基于残基–水作用网络的木聚糖酶耐热性研究

饶 榕[1]， 丁彦蕊[*2,3]

（1. 江南大学 物联网工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 数字媒体学院，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要： 水在蛋白质折叠、相互作用、分子识别、动力学及耐热性方面发挥着重要作用。利用Voronoi算法识别出与耐热和常温木聚糖酶存在相互作用的水。以氨基酸残基和水为节点，残基–残基及残基–水相互作用为边，构建残基–水相互作用网络。计算网络中节点的度、聚类系数、接近中心性和节点中心性，发现水的这些参数均与木聚糖酶耐热性成正相关关系。耐热木聚糖酶中度为2的hub水数量要比常温酶多，可见水在耐热木聚糖酶中参与了更多的相互作用。以度为2的水为聚类中心，以氨基酸残基节点的度18为阈值进行聚类。子网表明hub水多与hub残基聚为一类，即网络存在“富人俱乐部”现象。这表明，水不仅参与了耐热木聚糖酶的残基–水相互作用，还加强了残基–残基相互作用，更有利于酶形成稳定的结构来抵御高温。

关键词： 残基–水相互作用网络；网络拓扑特征；网络聚类；木聚糖酶热稳定性

中图分类号：Q 81　**文章编号：**1673–1689(2019)09–0078–07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673–1689.2019.09.011

Research of Xylanase Thermostability Based on Residue–Water Interaction Network

RAO Rong[1]， *DING Yanrui*[*2,3]

（1. School of Internet of Things Engineering，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. School of Digital Media，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract： Water plays an important role in protein folding，protein-protein interaction，molecular recognition，protein dynamics，thermal stability and so on. In this paper，Voronoi algorithm is used to identify waters interacting with residues of xylanase. Take waters and all residues as nodes，and take residue-residue interactions and residue-water interactions as edges，we constructed residue-water interaction networks. After calculating network topology parameters such as the network node degree，clustering coefficient，closeness centrality and node centrality，we found that these parameters were positively correlated with the thermal stability of xylanase. The number of hub water with degree 2 in thermophilic xylanase network is much higher than in mesophilic xylanase

收稿日期： 2017–01–05

基金项目： 国家自然科学基金项目(21541006)。

* **通信作者：** 丁彦蕊(1976—)，女，博士，教授，主要从事智能计算与生物信息学研究。E–mail：yr_ding@jiangnan.edu.cn

引用本文： 饶榕，丁彦蕊. 基于残基–水作用网络的木聚糖酶耐热性研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(09)：78–84.

network,which means water is involved in more interaction in thermostable xylanase. Then take hub water with degree 2 as clustering center and set residue degree ⩾18 as threshold degree,we modularized the networks. Analyzing the sub-networks obtained from clustering the whole network, we found hub waters and hub residues are usually clustered into a group. That means residue-water interaction networks of xylanase exist "rich-club phenomenon". These results indicate that water is not only involved in the residue-water interaction,but also strengthen the residue-residue interaction, which is more helpful to the formation of a stable structure to resist high temperature.

Keywords: residue-water interaction network,network topological characteristics,network clustering,the thermal stability of xylanase

木聚糖酶能够将木聚糖水解为小寡糖和木二糖等低聚木糖,以及少量的木糖和阿拉伯糖,是造纸、医药、饲料以及食品等领域常用的酶制剂。耐热木聚糖酶因其能在高温下保持活性而在工业生产中有广泛的应用。多年来,人们通过序列比对、结构分析、定点突变以及分子模拟等方法研究木聚糖酶的耐热性[1]。目前一些研究表明:盐桥是稳定木聚糖酶结构的主要作用力[2];芳香族氨基酸的疏水作用增加了结构内部的稳定性[3];N 端结构的稳定[4]、二硫键数目增加[5]以及表面精氨酸含量的增加[6]对木聚糖酶的热稳定性也至关重要;随着研究的深入,人们又发现木聚糖酶结构中存在热稳定区[7-8],这充分表明了木聚糖酶序列和结构因素之间通过协同作用来提高热稳定性[9]。

