubsztrátoknak az aktív centrum felé való hozzáférését biztosítják, fontos kérdés, hogy ez a kötődés átmenetileg befolyásolja-e az enzimaktivitást. Ha az ATZ képes inhibitoroként viselkedni az egyes szubsztrátok esetében, akkor az ilyen kísérleti eredmények azt bizonyítanák, hogy az *in silico* megközelítésünk helyesen írja le a jelenséget, ezért ez a további vizsgálataink terepe. Eredményeink arra utalnak, hogy az atomok kinetikus energiája akár elegendő is lehet ahhoz, hogy az ATZ-t eltávolítsa a csatornából, ez a lehetséges jelenség egy másik vizsgálat tárgyát képezheti. Emellett a ligandum csatorna teljes funkcióját is fel lehetne térképezni, és meg lehetne magyarázni. Ismét megjegyezzük, hogy a LiP-nak két oxidációs helye van (DOYLE et al. 1998, CHOINOWSKI et al. 1999), de a közöttük lévő kapcsolat még nem tisztázott.

Enzimek célzott módosítása a biomassza hatékonyabb feldolgozása érdekében.

Levonhatjuk azt a következtetést, hogy igen kevés szakcikk foglalkozik az extracelluláris enzimek molekulamodellezéssel történő tervezésével. Ugyan a módszerek rendelkezésre állnak, de ez a terület még egyáltalán nem tekinthető bejártottnak. További kutatásaink szempontjából elsődleges annak feltárása, hogy véletlen aminosav-cserékkel lehetséges-e hatékonyabb cellulázokat előállítani, ezzel összefüggően pedig a ligninnek mint a cellulázok egyik inhibitorának az enzimgátlást kiváltó konkrét mechanizmusának a minél pontosabb leírása. Az eddig elvégzett dokkolások alapján valóban megalapozott, hogy a lignin képes a cellulázok és xylanázok működését gátolni, emellett úgy tűnik, létezik lignin-mannanáz kölcsönhatás, sőt, cellulóz – lignin-peroxidáz kölcsönhatás is – ez utóbbi szintén érdekes, későbbi kutatás alapja lehet, hiszen lehet, hogy ennek is van hatása az enzimaktivásra.

Bioüzemanyagok előállítása. Ugyan még nagyon kezdeti fázisban van, de azért már egyértelműen látszik annak lehetősége, hogy a molekulamodellezéssel kapott eredményeket felhasználjuk például bioetanol és biodízel hatékonyabb előállítására. Ezen bioüzemanyagok szintézisét szintén végezhetik enzimek, azonban ezek felhasználása egyelőre költséges és lassú. Jól megválasztott módszerekkel lehetőség lenne arra, hogy célzottan tervezzünk hatékonyabb és gyorsabb enzimeket, aztán ezeket szimulált körülmények között leteszteljük, majd végül csak a céljainknak legmegfelelőbbeket expresszáltassuk, illetve állítsuk elő.

7. Új tudományos eredmények

1. Kvantumkémiai számításokkal sikerült megállapítanunk az atrazin nevű, fotoszintézisre ható herbicid parciális töltéseit, kötéshosszait és -szögeit, valamint a torziós szögeket. A kapott értékeket aztán visszafordítottuk a hagyományos mechanika nyelvére, és elsőként állítottuk elő az atrazin CHARMM36 erőterrel kompatibilis paramétereit, amelyek jóval pontosabb értékek, mint a hagyományos, analógián alapuló paraméterek. Az atrazint így már fel lehet használni molekuladinamikai szimulációkban, fehérje-ligandum, enzim-ligandum és egyéb interakciók atomi szintű tanulmányozására.

2. Enzim-ligandum dokkolással megállapítottuk, hogy az atrazin kötődése a lignin-peroxidáz ligandum csatornájához termodinamikailag kedvező, azonban némileg hőmérséklet-függő és a csatorna nyitott állapota esetén is az atrazin lehetséges konformációinak csak kisebb része jelent megfelelő orientációt. Molekuladinamikai szimulációval és számításokkal elsőként kimutattuk, hogy az atrazin jelenléte a lignin-peroxidáz ligandum csatornájában az aminosavak fluktuációját szignifikánsan csökkenti. Ezen fluktuációk a kisméretű, potenciális szubsztrátok esetében elengedhetetlenek a szubsztrátnak az aktív centrumhoz való továbbításában. Ezzel magyarázatot adtunk az atrazinnak a lignin-peroxidáz aktív centrumához való hozzáférhetetlenségére. Az atrazin – lignin-peroxidáz komplex interakcióinak energetikai kiértékelésével leírtuk, hogy az enzim és az atrazin oldaláról melyek azok a kölcsönhatások, amelyek magyarázatot adnak a hozzáférhetetlenségre. Megállapítottuk, hogy az atrazin s-triazin gyűrűjének delokalizált elektronrendszere okozza a lignin-peroxidáz csatornájának drasztikus fluktuáció-csökkenését. Ezzel magyarázatot adtunk a csatorna működőképességének csökkenésére/megszűnésére.

3. Molekulamodellzés segítségével igazoltuk, hogy a lignin nagyobb koncentrációban valóban gátolhatja a cellulázok és a xylanázok működését. Modellezéssel sikerült elsőként megállapítani, hogy létezik lignin-mannanáz kapcsolat, így az enzimgátlás ebben az esetben is fennállhat. Modellezés segítségével elsőként írtuk le, hogy a cellulóz oligomer bizonyos körülmények esetén képes lehet gátolni a lignin-peroxidáz működését.

4. Egy átfogó, áttekintő tanulmányt publikáltunk a legmodernebb biomassza-hasznosító technikákról. Megállapítottuk, hogy a molekulamodellzésen és enzimmódosításon alapuló módszertan még kevésbé elterjedt.

8. Összefoglalás

Az enzimek szerkezet-funkció kapcsolatainak pontos leírásában ma már nélkülözhetetlen segítséget nyújtanak a molekulamodellezés különböző módszerei. A klasszikus mechanikán túl lehetőség van kvantumkémiai-kvantummechanikai módszerek alkalmazására is. Utóbbiak előnye, hogy pontosabb adatokat szolgáltatnak, hátrányuk viszont, hogy rendkívül számításigényesek, ezért (egyelőre) csak kisméretű (kb. 100 atom) molekulák viselkedése modellezhető velük. A nagyméretű biopolimerek tulajdonságainak vizsgálatára a hagyományos, gyakorlatilag a newtoni mozgásegyenleteken alapuló módszerek a megfelelőek. A két módszertan között van átjárás, ugyanis a kvantumkémiai módszerekkel leírt, kisméretű molekulák paraméterei beépíthetők egy olyan matematikai modellbe, amely képes ezeket kezelni a klasszikus mechanika szintjén. Ezeket nevezzük erőtereknek. Így lehetőségünk van például fehérjék (enzimek) és biológiailag aktív hatóanyagok (ligandumok) interakcióinak tanulmányozására.

Kutatásaim során az atrazin herbicid és a lignin-peroxidáz extracelluláris enzim interakcióit vizsgáltam abból a célból, hogy többet tudjak meg ezen nem szubsztrátspecifikus enzim szerkezet-funkció kapcsolatairól. Emellett felülvizsgáltam és áttekintettem a jelenleg alkalmazott növényi biomassza-feldolgozási módszerek eredményeit. Céлом volt az is, hogy áttekintsem azokat a módszereket, amelyeket ugyan publikáltak, azonban jelenleg mégsem használnak, valamint egyéb, a biomassza-feldolgozásban szintén fontos extracelluláris enzimek (celluláz, mannanáz, xylanáz) affinitását is megvizsgáltam lignin és cellulóz szubsztrátokhoz.

Számos olyan szintetikus, biológiailag aktív molekula létezik, amelyeknek a polimer-méretű biomolekulákkal való kölcsönhatásait részben molekuladinamikai vizsgálatokkal le lehet írni. A szimuláció elvégzéséhez szükséges paraméterek rendelkezésre állnak a biomolekulák (fehérjék, nukleinsavak, lipidek és szénhidrátok) és számos más, biológiai jelentőségű kisméretű vegyület esetében. Nem paraméterezett molekulák esetében a paraméterkészletek kvantumkémiai módszerekkel számolhatók.

A II. fotorendszert gátló gyomirtószer, az atrazin optimalizált geometriáját, van der Waals, töltés-, kötés-, szög- és torziós paramétereit kvantumkémiai módszerekkel kiszámítottuk és egy CHARMM36 erőterrel kompatibilis paraméterfájlba integráltuk. A fájl (PAR) a koordinátákkal (PDB), a struktúrával (PSF) és a topológiával (TOP) együtt szabadon hozzáférhető, és ezzel a négyféle adattípussal az atrazin a CHARMM-

alapú molekuladinamikai szimulációk részévé válhat, így a biomolekulákkal való kölcsönhatásai is tanulmányozhatók. A paraméterezés eredménye egy olyan atrazin modell lett (ECKER 2016), amely reálisabban viselkedik azon korábbi modellekhez képest, amelyek adatait kizárólag analógia és különböző adatbázisokkal való keresztellenőrzések alapján állapították meg.

Vizsgálatok megállapították, hogy a *Phanerochaete chrysosporium*, fehérrothadást okozó gomba képes az atrazin biológiai lebontására széles specifitású enzimeivel, de a biokatalizátorok konkrét szerepe még mindig nem teljesen tisztázott. A lignin-peroxidáz esetében az aktív hem kofaktorhoz kapcsolódó ligandum csatorna biztosítja a potenciális, kisméretű szubsztrátok számára az aktív centrumhoz való hozzáférést. A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a lignin-peroxidáz nem képes az atrazin lebontására, ezért elsődleges célunk annak megállapítása volt, hogy van-e összefüggés az enzim szerkezeti és dinamikai tulajdonságai és az atrazin lebontására való képtelensége között.

Az enzim-ligand dokkolás és a molekuladinamikai vizsgálat eredményei korrelálnak a vonatkozó, publikált NMR és molekuladinamikai adatokkal, és választ adnak arra, hogy a lignin-peroxidáz miért nem bontja le az atrazint, amit már számos szerző kísérleti módszerekkel korábban megállapított. Az atrazin delokalizált elektronrendszerű s-triazin gyűrűje a parciális töltésein keresztül olyan kapcsolatot alakít ki az enzim ún. ligandum csatornájával (azon aminosavak, amelyek a szubsztrátokat továbbítják az aktív centrum felé), hogy lecsökken annak fluktuációja, ezért az atrazin nem lesz képes hozzáférni a hem pereméhez. Sikeresült igazolnunk, hogy az észlelt jelenség arra utal, hogy a ligandumok kis mérete önmagában nem elegendő feltétel az aktív centrumhoz való hozzáféréshez. Fizikokémiai tulajdonságaik befolyásolják a ligandum csatorna szerkezetének viselkedését (ECKER és FÜLÖP 2018).

