НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.15

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТИ ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗЫ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

Анна Сергеевна Доценко[1], Ольга Аркадьевна Синицына[2], Екатерина Александровна Рубцова[1], Сергей Анатольевич Курзеев[2], Александра Михайловна Рожкова[1], Иван Никитич Зоров[1, 2], Аркадий Пантелеймонович Синицын[1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
[2] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Анна Сергеевна Доценко, a.dotsenko@fbras.ru

Аннотация. Проведен рациональный дизайн дисульфидных связей в полисахаридмонооксигеназе *P. verruculosum*. Показано, что увеличение активности и термостабильности фермента коррелирует с расположением дисульфидной связи в области высокоподвижной петли рядом с активным центром в пространственной структуре фермента. Продемонстрировано, что термоденатурация полисахаридмонооксигеназы *P. verruculosum* является обратимой и фермент полностью восстанавливает активность после инкубирования при 4 °C.

Ключевые слова: дисульфидная связь, рациональный дизайн, B-фактор, активность, стабильность, полисахаридмонооксигеназа

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2026-67-6-402-414

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова, регистрационный номер 121041500039-8.

Для цитирования: Доценко А.С., Синицына О.А., Рубцова Е.А., Курзеев С.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Синицын А.П. Рациональный дизайн дисульфидных связей для увеличения активности и стабильности полисахаридмонооксигеназы *Penicillium verruculosum* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2026. Т. 67. № 6. С. 402–414.

© Доценко А.С., Синицына О.А., Рубцова Е.А., Курзеев С.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Синицын А.П., 2026

ORIGINAL ARTICLE

RATIONAL DESIGN OF DISULFIDE BONDS FOR IMPROVEMENT IN ACTIVITY AND THERMOSTABILITY OF *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* POLYSACCHARIDE MONOOXYGENASE

Anna S. Dotsenko[1], Olga A. Sinitsyna[2], Ekaterina A. Rubtsova[1], Sergei A. Kurzeev[2], Aleksandra M. Rozhkova[1], Ivan N. Zorov[1, 2], Arkady P. Sinitsyn[1, 2]

[1] Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[2] Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia

Corresponding author: Anna S. Dotsenko, a.dotsenko@fbras.ru

Abstract. A rational design of disulfide bonds in *P. verruculosum* polysaccharide monooxygenase has been carried out. It has been shown that an increase in the activity and thermal stability of the enzyme correlates with the location of the disulfide bond in the region of the highly flexible loop near the active center in the spatial structure of the enzyme. It has been demonstrated that the thermodenaturation of *P. verruculosum* polysaccharide monooxygenase is reversible and the enzyme completely restores activity after incubation at 4 °C.

Keywords: disulfide bond, rational design, B-factor, activity, stability, polysaccharide monooxygenase

Financial Support: The work was carried out as part of the state assignment of Lomonosov Moscow State University, registration number 121041500039-8.

For citation: Dotsenko A.S., Sinitsyna O.A., Rubtsova E.A., Kurzeev S.A., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Sinitsyn A.P. Rational design of disulfide bonds for improvement in activity and thermostability of *Penicillium verruculosum* polysaccharide monooxygenase // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Khimiya. 2026. T. 67. № 6. S. 402–414.

.

Литические полисахаридмонооксигеназы – металл-зависимые ферменты, которые катализируют окислительное расщепление природных полисахаридов. Эти ферменты относятся к классу оксидоредуктаз (КФ 1.14.99.53−56) и действуют в основном на целлюлозу, крахмал, хитин, ксилан и ксилоглюкан, не проявляя строгой субстратной специфичности [1, 2]. Известные на данный момент литические полисахаридмонооксигеназы (или полисахаридмонооксигеназы (ПМО), что является эквивалентным названием) содержат в активном центре атом меди и способны использовать O_2 или H_2O_2 в качестве косубстратов в реакциях с природными полисахаридами [3].

Наиболее исследуемое направление практического применения ПМО – увеличение выхода сахаров в процессах конверсии лигноцеллюлозной биомассы при добавлении к комплексу целлюлолитических ферментов [4]. Так, мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* (*Talaromyces verruculosus*) продуцирует комплекс целлюлолитических ферментов, эффективных для конверсии лигноцеллюлозной биомассы [5]. В геноме этого микроорганизма был обнаружен ген *lpmo1*, кодирующий ПМО *P. verruculosum*, но не было обнаружено детектируемой концентрации ПМО в секретируемом комплексе ферментов. Гомологичная экспрессия *lpmo1* в штамме-реципиенте *P. verruculosum* позволила получить секретируемый комплекс ферментов с высоким (9–57%) содержанием ПМО и повысить выход сахаров на 11–31% при гидролизе целлюлозосодержащих субстратов [6].

Дополнительное увеличение выхода сахаров при гидролизе лигноцеллюлозной биомассы достигается в результате рационального дизайна ПМО, направленного на увеличение активности и термостабильности этих ферментов [4]. Одним из эффективных подходов рационального дизайна является создание новых дисульфидных

связей (S–S-связей). Было показано, что добавление S–S-связей в пространственную структуру увеличивает активность и термостабильность ПМО *Cellvibrio japonicus* [7] и ПМО *Streptomyces coelicolor* [8]. Поэтому целью данной работы стал рациональный дизайн S–S-связей в ПМО *P. verruculosum* для увеличения активности и стабильности этого фермента.

Экспериментальная часть

Объект исследования. В работе исследовано влияние S–S-связей на активность и стабильность ПМО *P. verruculosum*. Для ПМО *P. verruculosum* известна последовательность гена *lpmo1* (номер в базе данных GenBank MK158950), кодирующего этот фермент, и транслированная аминокислотная (а.к.) последовательность [9]. N-концевая часть а.к. цепи зрелого фермента образует каталитический домен с известной кристаллической структурой (номер в базе данных PDB 7A8V). А.к. остатки на С-конце а.к. цепи (~80 а.к. остатков) формируют свободный линкер без элементов вторичной структуры. Сообщалось, что линкер не влияет на ферментативную активность, но увеличивает термостабильность этого фермента [9]. В работе использован полноразмерный фермент с а.к. остатками 1–307, включающий каталитический домен и линкер.

Рациональный дизайн. Расчет теоретических S–S-связей в ПМО *P. verruculosum* был выполнен с использованием Disulfide by Design v.2.13 [10] и пространственной структуры PDB ID 7A8V. Консервативность а.к. остатков была определена по частоте встречаемости во множественном выравнивании а.к. последовательностей, полученном с использованием Consurf [11].