将蛋白质编码为氨基酸网络,从系统角度分析影响蛋白质耐热性的各因素之间的关系,是阐明蛋白质耐热机制的有效方法。作者构建了不同类型的 Fe–SOD 酶的氨基酸–氨基酸相互作用网络并研究网络中的 hub 节点,发现耐热 Fe–SOD 酶中 hub 是疏水的甘氨酸和亮氨酸,这些残基形成较强的疏水核心,提高了 Fe–SOD 酶的结构稳定性[10]。另外,还发现耐热的 Fe–SOD 酶的平均度、平均连接强度等网络参数要高于常温的 Fe–SOD 酶[11]。Srivastava 等通过结合复杂网络理论和动态研究方法找到了对枯草芽孢杆菌脂肪酶耐热性影响的重要残基[12]。Brinda 等人也通过网络的方法发现了耐热蛋白质网络与耐温蛋白质网络之间的差异[13]。

水合作用协助蛋白质内部的共价及非共价相互作用维系了蛋白质结构的稳定[14-17]。水分子–蛋白质的相互作用还影响着蛋白质的热稳定性[18]。耐热蛋白质表面往往分布着丰富的带电荷残基,这些残基除了容易形成盐桥以稳定结构外,还容易与水分子形成氢键以保护蛋白质的结构[19]。作者研究了耐热性不同的 Fe–SOD 酶与水的相互关系,发现嗜热 Fe–SOD 酶能与水形成更多的氢键,蛋白质与水以及水与水之间形成了氢键网络来包裹蛋白质[20]。Sterpone 等人通过分子动力学模拟研究了不同温度下水对热稳定性的影响,发现对于嗜热蛋白质,水能提高蛋白质内部的灵活性和结构的鲁棒性[16]。此外,在耐热蛋白质表面有大量亲水性氨基酸与水接触,还有大量盐桥网络在蛋白质–水界面上,带电氨基酸在蛋白质–水界面的分布对热稳定性起到了重要作用。同时发现在高温环境下蛋白质内部的氢键随着温度的上升而下降,而嗜热蛋白质会通过与水接触来补偿[17]。Oleinikova 通过研究水分子与氨基酸之间的氢键能量,发现在 307 K 时(这个温度下生物体的生物活性最大),水与蛋白质表面形成的水化层对于能量是非常敏感的,而某些多肽结构是不敏感的,不敏感的多肽结构表明,热稳定性是由水与多肽合作形成水化的肽链来影响的。从而发现水对热稳定性的作用[21]。

作者通过 Voronoi 算法[22]识别出与木聚糖酶的氨基酸残基相互作用的水,然后确定残基与水之间的相互作用以及残基–残基之间的相互作用。以氨基酸残基和水为节点,残基与残基、以及残基与水之间的相互作用为边构建无加权氨基酸残基–水相互作用网络。接下来,通过计算比较木聚糖酶氨基酸残基–水相互作用网络的网络拓扑特征来研究水对木聚糖酶耐热性的影响。另外,以 hub 水为中心进行聚类,确定连接到该 hub 水的超过某一特定阈值的氨基酸残基,并进一步分析子网的特性以及水与氨基酸残基之间的关系,将利用残基–水相互作

用网络确定水分子与木聚糖酶的耐热性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 数据集及分子动力学模拟

以来自 *Thermoascus aurantiacus*(*T.aurantiacus*,简写为 *T.aur*)的耐热木聚糖酶和来自 *Streptomyces lividans*(*S.lividans*,简写为 *S.liv*)的常温木聚糖酶为研究对象。首先利用分子动力学模拟获得它们在 300、325、350、375 K 下的构象。分子动力学模拟是在 CHARMM27 力场下,在含有 8 841 个水分子的水盒子中进行实验的[9]。在每个温度下得到 300 ns 轨迹数据,获得了所有原子的坐标信息。每隔 1 ns 保存一个构象信息,这样每个温度下按照模拟时间顺序保存了 300 个三维结构。