Az elvégzett munkát követően logikus lépés lenne annak megvizsgálása, hogy az atrazin integrációja a ligandum csatorna aminosavai közé befolyásolja-e az enzim aktivitását. Ez azért különösen érdekes, mert ismeretes, hogy a lignin-peroxidáz rendelkezik egy másik aktív centrummal is, amely feltételezhetően funkcionálisan össze van kötve (elektrontranszfer) a hem vázzal. A kettő közötti relációról – egyben az egész enzim működéséről – talán többet megtudhatnánk, ha az egyik aktivitását sikerülne befolyásolni, és ez alapján vizsgálnánk a másik aktív hely viselkedését.

A celluláz, mannanáz és xylanáz lehetséges kölcsönhatásai cellulóz és lignin oligomerekkel – az elvégzett enzim-ligandum dokkolások eredményei alapján – azt

mutatják, hogy a lignin nagyobb koncentrációban valóban gátolhatja a cellulázok és a xylanázok működését. Valószínű, hogy létezik valamilyen lignin-mannanáz kapcsolat is, amely szintén akár az enzimgátlást is befolyásolhatja. Mindenképpen érdekes és némileg váratlan tapasztalat, hogy a cellulóz oligomer bizonyos körülmények esetén képes gátolni a lignin-peroxidáz működését.

Az enzimek molekulamodellezéssel történő célirányos módosításával kapcsolatos eredmények és trendek után kutatva rendkívül széleskörűen feldolgoztuk a szakirodalmat, ezt külön publikáltuk is (FÜLÖP és ECKER 2020). Ezen áttekintésünk eredményei szinte minden területen zavarba ejtőek. A biomassa előkezelése, valamint a felhasznált enzimek sokfélesége és alkalmazása terén nyilvánvalóan fejlődés történt. A molekulamodellezés területén azonban nagyon kevés előrelépés tapasztalható, legalábbis, ami a meglévő enzimek módosítását illeti, a biomassa feldolgozása során a megváltozott funkció és a környezeti feltételekhez való alkalmazkodás érdekében.

Hasonló a helyzet a szintén rendkívül perspektivikus bioüzemanyag-előállítás terén, ahol szintén lenne lehetőség számítógépes tervezésre. Nagyon alacsony az olyan publikációk mennyisége, amelyekben molekuláris modellezési technikákat alkalmaznak az enzimek működésének javítása és a különböző környezeti feltételekhez való alkalmazkodás érdekében.

Véleményünk szerint a modern számítási, biokémiai és biotechnológiai módszerek alkalmazása lehetővé tenné olyan enzimek célzott tervezését, amelyek hatékonyabbak és alkalmasabbak a biomassa feldolgozására.

9. Summary

Molecular modelling methods are now indispensable in accurately describing the structure-function relationships of enzymes. In addition to classical mechanics, it is also possible to apply quantum chemical-quantum mechanical methods. The latter have the advantage of providing more accurate data but have the disadvantage of being extremely demanding with regard to computational power and can therefore (for the time being) only be used to model the behaviour of small molecules (about 100 atoms). Traditional methods, based on Newtonian equations of motion, are the most appropriate for studying the properties of large biopolymers. The two methodologies are interoperable, since the parameters of small molecules described by quantum chemistry can be incorporated into a mathematical model that can handle them at the level of classical mechanics. These are called force fields. This allows us, for example, to study the interactions between proteins (enzymes) and biologically active substances (ligands).

The interactions of the herbicide atrazine with the extracellular enzyme lignin peroxidase have been investigated to learn more about the structure-function relationships of this non-substrate-specific enzyme. I also reviewed the results of currently used plant biomass processing methods. I also aimed to review methods that have been published but are not currently used.

There are several synthetic biologically active molecules whose interactions with polymer-scale biomolecules can be partially described by molecular dynamics studies. The parameters needed to perform simulations are available for biomolecules (proteins, nucleic acids, lipids and carbohydrates) and many other small-scale compounds of biological relevance. For non-parameterised molecules, parameter sets can be calculated using quantum mechanical-quantum chemical methods.

The optimized geometry, van der Waals, charge, bonding, angular and torsional parameters of atrazine, a photosystem II inhibitor, were calculated by quantum chemical methods and integrated into a CHARMM36 force-field compatible parameter file. The file (PAR), together with the coordinates (PDB), structure (PSF) and topology (TOP), is freely accessible and with these four types of data, atrazine can be included in CHARMM-based molecular dynamics simulations, allowing its interactions with biomolecules to be studied. The result of the parameterization is an atrazine model (ECKER 2016) that behaves more realistically than previous models

whose data were determined solely by analogy and cross-checking with different databases.

Studies have shown that the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is capable of biodegrading atrazine with enzymes of broad specificity, but the specific role of biocatalysts is still not fully understood. In the case of lignin peroxidase, the ligand channel linked to the active hem cofactor provides access to the active site for potential small substrates. Experimental results indicate that lignin peroxidase is unable to degrade atrazine, and our primary objective was to determine whether there is a correlation between the structural and dynamic properties of the enzyme and its inability to degrade atrazine.

The results of the enzyme-ligand docking and molecular dynamics study correlate with the relevant published NMR and molecular dynamics data and provide an answer to the question why lignin peroxidase does not degrade atrazine, which has been previously established experimentally by several authors. The delocalized electronegative s-triazine ring of atrazine forms a bond through its partial charges with the so-called ligand channel of the enzyme (the amino acids that transport substrates to the active site) in such a way that its fluctuation is reduced and therefore atrazine is unable to access the hem periphery. We have succeeded in confirming that the phenomenon observed suggests that the small size of the ligands alone is not a sufficient condition for access to the active site. Their physicochemical properties influence the behaviour of the ligand channel structure (ECKER and FÜLÖP 2018).

Following this work, it would be a logical step to investigate whether the integration of atrazine into the amino acids of the ligand channel affects the activity of the enzyme. This is of particular interest because it is known that lignin peroxidase has another active site, which is assumed to be functionally linked (electron transfer) to the heme scaffold. We might be able to learn more about the relationship between the two - and the function of the enzyme as a whole - if we could manipulate the activity of one of them and use this to investigate the behaviour of the other active site.

Possible interactions of cellulase, mannanase and xylanase with cellulose and lignin oligomers, based on the results of enzyme-ligand docking studies, indicate that lignin at higher concentrations may indeed inhibit the function of cellulases and xylanases. It is also likely that there is some lignin-mannanase interaction that may also affect enzyme inhibition. Furthermore, it is an interesting and somewhat unexpected finding that the cellulose oligomer can inhibit lignin-peroxidase activity under certain conditions.

In our search for results and trends in the targeted modification of enzymes by molecular modelling, we have conducted a very extensive literature review, which we have published separately (FÜLÖP and ECKER 2020). The results of this review are puzzling in almost all areas. There has been a clear improvement in the pre-treatment of biomass and in the diversity and application of the enzymes used. However, there has been very little progress in the field of molecular modelling, at least in terms of modifying existing enzymes to adapt to altered function and environmental conditions during biomass processing.

The situation is similar in the – also very promising – field of biofuel production, where computer-aided design would also be possible. There are very few publications using molecular modelling techniques to improve the functioning of enzymes and their adaptation to different environmental conditions.

We believe that the application of modern computational, biochemical and biotechnological methods would allow the targeted design of enzymes that are more efficient and more suitable for biomass processing.

10. Mellékletek

M1. Irodalomjegyzék

- ADAMS, D.J., ADAMS, E. M., HILLS, G. J. (1979): The computer simulation of polar liquids. In: *Molecular Physics*, 38 (2) 387-400. p.
- AGRAWAL, VERMA, A., SINGHANIA, R. R., VARJANI, S., DONG, C. D., PATEL, A. K. (2021): Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. In: *Bioresource Technology*, 332 125042. p.
- AMORE, A., KNOTT, B. C., SUPEKAR, N. T., SHAJAHAN, H., AZADI, P., ZHAO, P., WELLS, L., LINGER, J. G., HOBDEY, S. E., WALL, T. A. V., SHOLLENBERGER, T., YARBROUGH, J. M., TAN, Z., CROWLEY, M. F., HIMMEL, M. E., DECKER, S. R., BECKHAM, G. T., TAYLOR, L. E. (2017): Distinct roles of N- and O-glycans in cellulase activity and stability. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114 (52) 13667-13672. p.
- ARIAEENEJAD, S., MOUSIVAND, M., MORADI DEZFOULI, P., HASHEMI, M., KAVOUSI, K., HOSSEINI SALEKDEH, G. (2018): A computational method for prediction of xylanase enzymes activity in strains of *Bacillus subtilis* based on pseudo amino acid composition features. In: *Plos One*, 13 (10) e0205796. p.
- ARNOLD, M., TAINTER, J. A., STRUMSKY, D. (2019): Productivity of innovation in biofuel technologies. In: *Energy Policy*, 124 54-62. p.
- AUST, S. D. (1990): Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Microbial Ecology*, 20 (2) 197-209. p.
- BAKER, J., JARZECKI, A. A., PULAY, P. (1998): Direct scaling of primitive valence force constants: An alternative approach to scaled quantum mechanical force fields. In: *The Journal of Physical Chemistry A*, 102 (8) 1412-1424. p.
- BARRAT, J. L., BASCHNAGEL, J., LYULIN, A. (2010): Molecular dynamics simulations of glassy polymers. In: *Soft Matter*, 6 (15) 3430-3446. p.
- BATISTA, P. R., DE SOUZA COSTA, M. G., PASCUTTI, P. G., BISCH, P. M., DE SOUZA, W. (2011): High temperatures enhance cooperative motions between

- CBM and catalytic domains of a thermostable cellulase: mechanism insights from essential dynamics. In: *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13 (30) 13709-13720. p.
- BECKER, O. M., MACKERELL, A. D. JR., ROUX, B., WATANABE, M. (Szerk.) (2001): Computational biochemistry and biophysics. Boca Raton FL: CRC Press, 512 p.
- BELYTSCHKO, T., XIAO, S. P., SCHATZ, G. C., RUOFF, R. S. (2002): Atomistic simulations of nanotube fracture. In: *Physical Review B*, 65 (23) 235430. p.
- BELZUNCES, B., HOYAU, S., BENOIT, M., TARRAT, N., BESSAC, F. (2016): Theoretical study of the atrazine pesticide interaction with pyrophyllite and Ca²⁺-montmorillonite clay surfaces. In: *Journal of Computational Chemistry*, 38 (3) 133-143. p.
- BERLIN, A., BALAKSHIN, M., GILKES, N., KADLA, J., MAXIMENKO, V., KUBO, S., SADDLER, J. (2006): Inhibition of cellulase, xylanase and beta-glucosidase activities by softwood lignin preparations. In: *Journal of Biotechnology*, 125 (2) 198-209. p.
- BIKÁDI, Z., HAZAI, E. (2009): Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. In: *Journal of Cheminformatics*, 1 15. p.
- BLODIG, W., SMITH, A. T., DOYLE, W. A., PIONTEK, K. (2001): Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism. In: *Journal of Molecular Biology*, 305 (4) 851-861. p.
- BLONDEL, A., KARPLUS, M. (1996): New formulation for derivatives of torsion angles and improper torsion angles in molecular mechanics: Elimination of singularities. In: *Journal of Computational Chemistry*, 17 (9) 1132-1141. p.
- BOTELLA, C., DE ORY, I., WEBB, C., CANTERO, D., BLANDINO, A. (2005): Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. In: *Biochemical Engineering Journal*, 26 (2-3) 100-106. p.