Сайт-направленный мутагенез. Мутации, соответствующие а.к. заменам, были внесены в ген *lpmo1*, кодирующий ПМО *P. verruculosum*, с использованием метода QuickChange [12] и олигонуклеотидных праймеров (таблица). Для синтеза плазмидной ДНК с необходимыми мутациями использовали полимеразу Phusion High-fidelity PCR Kit (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, США). Матричную плазмиду расщепляли с использованием эндонуклеазы *Mal*I (SibEnzyme, Новосибирск, Россия). Плазмиды с внесенными мутациями трансформировали в компетентные клетки *Escherichia coli* XL-1 Blue (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, США) с помощью методики трансформации [13], затем выделяли из клеток *E. coli* с использованием набора реактивов (Евроген, Москва, Россия). Последовательность гена *lpmo1* с внесенными мутациями подтверждали секвенированием ДНК [14].

Получение и культивирование штаммов-продуцентов. Для получения ПМО *P. verruculosum* и форм фермента с а.к. заменами использовали штамм-реципиент *P. verruculosum* B1-537 (niaD$^-$) (ВКМ F-3972D, Всероссийская коллекция микроорганизмов, Россия). *P. verruculosum* B1-537 (niaD$^-$) не продуцирует ПМО в детектируемых количествах, что позволяет использовать этот штамм-реципиент для гомологичной экспрессии *lpmo1* [6]. Плазмиды, содержащие ген *lpmo1* с внесенными мутациями, трансформировали в штамм-реципиент *P. verruculosum* B1-537 (niaD$^-$) совместно с плазмидой pSTA10 (niaD$^+$) с использованием полиэтиленгликоль/$CaCl_2$-метода [15]. Штаммы, полученные в результате трансформации, культивировали в течение 6 суток при 32 °C в жидкой среде состава (г/л): KH_2PO_4 – 10,0; K_2HPO_4 – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 5,0; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3; микрокристаллическая целлюлоза – 40,0; дрожжевой экстракт – 10,0; пшеничные отруби – 10,0. После культивирования проводили электрофорез культуральной жидкости в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и выбирали штаммы-

Олигонуклеотидные праймеры, использованные для сайт-направленного мутагенеза

Аминокислотная замена	Fwd-праймер	Rev-праймер
V90C	5′-cacggcccttgcatctcctatc-3′	5′-gataggagatgcaagggccgtg-3′
A130C	5′-caggcacatggtgctccgaccaac-3′	5′-gttggtcggagcaccatgtgcctg-3′
D122C	5′-ctgatcgactgcaccacagttc-3′	5′-gaactgtggtgcagtcgatcag-3′
G127C	5′-cacagttccatgcacatgggcttc-3′	5′-gaagcccatgtgcatggaactgtg-3′
A166C	5′-cttcactcctgcgaaaacacagac-3′	5′-gtctgtgttttcgcaggagtgaag-3′
A172C	5′-cacagacggctgccagaactac-3′	5′-gtagttctggcagccgtctgtg-3′

продуценты с наиболее интенсивной белковой полосой 35 кДа, соответствующей молекулярной массе ПМО *P. verruculosum*.

Выделение и очистка ферментов. Ферменты, содержащиеся в культуральной жидкости, осаждали $(NH_4)_2SO_4$ (степень насыщения 80%, 4 °C) для отделения от компонентов питательной среды. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в стартовом буфере 20 мМ 2-[бис-(2-гидроксиэтил)амино]-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол (Bis-tris)/HCl (pH 6,8) и подвергали обессоливанию с использованием колонки Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, США). Фракционирование осуществляли методом анионообменной хроматографии на колонке с носителем Source 15Q (GE Healthcare, США) и элюентами 20 мМ Bis-tris/HCl и 20 мМ Bis-tris/HCl, 0,5 М NaCl (pH 6,8). Дальнейшее обессоливание и концентрирование полученных фракций проводили с использованием мембранных колонок VivaSpin 500 (Sartorius Stedium biotech, Германия). Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 280 нм. Коэффициент экстинкции рассчитывали с использованием ProtParam [16]: 51130 $M^{-1}{\cdot}см^{-1}$ для исходного фермента и 51255 $M^{-1}{\cdot}см^{-1}$ для форм с а.к. заменами в предположении, что все пары остатков цистеина образуют S–S-связи.

Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Электрофорез в денатурирующих условиях проводили с использованием пластин полиакриламидного геля с концентрирующим (4%) и разделяющим (12%) слоями в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na). Аликвоты ферментов предварительно обрабатывали при 100 °C в течение 20 мин в присутствии или в отсутствие 1% ДДС-Na и 5% 2-меркаптоэтанола (2-МЭ).

Детекция сульфгидрильных групп. Наличие свободных сульфгидрильных групп в ПМО *P. verruculosum* и формах с а.к. заменами проверяли модифицированным методом Элмана [17]. Реактив Элмана готовили растворением 4 мг 5,5′-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, США) в 2 мл 0,1 М универсального буфера Бриттона–Робинсона (pH 7,0). Реакционная смесь содержала 30 мкл 0,1 М универсального буфера Бриттона–Робинсона (pH 9,0), 10 мкл реактива Элмана, 50 мкл 10 М гуанидин гидрохлорида («Диа-М», Москва, Россия) в 0,1 М универсальном буфере Бриттона–Робинсона (pH 9,0) (или 50 мкл соответствующего буфера для реакции в отсутствие гуанидин гидрохлорида) и 10 мкл раствора фермента с концентрацией 4 мг/мл. Измерения проводили в трех повторностях.

Дифференциальная сканирующая флуориметрия. Хромотроп 2B (динатриевая соль 2-(4-нитрофенилазо)хромотроповой кислоты) был использован как флуоресцентный маркер. Флуоресценцию возбуждали при λ_{ex} = 300 нм и детектировали при λ_{em} = 600 нм. Скорость нагрева раствора фермента составляла 1 °C/мин. Измерения проводили в 0,1 М Tris-HCl буфере (pH 7,5), что соответствовало pH-оптимуму активности ПМО *P. verruculosum* [9]. Концентрация фермента составляла 0,2 мг/мл.