1.2 识别与木聚糖酶相互作用的水分子的 Voronoi 算法描述

Voronoi 图是由一组连接两个相邻的点的直线的垂直平分线组成的连续多边形。由于要识别与氨基酸残基有相互作用的水,首先将氨基酸残基和水都看作节点,然后对氨基酸残基节点按照最邻近原则划分平面,为每个氨基酸残基节点分配一个区域(称为 Voronoi 细胞)。然后根据水的三维坐标信息,筛选出在氨基酸残基区域中的水分子。采用 Voronoi 算法分析木聚糖酶中的氨基酸残基与水之间的关系,准确的给所有的氨基酸残基节点分配空间,通过筛选区域中的水来识别与残基相互作用的水分子。

具体算法描述如下:随机选定一个氨基酸残基节点,计算其最邻近的两个氨基酸残基节点,三者组成一个 Delaunay 三角形。遍历所有的氨基酸残基节点,做出每个氨基酸残基节点的 Delaunay 三角形。每个 Delaunay 三角形内部不包含任何氨基酸残基节点;分别做出每个 Delaunay 三角形三条边的垂直平分线,并计算出它们的中心;连接所有三角形中心,这些连线就构成了 Voronoi 多边形。相应氨基酸残基节点就是 Voronoi 多边形的中心。保存每个 Voronoi 多边形信息;对于每个 Voronoi 多边形,统计多边形区域内部的水分子,即为与该多边形中心的氨基酸残基存在相互作用的水分子。

上述算法中,Delaunay 三角形是由与 Voronoi 多边形共享一条边的相关点连接而成的三角形,每个 Voronoi 多边形对应一个氨基酸残基节点。相比于常用的基于距离筛选水的方法,Voronoi 算法能够确定那些与氨基酸残基距离较远却存在相互作用的水分子,数据更可靠。

1.3 构建残基-水相互作用无加权网络

计算氨基酸残基 a 与氨基酸残基 b($a\neq b$)的重原子之间的距离,当距离在 6.5×10^{-4} m 以内时,认为氨基酸残基 a 与氨基酸残基 b 之间存在相互作用[23]。氨基酸残基与水之间的相互作用根据上述 Voronoi 算法确定。以氨基酸残基和水为节点,残基与残基、以及残基与水的相互作用为边构建网络。

1.4 网络拓扑参数的计算

计算了平均度(degree)、平均无加权聚类系数(clustering coefficient)、平均接近中心性(closeness centrality)、平均节点中心性(Residue centrality)这些网络拓扑参数。具体计算公式如下:

网络平均度 $\overline{K}$[24]:

$$\overline{K}=\frac{\sum_{i=1}^{N}k_i}{N} \tag{1}$$

其中,k_i 为节点 i 的度,$k_i=\sum_{j=1}^{N}a_{i,j}$,$a_{i,j}$ 代表节点 i 与 j 之间的边,若有边为 1,无边为 0。N 为网络中的水节点数目。

聚类系数 C[24]:

$$C=\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\frac{e_i}{k_i(k_i-1)/2} \tag{2}$$

其中,e_i 为节点 i 的邻居节点之间的实际边数,k_i 为节点 i 的度。

节点水的平均接近中心性 CC[24]:

$$CC=\frac{1}{N}\sum_{j=1}^{N}CC_i \tag{3}$$

其中,$CC_i=\frac{N-1}{\sum_{j\in U,j\neq i}d(i,j)}$,$U$ 为所有节点构成的集合,$d(i,j)$为氨基酸残基 i 和 j 之间的距离,N 为网络中节点是水分子的个数。