- BOUQUARD, C., OUAZZANI, J., PROMÉ, J., MICHEL-BRIAND, Y., PLESIAI, P. (1997): Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (3) 862-866. p.
- BOUTESTEIJN, C., DRABIK, D., VENUS, T. J. (2017): The interaction between EU biofuel policy and first-and second-generation biodiesel production. In: *Industrial Crops and Products*, 106 (1) 124-129. p.
- BROOKS, B. R., BRUCCOLERI, R. E., OLAFSON, B. D., STATES, D. J., SWAMINATHAN, S., KARPLUS, M. (1983): CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. In: *Journal of Computational Chemistry*, 4 (2) 187-217. p.
- BROOKS, C. L., KARPLUS, M., PETTITT, B. M. (Szerk.) (1991): Proteins: A theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics, Volume 71. Hoboken NJ: Wiley, 280 p.
- BU, L., BECKHAM, G. T., SHIRTS, M. R., NIMLOS, M. R., ADNEY, W. S., HIMMEL, M. E., CROWLEY, M. F. (2011): Probing carbohydrate product expulsion from a processive cellulase with multiple absolute binding free energy methods. In: *Journal of Biological Chemistry*, 286 (20) 18161-18169. p.
- CAO, Y., MUSAH, R. A., WILCOX, S. K., GOODIN, D. B., MCREE, D. E. (1998): Protein conformer selection by ligand binding observed with crystallography. In: *Protein Science*, 7 (1) 72-78. p.
- CHAN, Y., ACQUAH, C., OBENG, E. M., DULLAH, E. C., JEEVANANDAM, J., ONGKUDON, C. M. (2019): Parametric study of immobilized cellulase polymethacrylate particle for the hydrolysis of carboxymethyl cellulose. In: *Biochimie*, 157 204-212. p.
- CHANDRA, P., ENESPA, SINGH, R., ARORA, P. K. (2020): Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. In: *Microbial Cell Factories*, 19 (1) 169. p.
- CHEN, M., ZENG, G., TAN, Z., JIANG, M., LI, H., LIU, L., ZHU, Y., YU, Z., WEI, Z., LIU, Y., XIE, G. (2011): Understanding lignin-degrading reactions of ligninolytic enzymes: binding affinity and interactional profile. In: *Plos One*, 6 (9) e25647. p.

- CHISTI, Y. (2008): Biodiesel from microalgae beats bioethanol. In: *Trends in Biotechnology*, 26 (3) 126-131. p.
- CHOINOWSKI, T., BLODIG, W., WINTERHALTER, K. H., PIONTEK, K. (1999): The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C β of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle. In: *Journal of Molecular Biology*, 286 (3) 809-827. p.
- CHUNG, D., SARAI, N. S., KNOTT, B. C., HENGGE, N., RUSSEL, J. F., YARBROUGH, J. M., BRUNECKY, R., YOUNG, J., SUPEKAR, N., WALL, T. V., SAMMOND, D. W., CROWLEY, M. F., SZYMANSKI, C. M., WELLS, L., AZADI, P., WESTPHELING, J., HIMMEL, M. E., BOMBLE, Y. J. (2019): Glycosylation is vital for industrial performance of hyperactive cellulases. In: *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7 (5) 4792-4800. p.
- CLAY, S. A., KOSKINEN, W. C., ALLMARAS, R. R., DOWDY, R. H. (1988): Differences in herbicide adsorption on soil using several soil pH modification techniques. In: *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 23 (6) 559-573. p.
- CLAY, S. A., KOSKINEN, W. C. (1990): Adsorption and desorption of atrazine, hydroxyatrazine, and S-glutathione atrazine on two soils. In: *Weed Science*, 38 (3) 262-266. p.
- COSTA, M. G. S., SILVA, Y. F., BATISTA, P. R. (2018): Computational engineering of cellulase Cel9A-68 functional motions through mutations in its linker region. In: *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20 (11) 7643-7652. p.
- CUI, F., DOLPHIN, D. (1991): Veratryl alcohol as a mediator in lignin model compound biodegradation. In: *Holzforschung*, 45 31-35. p.
- DANCS, G., KAKUCSKA, G., DOBRÁNYI, SZ., ECKER, J., FÜLÖP, L. (2022): Efficient method for the determination of the neutral lipid content of oil-producing microalgae strains required for biodiesel. In: *Fuel*, Bírálattalatt.
- DARDEN, T., YORK, D., PEDERSEN, L. (1993): Particle mesh Ewald: An N \log (N) method for Ewald sums in large systems. In: *Journal of Chemical Physics*, 98 12 10089-10092. p.

- DERIU, M. A., SONCINI, M., ORSI, M., PATEL, M., ESSEX, J. W., MONTEVECCHI, F. M., REDAELLI, A. (2010): Anisotropic elastic network modeling of entire microtubules. In: *Biophysical Journal*, 99 (7) 2190-2199. p.
- DE ROPP, J. S., LA MAR, G. N., WARIISHI, H., GOLD, M. H. (1991): NMR study of the active site of resting state and cyanide-inhibited lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Comparison with horseradish peroxidase. In: *Journal of Biological Chemistry*, 266 (23) 15001-15008. p.
- DITCHFIELD, R., HEHRE, W. J., POPLE, J. A. (1971): Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended Gaussian-type basis for molecular-orbital Studies of organic molecules. In: *The Journal of Chemical Physics*, 54 (2) 724-728. p.
- DOYLE, W. A., BLODIG, W., VEITCH, N. C., PIONTEK, K., SMITH, A. T. (1998): Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. In: *Biochemistry*, 37 (43) 15097-1515. p.
- EATON, R. W., KARNS, J. S. (1991): Cloning and analysis of s-triazine catabolic genes from *Pseudomonas* sp. strain NRRLB-12227. In: *Journal of Bacteriology*, 173 (3) 1215-1222. p.
- ECKER, J. (2016): Generating CHARMM-compatible force field parameters for atrazine. In: *Journal of Universal Science Online*, 3 (1) 1-8. p.
- ECKER, J. FÜLÖP, L. (2014): Molecular modeling of DDT's and its major metabolites' adsorption in the interlaminar space of montmorillonite. In: *Journal of Universal Science Online*, 1 (1) 12-19. p.
- ECKER, J., FÜLÖP, L. (2018): Lignin peroxidase ligand access channel dysfunction in the presence of atrazine. In: *Scientific Reports*, 8 5989. p.
- ELDER, T., GUTIÉRREZ, S. A., KIM, H., RALPH, J., RENCORET, J., RÍO ANDRADE, J. C. (2020): Lignin monomers from beyond the canonical monolignol biosynthetic pathway: another brick in the wall. In: *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8 (3) 4997-5012. p.
- FEIG, M., ONUFRIEV, A., LEE, M. S., IM, W., CASE, D. A., BROOKS, C. L. (2004): Performance comparison of generalized born and Poisson methods in the calculation of electrostatic solvation energies for protein structures. In: *Journal of Computational Chemistry*, 25 (2) 265-284. p.

- FOCK, V. (1930): Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems. In: *Zeitschrift für Physik*, 61 126-148. p.
- FRISCH, M. J., TRUCKS, G. W., SCHLEGEL, H. B., SCUSERIA, G. E., ROBB, M. A., CHEESEMAN, J. R., SCALMANI, G., BARONE, V., MENNUCCI, B., PETERSSON, G. A., NAKATSUJI, H., CARICATO, M., LI, X., HRATCHIAN, H. P., IZMAYLOV, A. F., BLOINO, J., ZHENG, G., SONNENBERG, J. L., HADA, M., EHARA, M., TOYOTA, K., FUKUDA, R., HASEGAWA, J., ISHIDA, M., NAKAJIMA, T., HONDA, Y., KITAO, O., NAKAI, H., VREVEN, T., MONTGOMERY, J. A., JR., PERALTA, J. E., OGLIARO, F., BEARPARK, M., HEYD, J. J., BROTHERS, E., KUDIN, K. N., STAROVEROV, V. N., KOBAYASHI, R., NORMAND, J., RAGHAVACHARI, K., RENDELL, A., BURANT, J. C., IYENGAR, S. S., TOMASI, J., COSSI, M., REGA, N., MILLAM, J. M. KLENE, M., KNOX, J. E., CROSS, J. B., BAKKEN, V., ADAMO, C., JARAMILLO, J., GOMPERS, R., STRATMANN, R. E., YAZYEV, O., AUSTIN, A. J., CAMMI, R., POMELLI, C., OCHTERSKI, J. W., MARTIN, R. L., MOROKUMA, K., ZAKRZEWSKI, V. G., VOTH, G. A. SALVADOR, P., DANNENBERG, J. J., DAPPRICH, S., DANIELS, A. D., FARKAS, Ö., FORESMAN, J. B., ORTIZ, J. V., CIOSŁOWSKI, J., FOX, D. J. (2009): Gaussian 09, Revision B.01. Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- FÜLÖP, L., ECKER, J. (2020): An overview of biomass conversion: exploring new opportunities. In: *PeerJ*, 8 e9586. p.
- FÜLÖP, L., PONYI, T. (1997): Rapid screening for endo- β -1,4-glucanase and endo- β -1,4-mannanase activities and specific measurement using soluble dye-labelled substrates. In: *Journal of Microbiological Methods*, 29 (1) 15-21. p.
- FÜLÖP, L., PONYI, T. (2015): Classification of glycosyl hydrolases based on structural homology. In: *Journal of Universal Science Online*, 2 (1) 1-9. p.
- FÜLÖP, L., TRAN, S. L. P., PRÁGAI, Z., FELFÖLDI, F., PONYI, T. (1996): Cloning and expression of a β -1,4-endoglucanase gene from *Cellulomonas* sp. CelB7 in *Escherichia coli*; purification and characterization of the recombinant enzyme. In: *FEMS Microbiology Letters*, 145 (3) 355-360. p.
- GASTEIGER, J. MARSILI, M. (1978): A new model for calculating atomic charges in molecules. In: *Tetrahedron Letters*, 19 (34) 3181-3184. p.