Определение ферментативной активности. Активность ПМО *P. verruculosum* и форм с а.к. заменами определяли с использованием 2,6-диметоксифенола (2,6-ДМФ, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA, США) в качестве синтетического субстрата и H_2O_2 в качестве косубстрата [18, 19]. Реакционная смесь содержала 0,1 мл запасного раствора 2,6-ДМФ (10 мМ), 0,1 мл запасного раствора H_2O_2 (1 мМ), 0,1 мл 1 М Tris-HCl (pH 7,5) и 0,6 мл дистиллированной воды. Смесь предварительно нагревали в течение 5 мин при 30 °C в термостатируемой ячейке спектрофотометра. После добавления 0,1 мл раствора ПМО регистрировали поглощение раствора при 469 нм в течение 5 мин. Скорость ферментативной реакции рассчитывали по концентрации хромогенного продукта с использованием коэффициента экстинкции 53200 $M^{-1}см^{-1}$ [18]. Значение pH 7,5 соответствовало pH-оптимуму активности ПМО *P. verruculosum* [9]. Измерения проводили в трех повторностях.

Исследование термостабильности. Для сравнения термостабильности форм ПМО *P. verruculosum* с а.к. заменами и исходного фермента аликвоты раствора ферментов инкубировали при температуре 30–70 °C в течение 15 мин в 0,1 М Tris-HCl (pH 7,5), после чего сразу переносили в реакционную смесь, содержащую 2,6-ДМФ и H_2O_2 и термостатируемую при 30 °C, для определения ферментативной активности. В альтернативной схеме эксперимента к стадии инкубирования при повышенной температуре 30–100 °C добавляли стадию охлаждения аликвоты при 4 °C в течение 30 с для устранения нагрева реакционной смеси 2,6-ДМФ и H_2O_2 при смешивании с аликвотой, нагретой до 30–100 °C. Измерения активности проводили в трех повторностях.

Исследование рефолдинга. Аликвоты фермента нагревали в течение 15 мин при 100 °C в

0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), затем охлаждали в течение 30 с – 20 ч при 4 °C. Через 30 с – 20 ч измеряли ферментативную активность. Измерения проводили в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение

Рациональный дизайн S–S-связей в ПМО *P. verruculosum* состоял из двух этапов. На первом этапе был выполнен расчет геометрической возможности образования S–S-связи в пространственной структуре этого фермента при а.к. заменах на цистеин. На втором этапе из рассмотрения были удалены те а.к. замены, которые способны снизить активность или стабильность фермента из-за расположения в активном центре, высокой консервативности по результатам множественного выравнивания а.к. последовательностей и снижения жесткости а.к. цепи при удалении пролина или существующих S–S-связей.

В пространственной структуре ПМО *P. verruculosum* (PDB ID 7A8V) условиям образования S–S-связи с параметрами торсионного угла Cβ-Sγ-Sγ′-Cβ′, равными –87±30 град. или +97±30 град., и угла Cα-Cβ-Sγ с параметрами, равными 114,6±10 град., соответствовали 33 теоретические S–S-связи, по результатам расчета Disulfide by Design v.2.13. Допустимые значения параметров в расчете Disulfide by Design v.2.13 основаны на анализе S–S-связей в природных белках [10, 20]. Две S–S-связи из 33 теоретически предположенных уже существуют в пространственной структуре ПМО *P. verruculosum*, а именно связи C56-C178 и C97-C101 (рис. 1). Для образования 20 теоретических S–S-связей требовалась а.к. замена пролина на цистеин, замена консервативного а.к. остатка, замена а.к. остатка вблизи активного центра фермента или разрушение S–S-связей C56-C178 и C97-C101 для образования с одним из имеющихся остатков цистеина новой S–S-связи. Кроме того, две теоретические S–S-связи были расположены рядом с C56-C178 и C97-C101 в пространственной структуре фермента и могли влиять на их образование. Перечисленные теоретические S–S-связи были удалены из рассмотрения из-за способности снизить активность и стабильность ПМО *P. verruculosum*. Из девяти оставшихся теоретических S–S-связей шесть были расположены в C-конце каталитического домена или на поверхности белковой глобулы. Три S–S-связи, а именно C90-C130, C122-C127 и C166-C172, напротив, располагались в центральной части каталитического домена и были погружены внутрь белковой глобулы (рис. 1).

А.к. замены D122C/G127C и A166C/A172C располагались в петлях, которые окружают активный центр фермента, а замены V90C/A130C – соединяли β-тяж и α-спираль (рис. 1).

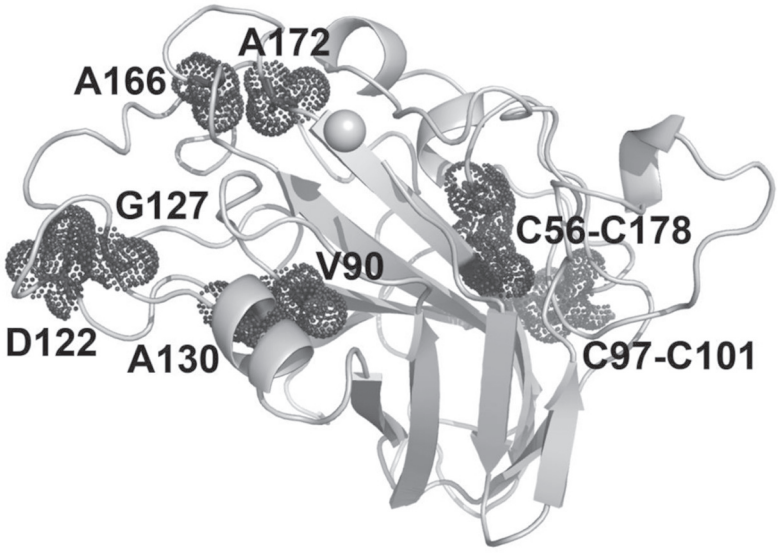


Рис. 1. Пространственная структура ПМО *P. verruculosum*. Сайты аминокислотных замен D122/G127 и A166/A172 расположены в петлях, которые окружают активный центр фермента, а сайты V90/A130 – в N-концах β-тяжа и α-спирали соответственно. В структуре фермента есть две S–S-связи C56-C178 и C97-C101. Атом меди в активном центре показан в виде шара

А.к. замены D122C/G127C также находились в одном из наиболее подвижных участков а.к. цепи ПМО *P. verruculosum*, в отличие от а.к. замен V90C/A130C и A166C/A172C (рис. 2). Ранее сообщалось, что добавление S–S-связей в подвижные участки а.к. цепи позволяет увеличить стабильность ряда ферментов и может рассматриваться как эффективный подход для рационального дизайна [10, 20].