水的节点中心性 ΔL_k:

$$\Delta L_k=|L-L_{\mathrm{rem},k}| \tag{4}$$

其中 $L=\frac{\sum_i\sum_j L_{i,j}}{N(N-1)}$,$L_{i,j}$ 是节点 i 和 j 之间的最短路径。$L_{\mathrm{rem},k}$ 是移除节点 k 之后该网络的特征路径长度

ΔL_k 表示了节点在网络通路中的重要性。网络中一个节点的中心性为整个网络的特征路径长度与除去该节点的特征路径长度之间差值的绝对值[24]。

1.5 基于 hub 水的残基–水相互作用网络聚类

网络中节点之间往往会形成簇来共同完成某项功能。在木聚糖酶的氨基酸残基–水相互作用网络中,水分子与哪些氨基酸残基或者水分子形成簇以及水分子如何影响残基–残基相互作用,需要对网络进行聚类分析获得。以 hub 水为聚类中心,设置阈值,获得该水分子的簇。

其算法描述如下:

计算氨基酸残基–水相互作用网络中所有节点的度,将度为 2 的水设定为 hub 水;将 hub 水放在队列 H 中,从队列的第一个节点(第一个水)开始,找出与第一个水相连接的残基,如果残基的度大于等于设定的阈值 K(K=18)时,将该残基放入子网中;以此残基为中心,遍历其所有邻居氨基酸残基,如果邻居残基的度大于阈值 K,那么就将该邻居残基放入子网中;重复步骤 3,直到遍历网络中所有的残基为止。在该子网中,重新回溯整个网络,将网络中原先与残基相连接的水加入到子网中。重复步骤 2~4,找出已知队列中所有 hub 水的子网。

2 结果与讨论

2.1 木聚糖酶中与氨基酸残基相互作用的水分子分布

如方法部分所述,每个模拟温度下的木聚糖酶的构象有 300 个,根据每个构象的原子坐标信息,利用 Voronoi 算法识别出了与氨基酸残基存在相互作用的水分子。统计不同模拟温度下水分子数在 300 个构象中的占比,然后比较不同耐热性的木聚糖酶中水分子比例可以确定水分子数与耐热性的关系,结果见图 1。

对于耐热木聚糖酶以及常温木聚糖酶,与氨基酸残基相互作用的水分子数会随着温度的上升而减少,特别是 350 K 到 375 K 过程中,常温木聚糖酶中水分子的数量急剧减少,这说明高温减弱了常温木聚糖酶中水分子与残基之间的相互作用[21]。而对于耐热木聚糖酶和常温木聚糖酶在同一个温度下比较时,发现嗜热木聚糖酶中水分子的数量比常温木聚糖酶中要多,并且随着温度升高,水分子的数量差异也越明显。可见,嗜热木聚糖酶中氨基酸残基与水分子相互作用比常温木聚糖酶更密切,嗜热木聚糖酶中的氨基酸与水形成更多的氢键来抵御高温[21]。

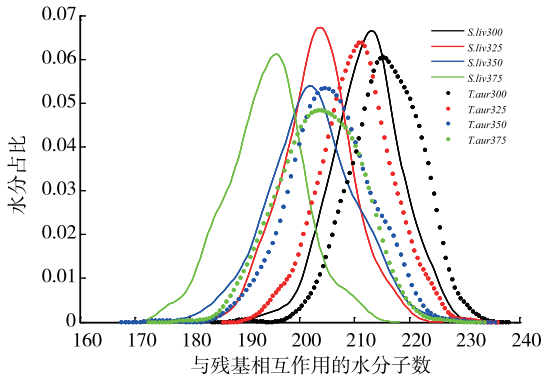


图 1 与耐热和常温木聚糖酶存在相互作用的水分子在不同模拟温度下的分布

Fig. 1 Distribution of waters interacting with residues of thermostable and mesophilic xylanase at different simulated temperatures