- GERINI, M. F., ROCCATANO, D., BACIOCCHI, E., DI NOLA, A. (2003): Molecular dynamics simulations of lignin peroxidase in solution. In: *Biophysical Journal*, 84 (6) 3883-3893. p.
- GOETZ, A. J., WALKER, R. H., WEHTJE, G., HAJEK, B. F. (1989): Sorption and mobility of chlorimuron in Alabama soils. In: *Weed Science*, 37 (3) 428-433. p.
- GOLDMAN, B. B., WIPKE, W. T. (2000): QSD quadratic shape descriptors. 2. Molecular docking using quadratic shape descriptors (QSDock). In: *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 38 (1) 79-94. p.
- GOLTAPPEH, E. M., DANESH, Y. R., VARMA, A. (Szerk.) (2013): Fungi as bioremediators. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin. 500 p.
- HALGREN, T. A. (1995): Potential energy functions. In: *Current Opinion in Structural Biology*, 5 (2) 205-210. p.
- HALGREN, T. A. (1996): Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. In: *Journal of Computational Chemistry*, 17 (5-6) 490-519. p.
- HALGREN, T. A. (1996): Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. In: *Journal of Computational Chemistry*, 17 (5-6) 520-552. p.
- HALGREN, T. A. (1996): Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94. In: *Journal of Computational Chemistry*, 17 (5-6) 553-586. p.
- HALGREN, T. A. (1996): Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules. In: *Journal of Computational Chemistry*, 17 (5-6) 616-641. p.
- HALGREN, T. A. (1999): MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. In: *Journal of Computational Chemistry*, 20 (7) 720-729. p.
- HALGREN, T. A., NACHBAR, R. B. (1996): Merck molecular force field. IV. Conformational energies and geometries for MMFF94. In: *Journal of Computational Chemistry*, 17 (5-6) 587-615. p.
- HANWELL, M. D., CURTIS, D. E., LONIE, D. C., VANDERMEERSCH, T., ZUREK, E., HUTCHISON, G. R. (2012): Avogadro: An advanced semantic

- chemical editor, visualization, and analysis platform. In: *Journal of Cheminformatics*, 4 (1) 17. p.
- HARIHARAN, P. C., POPLE, J. A. (1973): The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. In: *Theoretica Chimica Acta*, 28 (3) 213-222. p.
- HAARMEYER, C. N., SMITH, M. D., CHUNDAWAT, S. P. S., SAMMOND, D., WHITEHEAD, T. A. (2017): Insights into cellulase-lignin non-specific binding revealed by computational redesign of the surface of green fluorescent protein. In: *Biotechnology and Bioengineering*, 114 (4) 740-750. p.
- HARTREE, D. (1928): The wave mechanics of an atom with a non-Coulomb central field. Part II. Some results and discussion. In: *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 24 (1) 111-132. p.
- HEHRE, W. J., DITCHFIELD, R., POPLE, J. A. (1972): Self-consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules. In: *The Journal of Chemical Physics*, 56 (5) 2257-2261. p.
- HEINZE, T., SEOUD, O. A. E., KOSCHELLA, A. (2018): Cellulose derivatives: synthesis, structure, and properties. Cham: Springer Cham. 564 p.
- HEKMAT, O., LO LEGGIO, L., ROSENGREN, A., KAMARAUSKAITE, J., KOLENOVA, K., STÅLBRAND, H. (2010): Rational engineering of mannosyl binding in the distal glycone subsites of *Cellulomonas fimi* endo-beta-1,4-mannanase: mannosyl binding promoted at subsite -2 and demoted at subsite -3. In: *Biochemistry*, 49 (23) 4884-4896. p.
- HICKEY, W. J., FUSTER, D. J., LAMAR, R. T. (1994): Transformation of atrazine in soil by *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Soil Biology and Biochemistry*, 26 (12) 1665-1671. p.
- HOUFANI, A. A., ANDERS, N., SPIESS, A. C., BALDRIAN, P., BENALLAOUA, S. (2020): Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars: a review. In: *Biomass and Bioenergy*, 134 105481. p.

- HUANG, J. MACKERELL, A. D. JR. (2013): CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. In: *Journal of Computational Chemistry*, 34 (25) 2135-2145. p.
- HUMPHREY, W., DALKE, A., SCHULTEN, K. (1996): VMD: visual molecular dynamics. In: *Journal of Molecular Graphics*, 14 (1) 33-38. p.
- JAEGER, V., BURNEY, P., PFAENDTNER, J. (2015): Comparison of three ionic liquid-tolerant cellulases by molecular dynamics. In: *Biophysical Journal*, 108 (4) 880-892. p.
- JENSEN, F. (2007): Introduction to computational chemistry. 2nd ed. Hoboken NJ: Wiley. 618 p.
- JENSEN, J. H. (2010): Molecular modeling basics. Boca Raton FL: CRC Press. 190 p.
- JORGENSEN, W. L. (1991): Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. In: *Science*, 254 (5034) 954-955. p.
- KÄSTNER, J., THIEL, S., SENN, H. M., SHERWOOD, P., THIEL, W. (2007): Exploiting QM/MM capabilities in geometry optimization: A microiterative approach using electrostatic embedding. In: *Journal of Chemical Theory and Computation*, 3 (3) 1064-1072. p.
- KAUFMAN, D. D., BLAKE, J. (1970): Degradation of atrazine by soil fungi. In: *Soil Biology and Biochemistry*, 2 (2) 73-80. p.
- KELLOCK, M., RAHIKAINEN, J., MARJAMAA, K., KRUIUS, K. (2017): Lignin-derived inhibition of monocomponent cellulases and a xylanase in the hydrolysis of lignocellulosics. In: *Bioresource Technology*, 232 183-191. p.
- KITCHEN, D., DECORNEZ, H., FURR, J. R., BAJORATH, J. (2004): Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. In: *Nature Reviews Drug Discovery*, 3 935-949. p.
- KOJIMA, Y., TAKAYASU, M., TOMA, M., KODA, S. (2019): Degradation of cellulose in NaOH and NaOH/urea aqueous solutions by ultrasonic irradiation. In: *Ultrasonics Sonochemistry*, 51 419-423. p.
- KREMER, K., GREEST, G. S. (1990): Dynamics of entangled linear polymer melts: A molecular dynamics simulation. In: *The Journal of Chemical Physics*, 92 5057. p.

- KRISHNARAJ, R. N., SAMANTA, D., KUMAR, A., SANI, R. (2017): Bioprospecting of thermostable cellulolytic enzymes through modeling and virtual screening method. In: *Canadian Journal of Biotechnology*, 1 (1) 19-25. p.
- LAMAR, R. T. (1992): The role of fungal lignin-degrading enzymes in xenobiotic degradation. In: *Current Opinion in Biotechnology*, 3 261-266. p.
- LEACH, A. R. (2001): Molecular modelling: Principles and applications. 2nd ed. Richmond VA: Longman Pub Group. 768 p.
- LEHTOLA, S. (2019): A review on non-relativistic, fully numerical electronic structure calculations on atoms and diatomic molecules. In: *International Journal of Quantum Chemistry*, 119 (19) e25968. p.
- LEE, I., YU, J. (2020): The production of fermentable sugar and bioethanol from acacia wood by optimizing dilute sulfuric acid pretreatment and post treatment. In: *Fuel*, 275 117943. p.
- LEI, Z. F., YE, C. M., WANG, X. J. (2001): Hydrolysis kinetics of atrazine and influence factors. In: *Journal of Environmental Sciences (China)*, 13 (1) 99-103. p.
- LENGAUER, T., RAREY, M. (1996): Computational methods for biomolecular docking. In: *Current Opinion in Structural Biology*, 6 (3) 402-406. p.
- LI, M., JIANG, B., WU, W., WU, S., YANG, Y., SONG, J., AHMAD, M., JIN, Y. (2022): Current understanding and optimization strategies for efficient lignin-enzyme interaction: A review. In: *International Journal of Biological Macromolecules*, 195 274-286. p.
- LI, T., MA, H., WU, S., YIN, Y. (2020): Effect of highly selective oxypropylation of phenolic hydroxyl groups on subsequent lignin pyrolysis: toward the lignin valorization. In: *Energy Conversion and Management*, 207 112551. p.
- LI, X., ZHENG, Y. (2017): Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. In: *Biotechnology Advances*, 35 (4) 466-489. p.
- LIU, Z., CLAY, S. A., CLAY, D. E., HARPER, S. S. (1995): Ammonia fertilizer influences atrazine adsorption-desorption characteristics. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (3) 815-819. p.

- LIU, H., SALE, K. L., HOLMES, B. M., SIMMONS, B. A., SINGH, S. (2010): Understanding the interactions of cellulose with ionic liquids: a molecular dynamics study. In: *Journal of Physical Chemistry B*, 114 (12) 4293-4301. p.
- LÓPEZ, C. A., RZEPIELA, A. J., DE VRIES, A. H., DIJKHUIZEN, L., HÜNENBERGER, P. H., MARRINK, S. J. (2009): Martini coarse-grained force field: extension to carbohydrates. In: *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5 (12) 3195-3210. p.
- LYUBARTSEV, A. P., RABINOVICH, A. L. (2011): Recent development in computer simulations of lipid bilayers. In: *Soft Matter*, 7 (1) 25-39. p.
- MACKERELL, A. D. JR. (2004): Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues. In: *Journal of Computational Chemistry*, 25 (13) 1584-1604. p.
- MACKERELL, A. D. JR., KARPLUS, M. (1991): Importance of attractive van der Waals contribution in empirical energy function models for the heat of vaporization of polar liquids. In: *Journal of Physical Chemistry*, 95 (26) 10559-10560. p.
- MAHJOUR, N., SAHEBI, H., MAZDEH, M., TEYMOURI, A. (2020): Optimal design of the second and third generation biofuel supply network by a multi objective model. In: *Journal of Cleaner Production*, 256 120355. p.
- MASAPHY, S., LEVANON, D., VAYA, J., HENIS, Y. (1993): Isolation and characterization of a novel atrazine metabolite produced by the fungus *Pleurotus pulmonarius*, 2-chloro-4-ethylamino-6-(1-hydroxyisopropyl)amino-1,3,5-triazine. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (12) 4342-4346. p.
- MAYNE, C. G., SAAM, J., SCHULTEN, K., TAJKHORSHID, E., GUMBART, J. C. (2013): Rapid parameterization of small molecules using the Force Field Toolkit. In: *Journal of Computational Chemistry*, 34 (32) 2757-2770. p.
- MCCAMMON, J. A., HARVEY, S. C. (1987): Dynamics of proteins and nucleic acids. New York NY: Cambridge University Press. 248 p.
- MCGLAMERY, M. D., SLIFE, F. W. (1966): The adsorption and desorption of atrazine as affected by pH, temperature, and concentration. In: *Weeds*, 14 (3) 237-239. p.