Нуклеотидные мутации, соответствовавшие двойным а.к. заменам V90C/A130C, D122C/G127C и A166C/A172C, были внесены в ген *lpmo1* методом сайт-направленного мутагенеза с использованием олигонуклеотидных праймеров (таблица). Ферменты с а.к. заменами были выделены методом анионообменной хроматографии.

Электрофорез в полиакриламидном геле позволил детектировать различия в пространственной структуре исходного фермента ПМО *P. verruculosum* и форм с а.к. заменами, ПМО V90C/A130C, ПМО D122C/G127C и ПМО A166C/A172C. В случае исходного фермента кипячение аликвот раствора фермента при 100 °C в течение 20 мин в присутствии или в отсутствие ДДС-Na и 2-МЭ приводило к получению белковой полосы массой 35 кДа (рис. 3), что соответствовало теоретической массе гликопептида ПМО *P. verruculosum*. Теоретическая молекулярная масса белковой части ПМО *P. verruculosum* составляет 31,7 кДа. Каталитический домен ПМО *P. verruculosum* содержит также три сайта *N*-гликозилирования и четыре сайта *O*-гликозилирования, в соответствии с кристаллической структурой PDB ID 7A8V. Для ферментов, продуцируемых мицелиальными грибами рода *Penicillium*, описано *N*-гликозилирование состава $(Man)_{0-15}(GlcNAc)_2$ или $(GlcNAc)_{1-2}$, где Man и GlcNAc – остатки маннозы и N-ацетилглюкозамина [21–24], что согласуется с увеличением молекулярной массы ПМО *P. verruculosum* с 31,7 кДа для белковой части до 35 кДа для гликопептида. Несмотря на наличие в пространственной структуре исходного фермента двух S–S-связей, действие 2-МЭ не влияло на положение белковой полосы (рис. 3). Одинаковая молекулярная масса в присутствии и в отсутствие 2-МЭ, а также соответствие наблюдаемой молекулярной массы теоретической массе гликопептида позволили предположить, что восстановление S–S-связей в ПМО *P. verruculosum* под действием 2-МЭ было обратимым. Повторное образование S–S-связи из двух сульфгидрильных групп цистеина возможно, если остатки цистеина сохраняют близкое положение в пространстве даже при термоденатурации фермента [25]. Для ПМО V90C/A130C и ПМО A166C/A172C, напротив,

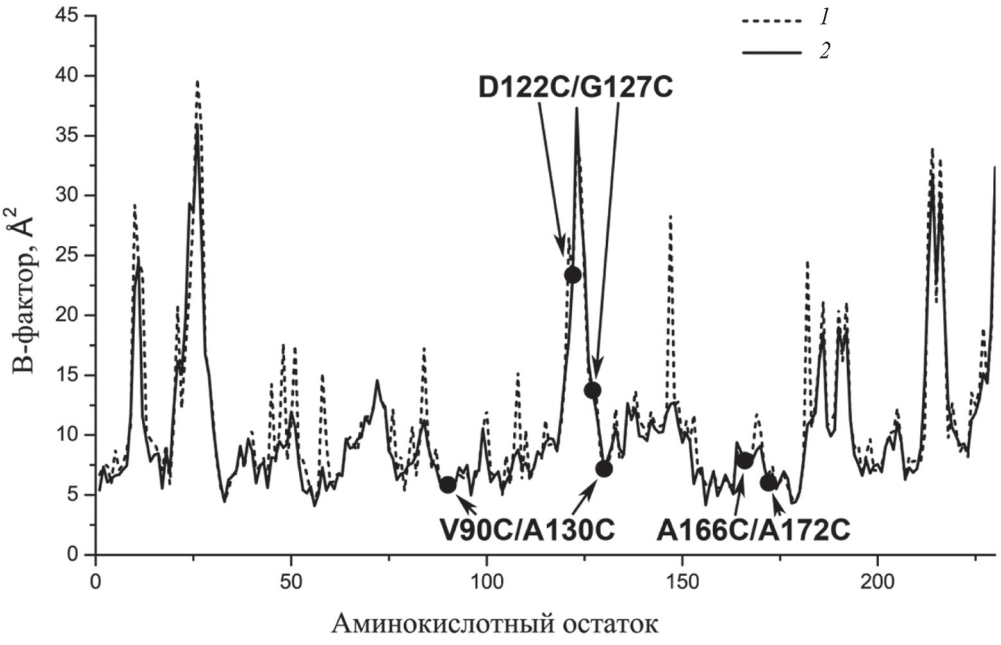


Рис. 2. Значение B-фактора для аминокислотных остатков в пространственной структуре ПМО *P. verruculosum* (PDB ID 7A8V): *1* – все атомы, *2* – пептидный остов

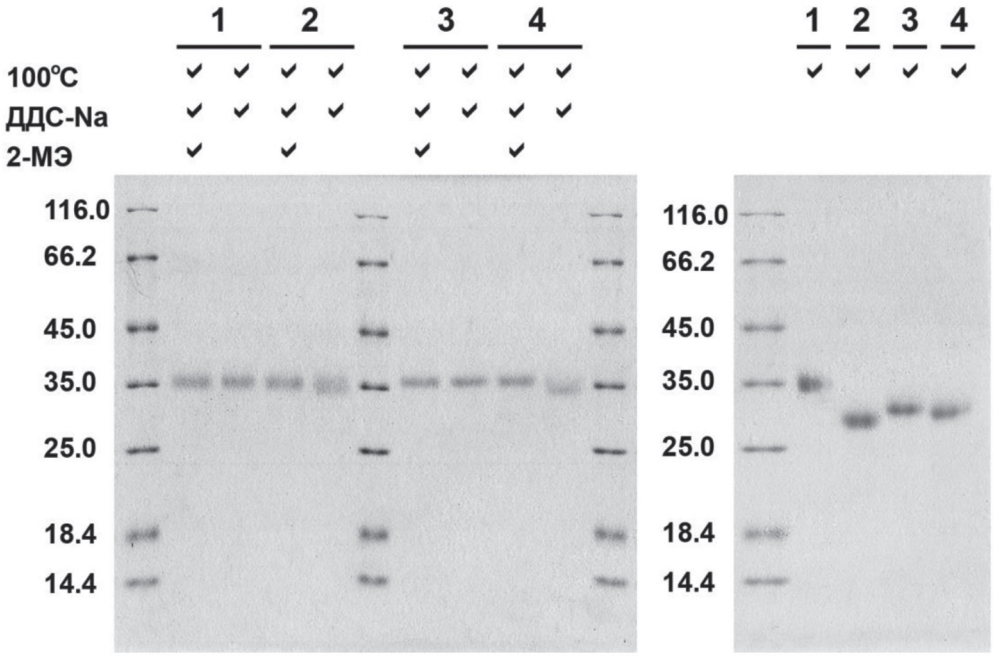


Рис. 3. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (1 – исходный фермент ПМО *P. verruculosum,* 2 – ПМО V90C/A130C, 3 – ПМО D122C/G127C, 4 – ПМО A166C/A172C). Условия пробоподготовки: кипячение при 100 °C в течение 20 мин в присутствии или в отсутствие додецилсульфата натрия (ДДС-Na) и 2-меркаптоэтанола (2-МЭ). Крайние полосы на пластине геля соответствуют маркеру молекулярной массы в кДа