2.2 木聚糖酶中 hub 水分子的数量随模拟时间和温度的变化

由于水的化学特性决定了与蛋白质相互作用的水分子最多能形成两个氢键,因此将网络中度为 2 的水看作是 hub 水,相对于度为 1 的水,它对蛋白质的影响更为重要。图 2 表明,随着温度的升高,耐热木聚糖酶和常温木聚糖酶中 hub 水分子的数量不断降低。但是对于某一特定温度,嗜热木聚糖酶中 hub 水分子数量远远高于常温木聚糖酶,同时发现度为 2 的hub 水分子数量在 50 ns 之后随着时间的变化保持不变,说明虽然分子间是不停运动的,但是有一些氨基酸残基始终与水发生相互作用,并保持紧密联系[17]。

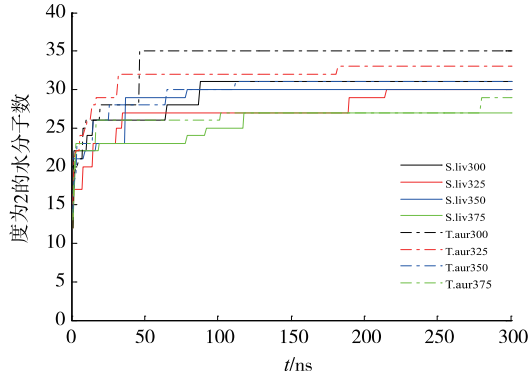
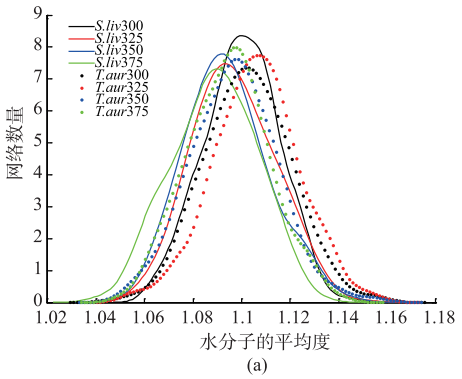


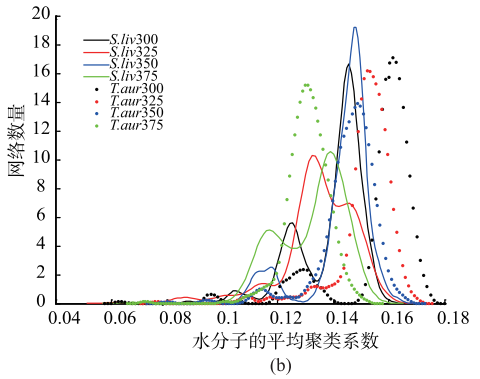
图 2 氨基酸–水相互作用网络中 hub 水分子数量随模拟时间和温度的变化趋势

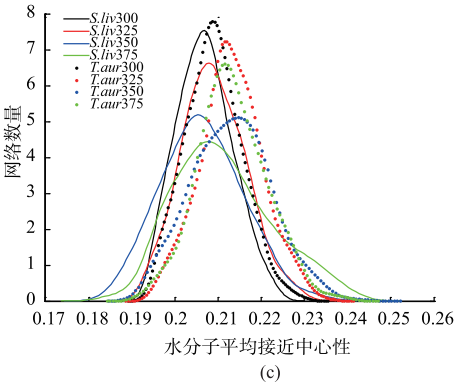
Fig. 2 Trend of hub water number over time and temperature in residue–water interaction network