- MENG, X. Y., ZHANG, H. X., MEZEI, M., CUI, M. (2011): Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. In: *Current Computer-Aided Drug Design*, 7 (2) 146-157. p.
- MØLLER, C., PLESSET, M. S. (1934): Note on an approximation treatment for many-electron systems. In: *Physical Review Letters*, 46 (7) 618-622. p.
- MORRIS, G. M., GOODSSELL, D. S., HALLIDAY, R. S., HUEY, H., HART, W. E., BELEW, R. K., OLSON, A. J. (1998): Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. In: *Journal of Computational Chemistry*, 19 (14) 1639-1662. p.
- MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSSELL, D. S., OLSON, A. J. (2009): Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. In: *Journal of Computational Chemistry*, 16 2785-2791. p.
- MOUGIN, C., LAUGERO, C., ASTHER, M., DUBROCA, J., FRASSE, P., ASTHER, M. (1994): Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (2) 705-708. p.
- MUHAMMAD, A., KHUNRAE, P., SUTTHIBUTPONG, T. (2020): Effects of oligolignol sizes and binding modes on a GH11 xylanase inhibition revealed by molecular modeling techniques. In: *Journal of Molecular Modeling*, 26 (6) 124. p.
- NIELSEN, S. O., ENSING, B., ORTIZ, V., MOORE, P. B., KLEIN, M. L. (2005): Lipid bilayer perturbations around a transmembrane nanotube: A coarse grain molecular dynamics study. In: *Biophysical Journal*, 88 (6) 3822-3828. p.
- O'FALLON, J. V., BUSBOOM, J. R., NELSON, M. L., GASKINS, C. T. (2007): A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. In: *Journal of Animal Science*, 85 (6) 1511-1521. p.
- ORSI, M. (2014): Molecular dynamics simulation of humic substances. In: *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1 (1) 1-14. p.
- ORSI, M., HAUBERTIN, D. Y., SANDERSON, W. E., ESSEX, J. W. (2008): A quantitative coarse-grain model for lipid bilayers. In: *The Journal of Physical Chemistry*, 112 (3) 802-815. p.

- PARTON, D. L., KLINGELHOEFER, J. W., SANSOM, M. S. P. (2011): Aggregation of model membrane proteins modulated by hydrophobic mismatch, membrane curvature, and protein class. In: *Biophysical Journal*, 101 (3) 691-699. p.
- PAYNE, C. M., BOMBLE, Y. J., TAYLOR, C. B., MCCABE, C., HIMMEL, M. E., CROWLEY, M. F., BECKHAM, G. T. (2011): Multiple functions of aromatic carbohydrate interactions in a processive cellulase examined with molecular simulation. In: *Journal of Biological Chemistry*, 286 (47) 41028-41035. p.
- PAYNE, C. M., RESCH, M. G., CHEN, L., CROWLEY, M. F., HIMMEL, M. E., TAYLOR, L.E., SANDGREN, M., STÄHLBERG, J., STALS, I., TAN, Z., BECKHAM, G. T. (2013): Glycosylated linkers in multimodular lignocellulose degrading enzymes dynamically bind to cellulose. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (36) 14646-14651. p.
- PEREZ, J., JEFFRIES, T. W. (1992): Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (8) 2402-2409. p.
- PHILLIPS, J. C., BRAUN, R., WANG, W., GUMBART, J., TAJKHORSHID, E., VILLA, E., CHIPOT, C., SKEEL, R. D., KALÉ, L., SCHULTEN, K. (2005): Scalable molecular dynamics with NAMD. In: *Journal of Computational Chemistry*, 26 (16) 1781-1802. p.
- POINTING, S. (2001): Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (1-2) 20-33. p.
- POULOS, T. L., EDWARDS, S. L., WARIISHI, H., GOLD, M. H. (1993): Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. In: *Journal of Biological Chemistry*, 268 (6) 4429-4440. p.
- PRAJAPATI, A. S., PANCHAL, K. J., PAWAR, W. A., NORONHA, M. J., SUBRAMANIAN, R. B. (2018): Review on cellulase and xylanase engineering for biofuel production. In: *Industrial Biotechnology*, 14 (1) 38-44. p.
- RAPAPORT, D. C. (2002): Molecular dynamics simulation of polymer helix formation using rigid-link methods. In: *Physical Review E*, 66 (1) 011906. p.
- REDDY, C. A. (1995): The potential for white-rot fungi in the treatments of pollutants. In: *Current Opinion in Biotechnology*, 6 (3) 320-328. p.

- REIHER, W. E. (1985): Theoretical Studies of Hydrogen Bonding. Ph.D. disszertáció, Harvard University.
- RODRIGUEZ-CANTO, W., CHEL-GUERRERO, L., FERNANDEZ, V. V. A., AGUILAR-VEGA, M. (2019): Delonix regia galactomannan hydrolysates: rheological behavior and physicochemical characterization. In: *Carbohydrate Polymers*, 206 573-582. p.
- ROSENAU, T., POTTHAST, A., HELL, J. (Szerk.) (2018): Cellulose science and technology: chemistry, analysis, and applications. Hoboken NJ: Wiley. 480 p.
- ROSS, N. W., JOHNSON, K. G., BRAUN, C., MACKENZIE, C. R., SCHNEIDER, H. (1992): Enzymic hydrolysis of water-soluble lignin-carbohydrate complexes from Populus deltoides: Effects of combinations of β -mannanases, xylanase, and acetyl xylan esterase. In: *Enzyme and Microbial Technology*, 14 (2) 90-95. p.
- SAHARAY, M., GUO, H., SMITH, J. C. (2010): Catalytic mechanism of cellulose degradation by a cellobiohydrolase, CelS. In: *Plos One*, 5 (10) e12947. p.
- SAKON, J., IRWIN, D., WILSON, D. B., KARPLUS, P. A. (1997): Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from Thermomonospora fusca. In: *Natural Structural Biology*, 4 (10) 810-818. p.
- SATARI, B., KARIMI, K., KUMAR, R. (2019): Cellulose solvent-based pretreatment for enhanced second-generation biofuel production: a review. In: *Sustainable Energy & Fuels*, 3 (1) 11-62. p.
- SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D., INBAR, Y., NUSSINOV, R., WOLFSON, H. J. (2005): PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. In: *Nucleic Acids Research*, 33 W363-367. p.
- SETÄLÄ, H., ALAKOMI, H. L., PAANANEN, A., SZILVAY, G. R., KELLOCK, M., LIEVONEN, M., LILJESTRÖM, V., HULT, E. L., LINTINEN, K., ÖSTERBERG, M., KOSTIAINEN, M. (2020): Lignin nanoparticles modified with tall oil fatty acid for cellulose functionalization. In: *Cellulose*, 27 (1) 273-284. p.
- SHAKHMATOV, E. G., TOUKACH, P. V., MAKAROVA, E. N. (2020): Structural studies of the pectic polysaccharide from fruits of Punica granatum. In: *Carbohydrate Polymers*, 235 115978. p.

- SHOICHET, B. K., KUNTZ, I. D., BODIAN, D. L. (1992): Molecular docking using shape descriptors. In: *Journal of Computational Chemistry*, 13 (3) 380-397. p.
- SHUANGXI, N., NINGKE, H., KUN, Z., CHUYUE, X., SHUANGFEI, W. (2020): Cellulose nanofibers and other biopolymers for biomedical applications: a review. In: *Cellulose*, 27 (8) 41734187. p.
- SILVEIRA, R. L., SKAF, M. S. (2015): Molecular dynamics simulations of Family 7 cellobiohydrolase mutants aimed at reducing product inhibition. In: *Journal of Physical Chemistry B*, 119 (29) 9295-9303. p.
- SOKHAN, V. P., TILDESLEY, D. J. (1979): The free surface of water: molecular orientation, surface potential and nonlinear susceptibility. In: *Molecular Physics*, 92 (4) 625-640. p.
- SONCINI, M., VESENTINI, S., RUFFONI, D., ORSI, M., DERIU, M. A., REDAELLI, A. (2007): Mechanical response and conformational changes of alpha-actinin domains during unfolding: a molecular dynamics study. In: *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 6 399-407. p.
- STODDARD, S. J., FORD, J. (1973): Numerical experiments on the stochastic behavior of a Lennard-Jones gas system. In: *Physical Review A*, 8 (3) 1504-1512. p.
- STOFFELS, P., MÜLLER, M. J., STACHURSKI, S., TERFRÜCHTE, M., SCHRÖDER, S., IHLING, N., WIERCKX, N., FELDBRÜGGE, M., SCHIPPER, K., BÜCHS, J. (2020): Complementing the intrinsic repertoire of *Ustilago maydis* for degradation of the pectin backbone polygalacturonic acid. In: *Journal of Biotechnology*, 307 148-163. p.
- STONE, J. E. (1998): An efficient library for parallel ray tracing and animation. Diplomadolgozat, University of Missouri-Rolla.
- STRONG, L. C., ROSENDAHL, C., JOHNSON, G., SADOWSKY, M. J., WACKETT, L. P. (2002): *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (12) 5973-5980. p.
- STRUTHERS, J. K., JAYACHANDRAN, K., MOORMAN, T. B. (1998): Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain

- in bioremediation of contaminated soil. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9) 3368-3375. p.
- SWOPE, W. C., ANDERSEN, H. C., BERENS, P. H., WILSON, K. R. (1982): A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. In: *The Journal of Chemical Physics*, 76 (1) 637. p.
- TAMBOLI, A. S., WAGHMARE, P. R., KHANDARE, R. V., GOVINDWAR, S. P. (2017): Comparative analyses of enzymatic activity, structural study and docking of fungal cellulases. In: *Gene Reports*, 9 54-60. p.
- VARNIK, F., BASCHNAGEL, J., BINDER, K. (2000): Molecular dynamics results on the pressure tensor of polymer films. In: *The Journal of Chemical Physics*, 113 4444. p.
- VÁRNAI, A., HUIKKO, L., PERE, J., SIIKA-AHO, M., VIKARI, L. (2011): Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. In: *Bioresource Technology*, 102 (19) 9096-9104. p.
- VEGA, C., ABASCAL, J. L. F. (2011): Simulating water with rigid non-polarizable models: a general perspective. In: *Physical Chemistry Chemical Physics*, 44 (13) 19663-19688. p.
- WANG, D., LIN, Y., DU, W., LIANG, J., NING, Y. (2013): Optimization and characterization of lignosulfonate biodegradation process by a bacterial strain, *Sphingobacterium* sp. HY-H. In: *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85 365-371. p.
- WEI, B. Q., WEAVER, L. H., FERRARI, A. M., MATTHEWS, B. W., SHOICHET, B. K. (2004): Testing a flexible receptordocking algorithm in a model binding site. In: *Journal of Molecular Biology*, 337 (5) 1161-1182. p.
- WELTI-CHANES, J., SERNA-SALDÍVAR, S., CAMPANELLA, O., TEJADA-ORTIGOZA, V. (Szerk.) (2020): Science and Technology of Fibers in Food Systems. Cham: Springer Cham 478 p.
- WHITEHEAD, T. A., BANDI, C. K., BERGER, M., PARK, J., CHUNDAWAT, S. P. S. (2017): Negatively supercharging cellulases render them lignin-resistant. In: *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5 (7) 6247-6252. p.