отсутствие 2-МЭ приводило к снижению детектируемой молекулярной массы. Нагревание ПМО V90C/A130C и ПМО A166C/A172C в присутствии ДДС-Na и 2-МЭ приводило к получению белковой полосы 35 кДа, эквивалентной полосе для исходного фермента (рис. 3). Таким образом, восстановление S–S-связей V90C/A130C и A166C/A172C в присутствии 2-МЭ было необратимым в условиях проведения электрофореза.

Для ПМО D122C/G127C, аналогично исходному ферменту, действие 2-МЭ не влияло на положение белковой полосы (рис. 3). Это позволило предположить, что восстановление S–S-связи D122C/G127C было обратимым, как и восстановление двух нативных связей C56-C178 и C97-C101 в исходном ферменте. При нагревании аликвот всех форм фермента с а.к. заменами в отсутствие ДДС-Na и 2-МЭ были получены белковые полосы меньшей молекулярной массы, чем в случае исходного фермента, что подтверждает большую компактность белковых глобул и образование S–S-связей в случае а.к. замен V90C/A130C, D122C/G127C и A166C/A172C (рис. 3).

Образование S–S-связей между остатками цистеина и отсутствие свободных сульфгидрильных групп в ПМО V90C/A130C, ПМО D122C/G127C и ПМО A166C/A172C было также подтверждено методом Элмана. Как исходный фермент, так и формы с а.к. заменами не давали окрашенного продукта при инкубировании с реактивом Элмана. Предварительный нагрев аликвот форм фермента при 100 °C в течение 15 мин, а также нагрев при 100 °C в течение 15 мин в присутствии денатурирующего агента гуанидин гидрохлорида не приводили к положительной реакции, протекающей при взаимодействии реактива Элмана с сульфгидрильной группой.

Для сравнения ферментативной активности форм ПМО с а.к. заменами и активности исходного фермента была использована катализируемая ПМО реакция окисления 2,6-ДМФ в присутствии H_2O_2 в качестве косубстрата. В этой реакции из синтетического субстрата 2,6-ДМФ и H_2O_2 образуется хромогенный продукт, детектируемый спектрофотометрически, что делает метод определения активности ПМО быстрым и чувствительным [18, 19].

Ферментативная активность ПМО V90C/A130C и ПМО D122C/G127C при 30 °C превосходила активность исходного фермента в 1,7 и 1,9 раз соответственно. При этом активность ПМО

A166C/A172C была эквивалентна активности исходного фермента. Увеличение активности для двух из трех форм фермента с а.к. заменами коррелировало с расположением добавленных S–S-связей в пространственной структуре ПМО. S–S-связи V90C/A130C и D122C/G127C ограничивают один из самых подвижных участков в а.к. цепи ПМО, в отличие от A166C/A172C (рис. 2). Кроме того, участок а.к. цепи V90–A130 находится рядом с активным центром фермента (рис. 1).

Увеличение активности, полученное для ПМО V90C/A130C и ПМО D122C/G127C, было аналогично эффекту, известному для а.к. замен N78C/H116C в ПМО *C. japonicus* [7]. В случае ПМО *C. japonicus,* S–S-связь был добавлена в подвижные участки в пространственной структуре и позволила увеличить в 1,5 раза ферментативную активность в реакции с 2,6-ДМФ и H_2O_2 [7]. Если увеличение активности ПМО в результате а.к. замен V90C/A130C и D122C/G127C можно объяснить большей стабильностью пространственной структуры, то влияние этих а.к. замен на термостабильность фермента оказалось более многофакторным. По результатам дифференциальной сканирующей флуориметрии температура плавления $T_{пл.}$, определяемая как температура для 50% от максимального значения на кривой роста интенсивности флуоресценции, составила соответственно 94,2±0,1; 95,0±0,1; 94,3±0,1 и 96,3±0,1 °C для исходного фермента и форм с а.к. заменами V90C/A130C, D122C/G127C и A166C/A172C (рис. 4). При этом форма кривых на графике зависимости интенсивности флуоресценции от температуры отличалась для исходного фермента и форм с а.к. заменами, что свидетельствует об изменении динамики денатурации. Для двух форм (ПМО V90C/A130C и ПМО D122C/G127C) наблюдалось значительное расширение пика. Отметим, что для этих же форм было обнаружено увеличение ферментативной активности при 30 °C в 1,7–1,9 раз.

При термоинактивации только для ПМО D122C/G127C наблюдалась большая остаточная активность при 60 и 70 °C. Две другие формы фермента (ПМО V90C/A130C и ПМО A166C/A172C) были менее стабильны, чем исходный фермент (рис. 5). По литературным данным,