2.3 木聚糖酶氨基酸残基-水相互作用网络中水的网络特性

图 3 分别是从 4 个网络参数的角度分析水在网络中的参与程度。对于平均度(图 3(a)),平均聚类系数(图 3(b)),平均接近中心性(图 3(c)),平均节点中心性(图 3(d)),从图中可以看出,在同一温度下,嗜热木聚糖酶中水分子的网络参数比常温木聚糖酶中水分子的网络参数要高,说明这些网络属性与木聚糖酶热稳定性之间存在正相关关系。平均度、平均聚类系数、平均接近中心性、平均节点中心性分别从与氨基酸残基的连接程度、邻居节点的聚集程度、与残基接近的程度、以及水分子如何从全局影响整个网络这 4 个角度反映水分子在整个网络中的贡献以及参与程度。在 300 K 和 325 K 下,嗜热木聚糖酶中水分子的平均度以及平均接近中心性都有显著增加,而常温木聚糖酶的这些网络参数却在减少。这些现象表明,随着温度升高,与常温木聚糖酶相比,嗜热木聚糖酶中某些氨基酸残基与水形成更多的氢键,通过水合作用形成水化的肽链来稳定蛋白质的结构[21]。在 325 K 时,耐热木聚糖酶中水分子的网络参数和常温木聚糖酶的差异尤为明显,耐热木聚糖酶中水分子的网络参数要比常温木聚糖酶高很多。这表明水分子不仅能和嗜热木聚糖酶中的氨基酸残基形成氢键来稳定蛋白质结构,还可以促进蛋白质内部氨基酸残基的相互作用,提高蛋白质内部的灵活性和鲁棒性[16]。在其他温度下,水分子在嗜热木聚糖酶氨基酸残基-水相互作用网络的贡献也比在常温木聚糖酶大,它们与残基之间的作用也更加紧密[20]。







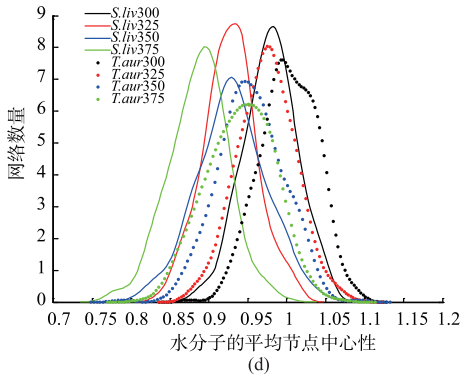


图 3 木聚糖酶氨基酸-水相互作用网络中水的拓扑参数

Fig. 3 Distribution of topology parameters of water in residue-water interaction network of xylanase

2.4 子网规模变化趋势

在氨基酸残基-水相互作用网络中,水的化学特性决定了其与蛋白质相互作用时最多能形成两个氢键,因此将度为 2 的水看作 hub 水。相对于度为 1 的水,hub 水对蛋白质的影响更为重要。在以 hub 水为中心的聚类过程中,发现 hub 水的数量并没有影响到聚类后子网的个数。无论是嗜热木聚糖酶还是常温木聚糖酶的氨基酸残基-水相互作用网络,大部分 hub 水聚在同一个子网中,这说明 hub 水倾向于连接到那些度较高的氨基酸残基节点上,

即木聚糖酶的氨基酸残基–水相互作用网络存在“富人俱乐部”现象[25]。图 4 是随着时间和温度的变化,子网大小的变化情况。表明了在 300 K 和 375 K 时,耐热木聚糖酶的子网规模与常温木聚糖酶的子网规模之间差距较为明显。而在 325 K 和 350 K 时,子网规模相似。但是总体来说子网大小是随着温度升高而减小的。同时,耐热木聚糖酶在 300 K 和 325 K 时子网减小的幅度要比常温木聚糖酶小的多。

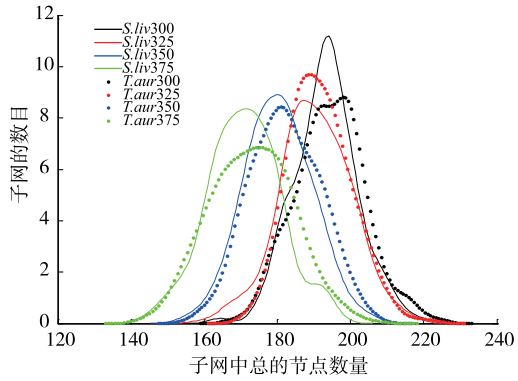


图 4 聚类后子网规模随着模拟时间和温度的变化趋势

Fig. 4 Change trend of sub–network scale with simulation time and temperature after modularized network