- WILLIAMS, S. J., NOTENBOOM, V., WICKI, J., ROSE, D. R., WITHERS, S. G. (2000): A new, simple, high-affinity glycosidase inhibitor: Analysis of binding through X-ray crystallography, mutagenesis, and kinetic analysis. In: *Journal of the American Chemical Society*, 122 (17) 4229-4230. p.
- WOHLERT, J., BERGLUND, L. A. (2011): A coarse-grained model for molecular dynamics simulations of native cellulose. In: *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7 (3) 753-760. p.
- XIANG, T. X., ANDERSON, B. D. (2006): Liposomal drug transport: A molecular perspective from molecular dynamics simulations in lipid bilayers. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (12-13) 1357-1378. p.
- YANG, Y., TIAN, Z., LAN, Y., WANG, S., CHEN, H. (2021): An overview of biofuel power generation on policies and finance environment, applied biofuels, device and performance. In: *Journal of Traffic and Transportation Engineering (English Edition)*, 8 (4) 534-553. p.
- YANZE-KONTCHU, C., GSCHWIND, N. (1994): Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (12) 4297-4302. p.
- YORK, D. M., LEE, T. S., YANG, W. (1996): Quantum mechanical study of aqueous polarization effects on biological macromolecules. In: *Journal of the American Chemical Society*, 118 (44) 10940-10941. p.
- ZANG, J., RYU, S., PUGNO, N., WANG, Q., TU, Q., BUEHLER, M. J., ZHAO, X. (2013): Multifunctionality and control of the crumpling and unfolding of large-area graphene. In: *Nature Materials*, 12 (4) 321-325. p.

M2. A ligandumcsatorna fluktuációja atrazin jelenlétében

M2. táblázat. A ligandumcsatorna fluktuációja atrazin jelenlétében a pontos RMSD értékekkel.

frame	mol0	mol1	mol2	mol3	frame	mol0	mol1	mol2	mol3
0	1.946	1.879	1.584	0.385	75	1.984	1.392	1.311	0.643
1	1.79	1.555	1.68	0.482	76	1.941	1.464	1.612	0.563
2	1.779	1.521	1.629	0.496	77	1.916	1.214	1.606	0.556
3	1.677	1.595	1.621	0.512	78	2.004	1.298	1.623	0.531
4	1.844	1.471	1.718	0.487	79	1.935	1.451	1.619	0.527
5	1.75	1.321	1.66	0.461	80	1.911	1.556	1.481	0.431
6	1.898	1.214	1.628	0.431	81	1.967	1.571	1.687	0.676
7	1.699	1.507	1.542	0.406	82	1.937	1.623	1.596	0.521
8	1.822	1.261	1.508	0.496	83	1.999	1.644	1.582	0.524
9	1.674	1.31	1.74	0.589	84	1.845	1.687	1.612	0.449
10	1.649	1.226	1.556	0.601	85	1.828	1.403	1.598	0.412
11	1.729	1.179	1.57	0.47	86	1.873	1.506	1.453	0.559
12	1.765	1.201	1.591	0.692	87	1.873	1.617	1.45	0.525
13	1.69	1.321	1.578	0.571	88	1.72	1.603	1.405	0.488
14	1.761	1.396	1.549	0.469	89	1.784	1.518	1.492	0.637
15	1.749	1.442	1.592	0.6	90	1.783	1.531	1.488	0.537
16	1.673	1.33	1.627	0.521	91	1.809	1.625	1.513	0.489
17	1.685	1.407	1.755	0.693	92	1.915	1.641	1.372	0.622
18	1.732	1.317	1.65	0.657	93	1.709	1.67	1.535	0.668
19	1.759	1.36	1.636	0.593	94	1.937	1.503	1.496	0.587
20	1.653	1.638	1.548	0.67	95	1.89	1.661	1.49	0.536
21	1.641	1.565	1.592	0.667	96	1.616	1.588	1.425	0.565
22	1.722	1.475	1.72	0.614	97	1.832	1.516	1.347	0.593
23	1.913	1.46	1.782	0.554	98	1.674	1.679	1.571	0.696
24	1.708	1.574	1.732	0.603	99	1.806	1.548	1.573	0.76
25	1.818	1.599	1.773	0.65	100	1.695	1.584	1.518	0.74
26	1.657	1.578	1.756	0.427	101	1.626	1.468	1.585	0.782
27	1.911	1.531	1.633	0.598	102	1.794	1.499	1.469	0.717
28	1.684	1.432	1.565	0.521	103	1.863	1.344	1.423	0.598
29	1.748	1.563	1.601	0.478	104	1.692	1.425	1.68	0.554
30	1.784	1.739	1.6	0.598	105	1.885	1.637	1.514	0.609
31	1.874	1.648	1.784	0.523	106	1.719	1.582	1.505	0.605
32	1.887	1.552	1.663	0.572	107	1.902	1.572	1.496	0.62
33	1.836	1.487	1.807	0.471	108	1.979	1.644	1.584	0.555
34	1.858	1.401	1.508	0.465	109	1.901	1.654	1.618	0.672
35	1.958	1.422	1.757	0.687	110	1.91	1.734	1.527	0.779
36	1.863	1.345	1.697	0.531	111	1.889	1.679	1.447	0.642
37	1.941	1.427	1.831	0.559	112	1.911	1.633	1.52	0.701
38	1.768	1.42	1.695	0.571	113	1.872	1.508	1.571	0.734
39	1.9	1.512	1.789	0.461	114	1.736	1.502	1.471	0.815
40	1.834	1.53	1.758	0.515	115	1.62	1.62	1.447	0.787
41	1.686	1.543	1.692	0.526	116	1.731	1.652	1.537	0.924

42	1.805	1.546	1.741	0.548	117	1.843	1.643	1.474	0.644
43	1.773	1.609	1.815	0.598	118	1.883	1.797	1.479	0.674
44	1.889	1.514	1.779	0.559	119	1.833	1.668	1.279	0.948
45	1.884	1.59	1.819	0.768	120	1.759	1.717	1.473	0.701
46	1.725	1.68	1.733	0.75	121	1.775	1.665	1.596	0.737
47	1.883	1.713	1.645	0.676	122	1.718	1.698	1.461	0.788
48	1.889	1.48	1.88	0.703	123	1.627	1.676	1.535	0.882
49	1.827	1.642	1.674	0.628	124	1.758	1.675	1.451	0.957
50	1.983	1.459	1.628	0.556	125	1.727	1.61	1.455	0.809
51	2.076	1.634	1.758	0.478	126	1.711	1.719	1.496	0.712
52	2.012	1.565	1.659	0.587	127	1.742	1.643	1.395	0.516
53	2.054	1.59	1.673	0.513	128	1.841	1.592	1.553	0.687
54	1.958	1.474	1.856	0.514	129	1.873	1.699	1.533	0.751
55	1.864	1.5	1.847	0.33	130	1.804	1.811	1.488	0.749
56	2.004	1.397	1.687	0.449	131	1.815	1.585	1.6	0.607
57	2.107	1.391	1.544	0.495	132	1.746	1.607	1.421	0.737
58	1.968	1.645	1.58	0.533	133	1.828	1.618	1.601	0.696
59	2.012	1.396	1.527	0.56	134	1.806	1.756	1.564	0.679
60	1.93	1.438	1.77	0.592	135	1.85	1.556	1.463	0.778
61	1.897	1.412	1.703	0.625	136	2.07	1.694	1.557	0.772
62	1.919	1.487	1.738	0.577	137	1.964	1.791	1.582	0.621
63	1.935	1.537	1.538	0.567	138	1.931	1.551	1.49	0.767
64	1.779	1.459	1.627	0.49	139	1.971	1.645	1.494	0.778
65	1.864	1.338	1.711	0.557	140	1.79	1.74	1.414	0.794
66	1.816	1.422	1.777	0.631	141	1.817	1.809	1.535	0.758
67	1.895	1.513	1.78	0.506	142	1.896	1.843	1.407	0.82
68	1.933	1.605	1.689	0.464	143	1.973	1.708	1.552	0.71
69	1.978	1.497	1.769	0.499	144	1.818	1.639	1.619	0.719
70	1.975	1.6	1.724	0.631	145	1.78	1.678	1.533	0.784
71	1.933	1.619	1.713	0.698	146	1.687	1.604	1.539	0.696
72	1.997	1.665	1.621	0.585	147	1.718	1.444	1.372	0.775
73	2.024	1.339	1.534	0.65	148	1.773	1.693	1.396	0.757
74	1.911	1.422	1.425	0.503					

M3. A ligandum csatorna aminosav-atrazin komplex

M3. táblázat. A ligandum csatorna aminosav-atrazin komplex nem kötő kölcsönhatásainak energiataralma (kcal mol⁻¹) különböző időskálákon a pontos értékekkel.