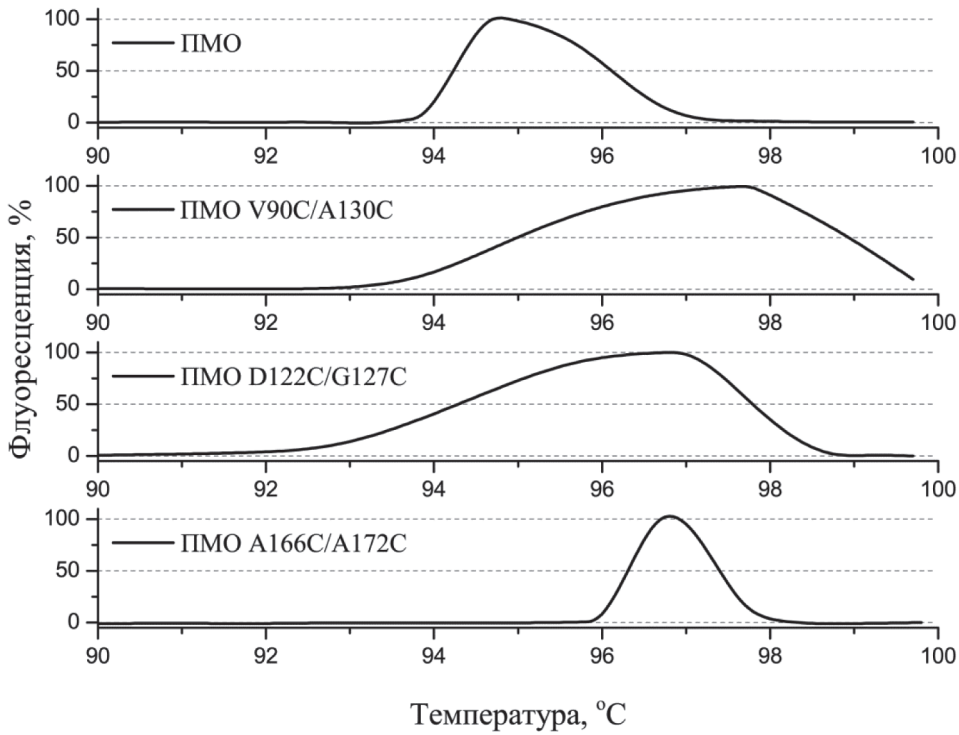


Рис. 4. Дифференциальная сканирующая флуориметрия ПМО *P. verruculosum* и форм фермента с а.к. заменами V90C/A130C, D122C/G127C и A166C/A172C

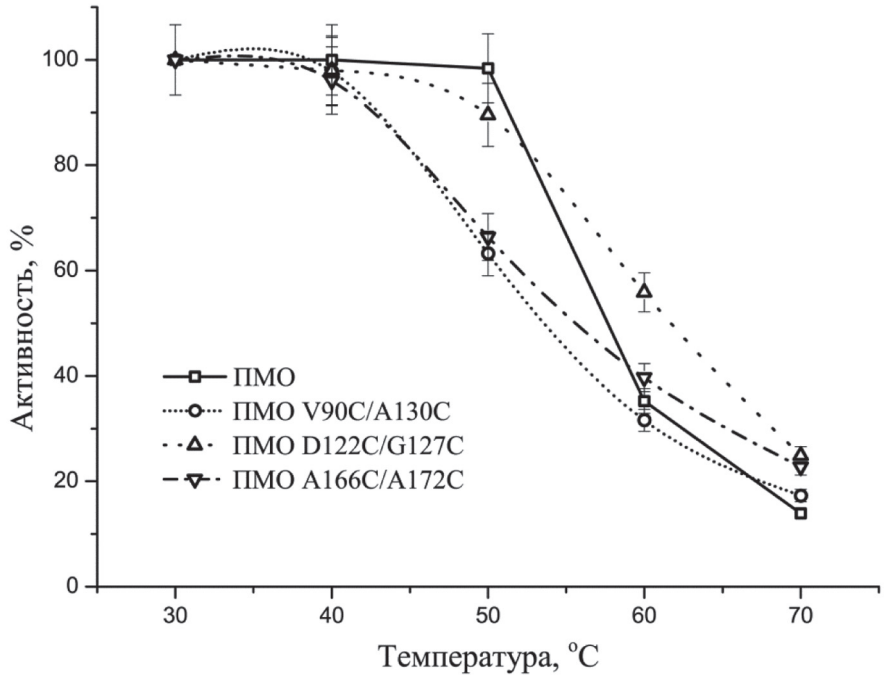


Рис. 5. Остаточная активность ПМО *P. verruculosum* и форм фермента с а.к. заменами V90C/A130C, D122C/G127C и A166C/A172C после 15 мин инкубирования при температуре 30–70 °C

S–S-связь N78C/H116C увеличивала термостабильность ПМО *C. japonicus* в три раза при 60 °C [7], а комбинация S–S-связей A143C/P183C и S73C/A115C в ПМО *S. coelicolor* – в два раза при 80 °C [8].

Как исходный фермент, так и формы с а.к. заменами сохраняли менее 30% активности после инкубирования при 70 °C. В данном эксперименте исследования были проведены в диапазоне температуры 30–70 °C. Аликвоты раствора фермента инкубировали при 30–70 °C в течение 15 мин, после чего сразу переносили в реакционную смесь с 2,6-ДМФ и H_2O_2, термостатируемую при 30 °C, для определения ферментативной активности. Соотношение объема аликвоты и общего объема реакционной смеси составляло 1:10, что нивелировало различие в температуре аликвоты и реакционной смеси. Однако, если к стадии инкубирования фермента при повышенной температуре 30–100 °C добавить стадию охлаждения при 4 °C в течение 30 с для устранения дополнительного нагрева реакционной смеси при смешивании с аликвотой, то форма кривых принципиально меняется (рис. 6). Исходный фермент демонстрировал почти 100% активности в температурном диапазоне 30–85 °C. Все формы с а.к. заменами показали в этой схеме эксперимента меньшую остаточную активность, чем исходный фермент. При этом кривые для ПМО V90C/A130C и ПМО D122C/G127C были сходны и превышали кривую для ПМО A166C/A172C (рис. 6).

Увеличение до 20 ч продолжительности инкубирования при 4 °C после 15 мин термоинактивации при 100 °C позволило полностью восстановить активность как исходного фермента, так и форм с а.к. заменами (рис. 7). Скорость восстановления активности отличалась для исходного фермента и форм с а.к. заменами. Если исходный фермент за 10 мин инкубирования при 4 °C полностью восстанавливал активность, то ПМО V90C/A130C, ПМО D122C/G127C и ПМО A166C/A172C – только 75±5, 90±6 и 68±5% соответственно.