2.5 水在子网中所占比例的变化趋势

在图 5 中,水在子网中的比例也表现出相同的变化趋势,随着温度升高,水在网络中占得比例减小。但是在同一温度下,耐热木聚糖酶中水的比例比常温木聚糖酶要高很多。虽然木聚糖酶中的 hub 水都能连接到度较大的氨基酸残基节点,但是在 300、350、375 K 情况下,通过图 4 可以发现,常温木聚糖酶中的子网规模要比嗜热木聚糖酶中的子网更大一些,但是水在网络中的比例却小很多。随着温度升高,氨基酸残基与氨基酸残基之间的作用力会减弱,部分氢键会断开,耐热木聚糖酶可以与水形成更多的作用力来补偿,帮助稳定整个蛋白质的结构[17-18],但对于常温木聚糖酶却不能表现出同样的行为。可见,水与氨基酸残基之间的作用力对维持蛋白质的热稳定性有很大的作用[14]。

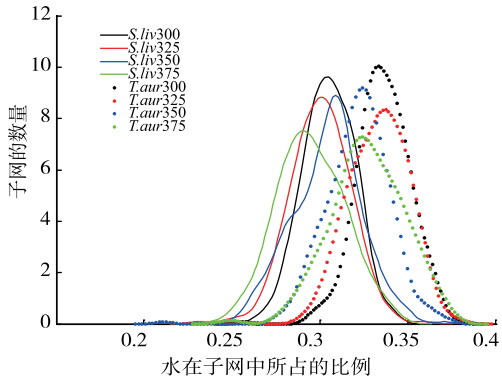


图 5 子网中水所占比例随着模拟时间和温度的变化趋势

Fig. 5 Change trend of proportion of water in the sub–network with simulation time and temperature

3 结 语

分析了氨基酸残基–水相互作用网络中水的网络参数,发现水对木聚糖酶热稳定性的影响与网络参数之间有正相关关系。还发现水与氨基酸残基的作用会影响木聚糖酶的热稳定性。用氨基酸残基–水相互作用网络表示蛋白质与水的结构,并用一些复杂网络理论来研究水与氨基酸残基之间的作用,以及水如何影响残基–残基的相互作用,可以为研究其他类型的蛋白质的耐热性提供一个有效的思路。

参考文献:

[1] BAI Wenqin,WANG Qinhong,MA Yanhe. Progress in the thermophilic and alkalophilic xylanases[J]. **Chin J Biotech**,2014,30(6):828-837.(in Chinese)

[2] XUE H,ZHOU J,YOU C,et al. Amino acid substitutions in the N-terminus,cord and α-helix domains improved the thermostability of a family 11 xylanase XynR8 [J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,2012,39(9):1279-1288.

[3] GEORIS J,ESTEVES FREDERIC DE LEMOS,LAMOTTE-BRASSEUR JOSETTE,et al. An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase:structural basis and molecular study[J]. **Protein Science**,2000,9(3):466-475.

[4] ZHANG S,ZHANG K,CHEN X,et al. Five mutations in N-terminus confer thermostability on mesophilic xylanase [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,2010,395(2):200-206.

[5] CHEN Zhongfa,TANG Cunduo,WANG Junqing,et al. Effect of engineering a disulfide bridge into the N-terminal region of

aspergillusoryzae xylanase on its thermostability [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32 (7):686-691.(in Chinese)

[6] HAN C,YU S,JIA O,et al. Enhancing stability of Trichoderma reesei xylanase (XYN Ⅱ) by site-directed mutagenesis[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2010,26(5):623-629.

[7] ZHAO G,ALI E,ARAKI R,et al. Function of the family-9 and family-22 carbohydrate-binding modules in a modular β-1,3-1,4-glucanase/xylanase derived from Clostridium stercorarium Xyn10B [J]. **Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry**,2005,69(8):1562-1567.