Idő	Elek	vdW	Teljes	Idő	Elek	vdW	Teljes
0	-7.4709	-10.4314	-17.9023	75	-3.4239	-10.1911	-13.615
1	-12.1281	-9.9431	-22.0712	76	-6.6767	-12.2073	-18.884
2	-11.3422	-10.1933	-21.5355	77	-5.6607	-10.4795	-16.1402
3	-6.5391	-10.0846	-16.6237	78	-11.9264	-7.1663	-19.0927
4	-2.0955	-9.7358	-11.8313	79	-11.9268	-8.9503	-20.8771
5	-4.4512	-10.4673	-14.9185	80	-9.7965	-10.9197	-20.7162
6	-4.1313	-9.3472	-13.4785	81	-7.8178	-12.1543	-19.9721
7	-1.1675	-11.0039	-12.1714	82	-7.2377	-10.68	-17.9177
8	-7.815	-9.9521	-17.7671	83	-8.0786	-9.8092	-17.8878
9	-6.6544	-10.039	-16.6934	84	-13.5424	-4.6653	-18.2077
10	-2.5587	-10.5044	-13.0631	85	-8.9867	-10.535	-19.5217
11	-5.903	-9.0266	-14.9296	86	-7.8642	-11.5144	-19.3786
12	-6.2229	-10.1595	-16.3824	87	-9.669	-10.7121	-20.3811
13	-4.6935	-11.5896	-16.2831	88	-12.5061	-9.9365	-22.4426
14	-5.0447	-9.4102	-14.4549	89	-11.9688	-12.1531	-24.1219
15	-6.1955	-11.1415	-17.337	90	-6.4641	-10.6992	-17.1633
16	-5.1193	-11.5211	-16.6404	91	-7.4763	-11.8597	-19.336
17	-2.8444	-9.4922	-12.3366	92	-7.494	-11.6435	-19.1375
18	-4.6984	-12.459	-17.1574	93	-7.6899	-11.609	-19.2989
19	-11.4236	-8.1752	-19.5988	94	-10.5145	-10.537	-21.0515
20	-5.0097	-11.6048	-16.6145	95	-8.4552	-10.0281	-18.4833
21	-5.4115	-11.8309	-17.2424	96	-6.356	-12.9454	-19.3014
22	-8.4511	-10.8729	-19.324	97	-9.0963	-9.9634	-19.0597
23	-7.2112	-10.7655	-17.9767	98	-7.8478	-12.0747	-19.9225
24	-5.0463	-6.8555	-11.9018	99	-9.9772	-9.8999	-19.8771
25	-7.3904	-12.7418	-20.1322	100	-9.6371	-9.7095	-19.3466
26	-3.5035	-11.1101	-14.6136	101	-11.4764	-11.6455	-23.1219
27	-6.9493	-10.4138	-17.3631	102	-7.5937	-9.7733	-17.367
28	-7.0559	-12.3234	-19.3793	103	-10.9488	-8.6576	-19.6064
29	-11.3054	-12.0901	-23.3955	104	-9.8183	-10.1477	-19.966
30	-10.3689	-12.2897	-22.6586	105	-11.5968	-9.8863	-21.4831
31	-6.5283	-10.3618	-16.8901	106	-8.6011	-11.1823	-19.7834
32	-6.1931	-12.0266	-18.2197	107	-9.2047	-10.4438	-19.6485
33	-1.4433	-10.4695	-11.9128	108	-10.3115	-11.4048	-21.7163
34	-8.4571	-10.1784	-18.6355	109	-9.26	-10.8889	-20.1489
35	-0.7545	-8.8154	-9.5699	110	-4.7329	-10.5073	-15.2402
36	-5.0404	-7.4067	-12.4471	111	-13.9487	-11.0568	-25.0055
37	-11.2095	-10.6896	-21.8991	112	-6.5886	-9.5939	-16.1825
38	-7	-11.1475	-18.1475	113	-7.0816	-11.7385	-18.8201
39	-3.0619	-11.4425	-14.5044	114	-11.4705	-9.594	-21.0645
40	-6.6039	-9.9841	-16.588	115	-10.3713	-10.9781	-21.3494
41	-7.7375	-11.1625	-18.9	116	-6.9008	-11.0284	-17.9292

42	-4.8664	-12.8925	-17.7589	117	-11.2625	-10.8588	-22.1213
43	-6.521	-6.3684	-12.8894	118	-13.758	-7.3037	-21.0617
44	-8.0931	-7.9349	-16.028	119	-11.3468	-11.1366	-22.4834
45	-7.3767	-12.6073	-19.984	120	-8.5373	-10.1533	-18.6906
46	-5.7253	-9.1793	-14.9046	121	-8.8116	-11.8598	-20.6714
47	-6.8341	-11.6663	-18.5004	122	-11.4358	-9.5899	-21.0257
48	-5.1539	-10.7587	-15.9126	123	-9.959	-8.9586	-18.9176
49	-7.4888	-9.8835	-17.3723	124	-11.6204	-8.6735	-20.2939
50	-10.0156	-10.9487	-20.9643	125	-6.1156	-11.0254	-17.141
51	-10.0443	-11.8678	-21.9121	126	-8.5671	-10.7063	-19.2734
52	-9.5598	-10.7476	-20.3074	127	-8.7926	-9.5851	-18.3777
53	-5.4059	-9.7129	-15.1188	128	-6.8628	-11.5302	-18.393
54	-8.8439	-11.2322	-20.0761	129	-10.1897	-11.6855	-21.8752
55	-4.7586	-10.333	-15.0916	130	-12.0794	-9.5288	-21.6082
56	-10.7183	-8.8484	-19.5667	131	-9.6109	-11.5393	-21.1502
57	-4.5875	-10.794	-15.3815	132	-9.4206	-12.9441	-22.3647
58	-5.34	-12.3408	-17.6808	133	-6.8431	-7.3044	-14.1475
59	-8.7946	-10.8806	-19.6752	134	-8.3945	-8.8328	-17.2273
60	-7.2243	-9.6683	-16.8926	135	-8.3868	-11.5936	-19.9804
61	-10.507	-10.3235	-20.8305	136	-6.4746	-10.5524	-17.027
62	-5.8676	-9.4671	-15.3347	137	-7.1736	-11.812	-18.9856
63	-7.1637	-11.4385	-18.6022	138	-5.9053	-12.4532	-18.3585
64	-7.1314	-11.924	-19.0554	139	-4.8326	-9.9526	-14.7852
65	-4.5241	-13.1945	-17.7186	140	-6.9253	-11.8214	-18.7467
66	-8.6095	-11.3977	-20.0072	141	-3.8519	-10.7806	-14.6325
67	-6.738	-11.4809	-18.2189	142	-3.5413	-12.4961	-16.0374
68	-5.8486	-12.3812	-18.2298	143	-1.4389	-9.3447	-10.7836
69	-6.6619	-11.3502	-18.0121	144	-5.2442	-11.7935	-17.0377
70	-4.1002	-13.8829	-17.9831	145	-7.8197	-8.6673	-16.487
71	-5.9729	-10.9837	-16.9566	146	-4.4768	-10.6413	-15.1181
72	-3.0458	-11.3534	-14.3992	147	-10.3015	-10.6956	-20.9971
73	-8.2154	-13.0744	-21.2898	148	-8.8793	-12.1322	-21.0115
74	-7.4441	-11.6301	-19.0742	149	-5.5618	-10.9361	-16.4979

M4. Az atrazin háromdimenziós koordinátái (PDB)

```
CRYST1 0.000 0.000 0.000 90.00 90.00 90.00 P 1 1
ATOM 1 C1 ATZ D 1 6.679 21.714 82.339 1.00 0.00 .419 C
ATOM 2 N1 ATZ D 1 6.694 22.144 81.086 1.00 0.00 .419 N
ATOM 3 C2 ATZ D 1 5.902 23.233 80.899 1.00 0.00 .419 C
ATOM 4 N2 ATZ D 1 5.175 23.850 81.846 1.00 0.00 .419 N
ATOM 5 C3 ATZ D 1 5.275 23.289 83.063 1.00 0.00 .419 C
ATOM 6 N3 ATZ D 1 6.017 22.197 83.381 1.00 0.00 .419 N
ATOM 7 CL1ATZ D 1 7.666 20.317 82.662 1.00 0.00 .419CL
ATOM 8 N4 ATZ D 1 5.814 23.722 79.642 1.00 0.00 .419 N
ATOM 9 N5 ATZ D 1 4.594 23.885 84.069 1.00 0.00 .419 N
ATOM 10 C4 ATZ D 1 6.671 23.299 78.538 1.00 0.00 .419 C
ATOM 11 C6 ATZ D 1 8.071 23.897 78.659 1.00 0.00 .419 C
ATOM 12 C5 ATZ D 1 5.989 23.678 77.230 1.00 0.00 .419 C
ATOM 13 C7 ATZ D 1 4.443 23.311 85.397 1.00 0.00 .419 C
ATOM 14 C8 ATZ D 1 4.014 24.389 86.380 1.00 0.00 .419 C
ATOM 15 H ATZ D 1 5.316 24.603 79.565 1.00 0.00 .419 H
ATOM 16 H2 ATZ D 1 3.949 24.608 83.771 1.00 0.00 .419 H
ATOM 17 H3 ATZ D 1 6.746 22.210 78.609 1.00 0.00 .419 H
ATOM 18 H4 ATZ D 1 8.709 23.550 77.840 1.00 0.00 .419 H
ATOM 19 H5 ATZ D 1 8.526 23.595 79.605 1.00 0.00 .419 H
ATOM 20 H6 ATZ D 1 8.022 24.990 78.620 1.00 0.00 .419 H
ATOM 21 H7 ATZ D 1 6.588 23.340 76.380 1.00 0.00 .419 H
ATOM 22 H8 ATZ D 1 5.881 24.765 77.152 1.00 0.00 .419 H
ATOM 23 H9 ATZ D 1 4.998 23.222 77.162 1.00 0.00 .419 H
ATOM 24 H10ATZ D 1 3.715 22.488 85.384 1.00 0.00 .419 H
ATOM 25 H11ATZ D 1 5.405 22.882 85.682 1.00 0.00 .419 H
ATOM 26 H12ATZ D 1 3.897 23.964 87.380 1.00 0.00 .419 H
ATOM 27 H13ATZ D 1 3.054 24.829 86.091 1.00 0.00 .419 H
ATOM 28 H14ATZ D 1 4.760 25.186 86.426 1.00 0.00 .419 H
END
```

M5. Az atrazin molekula-specifikus adatai (PSF)