Способность восстанавливать пространственную структуру и ферментативную активность при охлаждении после термоденатурации известна, например, для ПМО *Thermoascus aurantiacus* [26] и нескольких ПМО, продуцируемых *Cellulomonas flavigena* и *C. fimi* [27]. В ПМО *T. aurantiacus* S–S-связи сохранялись при термоденатурации и были необходимы для повторного рефолдинга [26]. В то время как для ПМО *C. flavigena* и *C. fimi* было продемонстрировано, что атом меди в активном

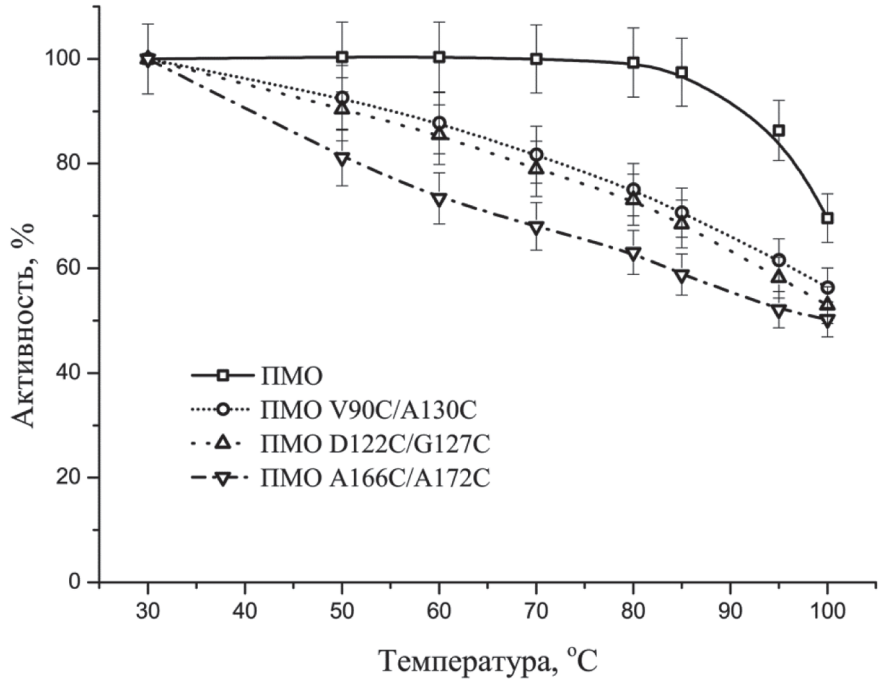


Рис. 6. Остаточная активность ПМО *P. verruculosum* и форм фермента с а.к. заменами V90C/A130C, D122C/G127C и A166C/A172C после 15 мин инкубирования при температуре 30–100 °C с последующим охлаждением в течение 30 с при 4 °C

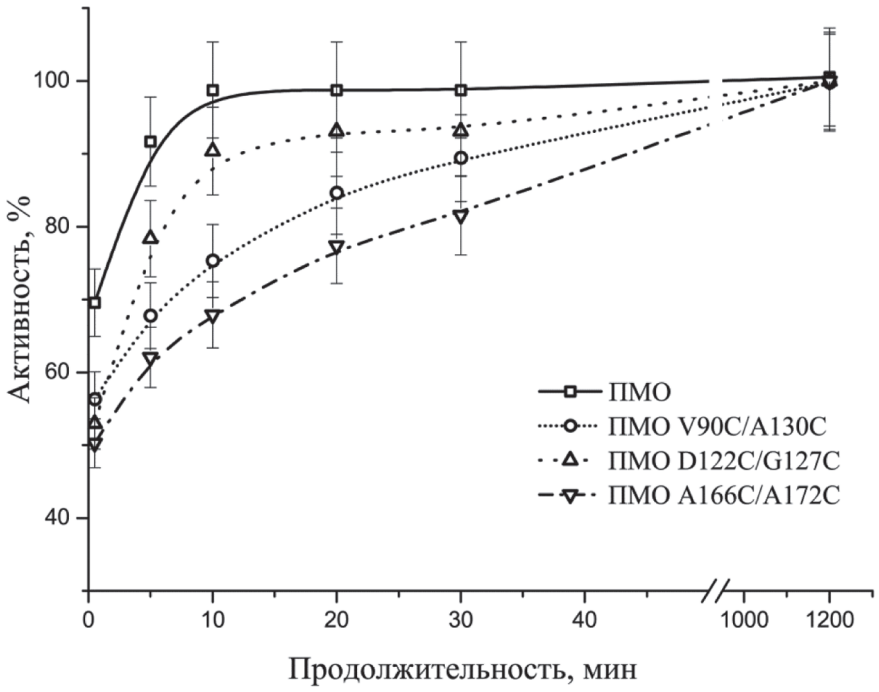


Рис. 7. Активность ПМО *P. verruculosum* и форм фермента с а.к. заменами V90C/A130C, D122C/G127C и A166C/A172C после 15 мин термоинактивации при 100 °C с последующим охлаждением в течение времени от 30 с до 20 ч при 4 °C

центре поддерживает пространственную структуру, обеспечивая термостабильность и рефолдинг после термоденатурации [27]. Эти литературные данные согласуются с результатами, ранее полученными для ПМО *P. verruculosum*. Удаление атома меди из пространственной структуры ПМО *P. verruculosum* снижало температуру плавления фермента на 10–11 °C [9].

Таким образом, для ПМО *P. verruculosum* и форм этого фермента с а.к. заменами V90C/A130C, D122C/G127C и A166C/A172C была обнаружена способность полностью восстанавливать ферментативную активность после термоденатурации. Наблюдаемые зависимости остаточной активности от температуры инкубации отражали сумму двух противоположных процессов: термоденатурации при нагревании и рефолдинга при охлаждении. Из трех форм с а.к. заменами наибольшую скорость восстановления активности проявляла форма с заменами D122C/G127C (рис. 7), что коррелировало с наибольшей остаточной активностью при термоинактивации при 30–70 °C без стадии охлаждения (рис. 5) и наименьшим изменением $T_{пл.}$ (рис. 4). А.к. замены D122C/G127C повысили термостабильность ПМО при 60 и 70 °C, при этом увеличили и ферментативную активность при 30 °C в 1,9 раз. Положительное влияние этих замен может быть связано с уникальным расположением S–S-связи D122C/G127C в пространственной структуре фермента. Петля из а.к. остатков 122–127 является одной из самых подвижных в пространственной структуре (рис. 2), при этом она достаточно короткая для того, чтобы оставаться независимой от остальной белковой глобулы в процессах фолдинга и денатурации.