[8] JUN H,BING Y,KEYING Z,et al. Thermostable carbohydrate binding module increases the thermostability and substrate-binding capacity of Trichoderma reesei xylanase 2[J]. **New Biotechnology**,2009,26(1):53-59.

[9] DING Y,CAI Y. Conformational dynamics of xylanase a from Streptomyces lividans:Implications for TIM-barrel enzyme thermostability[J]. **Biopolymers**,2013,99(9):594-604.

[10] DING Y,WANG X,MOU Z. Effect of hubs in amino acid network on iron superoxide dismutase stability [J]. **Current Bioinformatics**,2015,10(2):232-239.

[11] WANG Xueqin,DING Yanrui,MOU Zhaolin,et al. Research on the relationship between iron superoxide dismutase amino acid networks and thermostability[J]. **Acta Biophysica Sinica**,2014,30(2):146-156.(in Chinese)

[12] SRIVASTAVA A,SINHA S. Thermostability of in vitro evolved Bacillus subtilis lipase A:a network and dynamics perspective [J]. **PloS one**,2014,9(8):e102856.

[13] BRINDA KV,VISHVESHWARA S. A network representation of protein structures:implications for protein stability [J]. **Biophysical Journal**,2005,89(6):4159-4170.

[14] YIN H,HUMMER G,RASAIAH J C. Metastable water clusters in the nonpolar cavities of the thermostable protein tetrabrachion [J]. **Journal of the American Chemical Society**,2007,129(23):7369-7377.

[15] AHMAD S,KAMAL MD. ZAHID,SANKARANARAYANAN R,et al. Thermostable bacillus subtilis lipases:in vitro evolution and structural insight[J]. **Journal of Molecular Biology**,2008,381(2):324-340.

[16] STERPONE F,BERTONATI C,BRIGANTI G,et al. Key role of proximal water in regulating thermostable proteins [J]. **The Journal of Physical Chemistry B**,2008,113(1):131-137.

[17] STERPONE F,BERTONATI C,BRIGANTI G,et al. Water around thermophilic proteins:the role of charged and apolar atoms [J]. **Journal of Physics:Condensed Matter**,2010,22(28):284113.

[18] HONG S,KIM D. Interaction between bound water molecules and local protein structures:A statistical analysis of the hydrogen bond structures around bound water molecules[J]. **Proteins:Structure,Function,and Bioinformatics**,2016,84(1):43-51.

[19] GRIBENKO A V,PATEL M M,LIU J J,et al. Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge-charge interactions[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,2009,106(8):2601-2606.

[20] MOU ZHAOLIN,DING YANRUI,WANG XUEQIN,et al. Comparison of protein-water interactions in psychrophilic,mesophilic,and thermophilic Fe-SOD[J]. **Protein and peptide letters**,2014,21(6):578-583.

[21] OLEINIKOVA A,BROVCHENKO I. What determines the thermal stability of the hydrogen-bonded water network enveloping peptides?[J]. **The Journal of Physical Chemistry Letters**,2011,2(7):765-769.

[22] GERSTEIN M,TSAI J,LEVITT M. THE volume of atoms on the protein surface-calculated from simulation,using voronoi polyhedra[J]. **Journal of Molecular Biology**,1995,249(5):955-966.

[23] GREENE LESLEY H.HIGMAN VICTORIA A. Uncovering network systems within protein structures[J]. **Journal of Molecular Biology**,2003,334(4):781-791.

[24] AFTABUDDIN MD,KUNDU S. Hydrophobic,hydrophilic,and charged amino acid networks within protein [J]. **Biophysical Journal**,2007,93(1):225-231.

[25] VIJAYABASKAR M S,VISHVESHWARA S. Interaction energy based protein structure networks [J]. **Biophysical Journal**,2010,99(11):3704-3715.