PSF

1 !NTITLE

REMARKS VMD-generated NAMD/X-Plor PSF structure file

28 !NATOM

1	.419	1	ATZ	C1	C2	0.405000	12.0107	0
2	.419	1	ATZ	N1	NPL	-0.244000	14.0067	0
3	.419	1	ATZ	C2	C2	0.401000	12.0107	0
4	.419	1	ATZ	N2	NPL	-0.759000	14.0067	0
5	.419	1	ATZ	C3	C2	0.483000	12.0107	0
6	.419	1	ATZ	N3	NPL	-0.190000	14.0067	0
7	.419	1	ATZ	CL1	CL	-0.260000	35.4530	0
8	.419	1	ATZ	N4	NPL	-0.089000	14.0067	0
9	.419	1	ATZ	N5	NPL	-0.355000	14.0067	0
10	.419	1	ATZ	C4	C3	-0.343000	12.0107	0
11	.419	1	ATZ	C6	C3	-0.165000	12.0107	0
12	.419	1	ATZ	C5	C3	-0.165000	12.0107	0
13	.419	1	ATZ	C7	C3	-0.187000	12.0107	0
14	.419	1	ATZ	C8	C3	-0.188000	12.0107	0
15	.419	1	ATZ	H	H	0.252000	1.0079	0
16	.419	1	ATZ	H2	H	0.324000	1.0079	0
17	.419	1	ATZ	H3	H	0.090000	1.0079	0
18	.419	1	ATZ	H4	H	0.090000	1.0079	0
19	.419	1	ATZ	H5	H	0.090000	1.0079	0
20	.419	1	ATZ	H6	H	0.090000	1.0079	0
21	.419	1	ATZ	H7	H	0.090000	1.0079	0
22	.419	1	ATZ	H8	H	0.090000	1.0079	0
23	.419	1	ATZ	H9	H	0.090000	1.0079	0
24	.419	1	ATZ	H10	H	0.090000	1.0079	0
25	.419	1	ATZ	H11	H	0.090000	1.0079	0
26	.419	1	ATZ	H12	H	0.090000	1.0079	0
27	.419	1	ATZ	H13	H	0.090000	1.0079	0
28	.419	1	ATZ	H14	H	0.090000	1.0079	0

28 !NBOND: bonds

1	2	1	6	1	7	2	3
3	4	3	8	4	5	5	6
5	9	8	10	8	15	9	13
9	16	10	11	10	12	10	17
11	18	11	19	11	20	12	21
12	22	12	23	13	14	13	24
13	25	14	26	14	27	14	28

48 !NTHETA: angles

1	6	5	1	2	3	2	3	8
2	3	4	2	1	7	2	1	6
3	8	15	3	8	10	3	4	5
4	5	9	4	5	6	4	3	8
5	9	16	5	9	13	6	5	9
6	1	7	8	10	17	8	10	12
8	10	11	9	13	25	9	13	24

9	13	14	10	12	23	10	12	22
10	12	21	10	11	20	10	11	19
10	11	18	10	8	15	11	10	17
11	10	12	12	10	17	13	14	28
13	14	27	13	14	26	13	9	16
14	13	25	14	13	24	18	11	20
18	11	19	19	11	20	21	12	23
21	12	22	22	12	23	24	13	25
26	14	28	26	14	27	27	14	28

59 !NPHI: dihedrals

4	5	6	1	9	5	6	1
1	2	3	4	1	2	3	8
2	3	4	5	2	3	8	10
2	3	8	15	2	1	6	5
3	8	10	11	3	8	10	12
3	8	10	17	3	4	5	6
3	4	5	9	6	1	2	3
7	1	2	3	4	5	9	13
4	5	9	16	4	3	8	10
4	3	8	15	5	9	13	14
5	9	13	24	5	9	13	25
7	1	6	5	8	3	4	5
6	5	9	13	6	5	9	16
8	10	11	18	8	10	11	19
8	10	11	20	8	10	12	21
8	10	12	22	8	10	12	23
9	13	14	26	9	13	14	27
9	13	14	28	15	8	10	11
11	10	12	21	11	10	12	22
11	10	12	23	15	8	10	12
12	10	11	18	12	10	11	19
12	10	11	20	16	9	13	14
15	8	10	17	16	9	13	24
16	9	13	25	17	10	11	18
17	10	11	19	17	10	11	20
17	10	12	21	17	10	12	22
17	10	12	23	24	13	14	26
24	13	14	27	24	13	14	28
25	13	14	26	25	13	14	27
25	13	14	28				

0 !NIMPHI: impropers

0 !NDON: donors

0 !NACC: acceptors

0 !NNB

0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0				

1 0 !NGRP
0 0 0

M6. Az atrazin topológiája (TOP)

*>>>>>> CHARMM topology file generated by Molefacture <<<<<<<<

27 1

MASS 1 C2 12.01070 C
MASS 1 Npl 14.00670 N
MASS 1 Cl 35.45300 Cl
MASS 1 C3 12.01070 C
MASS 1 H 1.00794 H

AUTO ANGLES DIHE

RESI <1> 0.00

GROUP

ATOM C1 C2 0.40500
ATOM N1 Npl -0.24400
ATOM C2 C2 0.40100
ATOM N2 Npl -0.75900
ATOM C3 C2 0.48300
ATOM N3 Npl -0.19000
ATOM Cl1 Cl -0.26000
ATOM N4 Npl -0.08900
ATOM N5 Npl -0.35500
ATOM C4 C3 -0.34300
ATOM C6 C3 -0.16500
ATOM C5 C3 -0.16500
ATOM C7 C3 -0.18700
ATOM C8 C3 -0.18800
ATOM H H 0.25200
ATOM H2 H 0.32400
ATOM H3 H 0.09000
ATOM H4 H 0.09000
ATOM H5 H 0.09000
ATOM H6 H 0.09000
ATOM H7 H 0.09000
ATOM H8 H 0.09000
ATOM H9 H 0.09000
ATOM H10 H 0.09000
ATOM H11 H 0.09000
ATOM H12 H 0.09000
ATOM H13 H 0.09000
ATOM H14 H 0.09000
BOND C1 N1 C1 N3 C1 Cl1
BOND N1 C2 C2 N2 C2 N4 N2 C3
BOND C3 N3 C3 N5 N4 C4 N4 H
BOND N5 C7 N5 H2 C4 C6 C4 C5
BOND C4 H3 C6 H4 C6 H5 C6 H6
BOND C5 H7 C5 H8 C5 H9 C7 C8
BOND C7 H10 C7 H11 C8 H12 C8 H13
BOND C8 H14

END

M7. Az atrazin CHARMM36-kompatibilis paramétereit (PAR)

```
=====
!  
!  
! Parameter file generated by the Force Field ToolKit (ffTK)  
!  
! For additional information, see:  
  
! http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/fftk  
! http://www.ks.uiuc.edu/Research/fftk  
!  
! Authors:  
! Christopher G. Mayne  
! Beckman Institute for Advanced Science and Technology  
! University of Illinois, Urbana-Champaign  
! http://www.ks.uiuc.edu/~mayne  
! mayne@ks.uiuc.edu  
!  
! James C. Gumbart  
! Georgia Institute of Technology  
! http://simbac.gatech.edu  
! gumbart\_physics.gatech.edu  
!  
! If you use parameters developed using ffTK, please cite:  
! C.G. Mayne, J. Saam, K. Schulten, E. Tajkhorshid, J.C. Gumbart. J. Comput. Chem. 2013, 34, 2757-  
2770.  
!  
=====
```

BONDS

```
!V(bond) = Kb(b - b0)**2  
!  
!Kb: kcal/mole/A**2  
!b0: A  
!  
!atom type Kb b0  
!  
C2 NPL 374.618 1.327 !  
C2 CL 233.426 1.741 !  
NPL C3 360.752 1.449 !  
NPL H 466.367 1.017 !  
C3 C3 300.461 1.523 !  
C3 H 349.239 1.093 !
```

ANGLES

```
!  
!V(angle) = Ktheta(Theta - Theta0)**2  
!  
!V(Urey-Bradley) = Kub(S - S0)**2  
!  
!Ktheta: kcal/mole/rad**2  
!Theta0: degrees  
!Kub: kcal/mole/A**2 (Urey-Bradley)  
!S0: A  
!  
!atom types Ktheta Theta0 Kub S0
```



```

!
!
C2 NPL C2 67.981 111.052 !
NPL C2 NPL 80.508 134.092 !
NPL C2 CL 76.684 118.522 !
C2 NPL H 95.351 117.630 !
C2 NPL C3 76.621 121.652 !
NPL C3 H 48.959 108.220 !
NPL C3 C3 87.405 110.685 !
C3 C3 H 52.933 109.941 !
C3 NPL H 53.276 118.496 !
C3 C3 C3 113.063 113.163 !
H C3 H 47.156 107.936 !

```

DIHEDRALS

```

!
!V(dihedral) = Kchi(1 + cos(n(chi) - delta))
!
!Kchi: kcal/mole
!n: multiplicity
!delta: degrees
!
!atom types      Kchi  n  delta
!
H NPL C3 H 0.7450 3 180.00 !
H C3 C3 H 0.1910 3 0.00 !
NPL C2 NPL H 1.3400 2 180.00 !
C2 NPL C3 H 1.6480 3 180.00 !
NPL C3 C3 H 0.2740 3 0.00 !
NPL C2 NPL C2 3.0000 2 180.00 !
H NPL C3 C3 0.3610 3 0.00 !
C3 C3 C3 H 0.2110 3 0.00 !
NPL C2 NPL C3 1.6210 2 180.00 !
NPL C2 NPL C3 0.0840 4 180.00 !
CL C2 NPL C2 3.0000 2 180.00 !
C2 NPL C3 C3 0.9450 1 180.00 !
C2 NPL C3 C3 0.3760 2 0.00 !
C2 NPL C3 C3 1.2910 3 0.00 !

```

IMPROPER

```

!
!V(improper) = Kpsi(psi - psi0)**2
!
!Kpsi: kcal/mole/rad**2
!psi0: degrees
!note that the second column of numbers (0) is ignored
!
!atom types      Kpsi      psi0
!
NONBONDED nbxmod 5 atom cdiel shift vatom vdistance vswitch -
cutnb 14.0 ctofnb 12.0 ctonnb 10.0 eps 1.0 e14fac 1.0 wmin 1.5
!
!V(Lennard-Jones) = Eps,i,j[(Rmin,i,j/ri,j)**12 - 2(Rmin,i,j/ri,j)**6]

```

```
!  
!epsilon: kcal/mole, Eps,i,j = sqrt(eps,i * eps,j)  
!Rmin/2: A, Rmin,i,j = Rmin/2,i + Rmin/2,j  
!  
!atom ignored  epsilon  Rmin/2  ignored  eps,1-4  Rmin/2,1-4  
!  
C2  0.0 -0.040000  2.100000  !  
C3  0.0 -0.078000  2.040000  0.0 -0.010000  1.900000  !  
NPL 0.0 -0.070000  1.980000  !  
  
END
```