Другая S–S-связь (V90C/A130C) охватывает ту же петлю 122–127, что и D122C/G127C, но включает еще и четыре коротких β-тяжа и две 3_{10}-спирали. А.к. замены V90C/A130C увеличили ферментативную активность при 30 °C в 1,7 раз и увеличили $T_{пл.}$ на 0,8 °C, однако общее увеличение жесткости белковой глобулы снизило скорость рефолдинга после термоденатурации (рис. 7). А.к. замены A166C/A172C привели к наибольшему увеличению $T_{пл.}$, а именно на 2,1 °C, что коррелировало с наибольшим среди форм с а.к. заменами снижением скорости рефолдинга после термоденатурации в результате увеличения жесткости белковой глобулы (рис. 7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S.J., Liu Z., Zhai H., Sørlie M., Eijsink V.G.H. // Science. 2010. Vol. 330 (6001). P. 219 (DOI: 10.1126/science.1192231).
2. Vaaje-Kolstad G., Forsberg Z., Loose J.S., Bissaro B., Eijsink V.G. // Current Opinion in Structural Biology. 2017. Vol. 44. P. 67 (DOI: 10.1016/j.sbi.2016.12.012).
3. Hangasky J.A., Iavarone A.T., Marletta M.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2018. Vol. 115 (19). P. 4915 (DOI: 10.1073/pnas.1801153115).
4. Dotsenko A., Rozhkova A. Protein Engineering for the Development of New Enzymes Applied to Biomass Conversion in the Biofuel Industry // In: Vandenberghe L.P.d.S., Brar S.K., Srivastava V., Soccol C.R. (eds) Enzymes Applied in Biofuels Production: New Technologies and Innovation. Biofuel and Biorefinery Technologies, vol 16. Springer, Cham. 2025 (DOI: 10.1007/978-3-032-02420-6_11).
5. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. // Biofuels. 2012. Vol. 3 (4). P. 463 (DOI: 10.4155/bfs.12.41).
6. Semenova M.V., Gusakov A.V., Volkov P.V., Matys V.Y., Nemashkalov V.A., Telitsin V.D., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Molecular Biology Reports. 2019. Vol. 46. P. 2363 (DOI: 10.1007/s11033-019-04693-y).
7. Zhou X., Xu Z., Li Y., He J., Zhu H. // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2021. Vol. 9. P. 815990 (DOI: 10.3389/fbioe.2021.815990).
8. Tanghe M., Danneels B., Last M., Beerens K., Stals I., Desmet T. // Protein Engineering, Design and Selection. 2017. Vol. 30 (5). P. 401 (DOI: 10.1093/protein/gzx014).
9. Semenova M.V., Gusakov A.V., Telitsin V.D., Rozhkova A.M., Kondratyeva E.G., Sinitsyn A.P. // BBA - Proteins and Proteomics. 2020. Vol. 1868. P. 140297 (DOI: 10.1016/j.bbapap.2019.140297).
10. Craig D.B., Dombkowski A.A. // BMC Bioinformatics. 2013. Vol. 14. P. 346 (DOI: 10.1186/1471-2105-14-346).
11. Yariv B., Yariv E., Kessel A., Masrati G., Chorin A.B., Martz E., Mayrose I., Pupko T., Ben-Tal N. // Protein Science. 2023. Vol. 32 (3). P. e4582 (DOI: 10.1002/pro.4582).
12. Xia Y., Chu W., Qi Q., Xun L. // Nucleic Acids Research. 2015. Vol. 43 (2). P. e12 (DOI: 10.1093/nar/gku1189).
13. Russell D.W., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual // Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor. NY. USA. 4th ed. 2012.
14. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74 (12). P. 5463 (DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463).
15. Aleksenko A., Makarova N., Nikolaev I., Clutterbuck A. // Current Genetics. 1995. Vol. 28 (5). P. 474 (DOI: 10.1007/BF00310818).

16. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server // In: Walker J.M. (ed.) The proteomics protocols handbook. Humana Press. 2005.
17. Kalab M. // Journal of dairy science. 1970. Vol. 53 (6). P. 711 (DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(70)86279-8).
18. Breslmayr E., Hanžek M., Hanrahan A., Leitner C., Kittl R., Šantek B., Oostenbrink C., Ludwig R. // Biotechnol Biofuels. 2018. Vol. 11. P. 79 (DOI: 10.1186/s13068-018-1063-6).
19. Телицин В.Д., Семенова М.В., Осипов Д.О., Гусаков А.В., Синицын А.П. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2020. Vol. 61 (2). P. 119 (DOI: https://test1.chem.msu.ru/rus/vmgu/202/119.pdf).
20. Dombkowski A.A., Sultana K.Z., Craig D.B. // FEBS Letters. 2014. Vol. 588 (2). P. 206 (DOI: 10.1016/j.febslet.2013.11.024).
21. Hykollari A., Eckmair B., Voglmeir J., Jin C., Yan S., Vanbeselaere J., Razzazi-Fazeli E., Wilson I.B.H., Paschinger K. // Molecular Cellular Proteomics. 2016. Vol. 15. P. 73 (DOI: 10.1074/mcp.M115.055061).
22. Gusakov A.V., Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Biochimie. 2017. Vol. 132. P. 102 (DOI: 10.1016/j.biochi.2016.11.004).
23. Volkov P.V., Gusakov A.V., Rubtsova E.A., Rozhkova A.M., Matys V.Y., Nemashkalov V.A., Sinitsyn A.P. // Biochimie. 2019. Vol. 157. P. 123 (DOI: 10.1016/j.biochi.2018.11.010).
24. Dotsenko A., Denisenko Y., Zorov I., Rozhkova A., Shashkov I. // Protein Expression and Purification. 2025. Vol. 226. P. 106613 (DOI: 10.1016/j.pep.2024.106613).
25. Sasvari Z., Asboth B. // Enzyme and Microbial Technology. 1998. Vol. 22 (6). P. 466 (DOI: 10.1016/S0141-0229(97)00235-4).
26. Singh R.K., Blossom B.M., Russo D.A., van Oort B., Croce R., Jensen P.E., Felby C., Bjerrum M.J. // RSC Advances. 2019. Vol. 9. P. 29734 (DOI: 10.1039/C9RA05920B).
27. Li J., Solhi L., Goddard−Borger E.D., Mathieu Y., Wakarchuk W.W., Withers S.G., Brumer H. // Biotechnology for Biofuels. 2021. Vol. 14. P. 29 (DOI: 10.1186/s13068-020-01860-3).

Информация об авторах

Анна Сергеевна Доценко – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (a.dotsenko@fbras.ru);

Ольга Аркадьевна Синицына – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (oasinitsyna@gmail.com);

Екатерина Александровна Рубцова – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (katefedo@yandex.ru);

Сергей Анатольевич Курзеев – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (kurzeev@gmail.com);

Александра Михайловна Рожкова – ст. науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (amrojkova@yahoo.com);

Иван Никитич Зоров – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (inzorov@mail.ru);

Аркадий Пантелеймонович Синицын – зав. лаб. Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, зав. лаб. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор (apsinitsyn@gmail.com)

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 30.03.2026;
одобрена после рецензирования 14.04.2026;
принята к публикации 20.05. 2026.