

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.15.01

**КИНЕТИКА ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ
ОРАDAAO1 ИЗ ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA* DL-1**

Мария Константиновна Кошкина¹, Егор Павлович Сергеев², Тимофей Алексеевич Федоров³, Михаил Дмитриевич Шеломов⁴, Анастасия Александровна Пометун⁵, Святослав Сергеевич Савин⁶, Владимир Иванович Тишков⁷, Денис Леонидович Атрошенко⁸

¹⁻⁸ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

^{5, 7, 8} Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Авторы, ответственные за переписку: Денис Леонидович Атрошенко, atrdenis@gmail.com; Владимир Иванович Тишков, vitishkov@gmail.com

Аннотация. Проведенная нами ранее аннотация генома дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 позволила идентифицировать в нем пять генов потенциальных оксидаз D-аминокислот. Все гены *opadaao1* – *opadaao5* были клонированы и экспрессированы в *E. coli*. Четыре фермента ОраDAAO1 – ОраDAAO4 получены в высокоочищенном виде, изучены их каталитические свойства. Установлено, что среди всех описанных в литературе на данный момент DAAO фермент ОраDAAO1 с D-Ala имеет наибольшую каталитическую константу k_{cat} , что делает его перспективным для практического применения. Однако для эффективного применения фермента на практике кроме хороших каталитических параметров требуется высокая стабильность и знание механизма инактивации, в том числе и при повышенной температуре. В настоящей работе изучено влияние повышенной температуры на стабильность ОраDAAO1. Показано, что фермент имеет высокую для оксидаз D-аминокислот термостабильность. Изучена кинетика инактивации ОраDAAO1 при разных значениях температуры, начальной концентрации фермента, и при добавлении экзогенного FAD. На основании полученных данных предложена возможная кинетическая схема инактивации.

Ключевые слова: температурная стабильность, кинетика термоинактивации, оксидаза D-аминокислот, *Ogataea parapolyomorpha* DL-1

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-152-162

Список сокращений: DAAO – оксидаза D-аминокислот, ОраDAAO1 – оксидаза D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* DL-1, FAD – флавинадениндинуклеотид.

Финансирование. Эксперименты по термоинактивации выполнены при поддержке Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук (МК-6239.2021.1.4). Вывод уравнения и анализ констант выполнены в рамках государственного задания.

Для цитирования: Кошкина М.А., Сергеев Е.П., Федоров Т.А., Шеломов М.Д., Пометун А.А., Савин С.С., Тишков В.И., Атрошенко Д.Л. Кинетика термоинактивации оксидазы D-аминокислот OpaDAAO1 из дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 2. С. 152–162.

ORIGINAL ARTICLE

**KINETICS OF THERMOINACTIVATION OF D-AMINO ACID OXIDASE
OPADAAO1 FROM THE *OGATAEA PARAPOLYMORPHA* DL-1 YEAST**

Maria K. Koshkina¹, Egor P. Sergeyev², Timofey A. Fedorov³, Михаил Д. Shelomov⁴, Anastasia A. Pometun⁵, Svyatoslav S. Savin⁶, Vladimir I. Tishkov⁷, Denis L. Atroshenko⁸

¹⁻⁸ Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^{5, 7, 8} Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Authors for correspondence: Denis Leonidovich Atroshenko, atrdenis@gmail.com; Vladimir I. Tishkov, vitishkov@gmail.com

Abstract. Our earlier annotation of genome of the yeast *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 made it possible to identify five genes of potential D-amino acids oxidases. All *opadaao1 – opadaao5* genes were cloned and expressed in *E. coli*. Four OpaDAAO1-OpaDAAO4 enzymes were obtained in highly purified form and their catalytic properties were studied. It was found that among all DAAOs described in the literature so far, the enzyme OpaDAAO1 has the highest catalytic constant k_{cat} with D-Ala, which makes it promising for practical applications. However, in addition to good catalytic parameters, effective application of the enzyme in practice requires high stability and knowledge of the inactivation mechanism, including at elevated temperatures. In this work we studied the effect of elevated temperatures on the stability of OpaDAAO1. The enzyme was shown to have high thermal stability in comparison with majority of other D-amino acid oxidases. The kinetics of OpaDAAO1 inactivation at different temperatures, initial concentrations of the enzyme, and in the presence of exogenous FAD were studied. A possible kinetic scheme of inactivation was proposed based on the data obtained.

Keywords: temperature stability, thermal inactivation kinetics, D-amino acid oxidase, *Ogataea parapolyomorpha* DL-1

List of abbreviations: DAAO – D-amino acid oxidase, OpaDAAO1 – amino acid oxidase D from yeast *Ogataea parapolyomorpha* DL-1, FAD – flavinadeninucleotide

Financial support. Thermal inactivation experiments were carried out with financial support within Grant of the President of Russian Federation for state support of young Russian scientists – candidates and doctor fo sciences. Solution of equation for inactivation scheme and constants analysis were done within state research programme.

For citation: Koshkina M.K., Sergeyev E.P., Fedorov T.A., Shelomov M.D, Pometun A.A., Savin S.S., Tishkov V.I., Atroshenko D.L. Kinetics of Thermoinactivation of D-Amino Acid Oxidase OpaDAAO1 from the *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 Yeast // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 2. P. 152–162.

С каждым годом ферменты находят все более широкое применение в разных областях биотехнологии [1]. Стабильность ферментов является критическим фактором, определяющим возможность его практического применения. Проведено много исследований, нацеленных на получение

ферментов, обладающих высокой стабильностью, особенно к воздействию высоких температур. Получение термостабильных ферментов позволяет проводить каталитические реакции при высоких значениях температуры, что повышает активность фермента, снижает риск микробного

заражения, снижает вязкость и повышает растворимость субстратов. Кроме того, использование термостабильных ферментов значительно упрощает процесс их очистки.

Оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) – фермент, который катализирует селективное окисление D-аминокислот в соответствующие α -кетокислоты с образованием пероксида водорода и иона аммония [2–4]. Наиболее подробно термоинактивация DAAO была изучена на примере фермента из почек свиньи (pkDAAO), а также из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) и *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO). Поскольку pkDAAO является мономером, скорость ее термоинактивации не зависит от концентрации фермента [5]. Олигомерное состояние RgDAAO и TvDAAO в большинстве случаев описывают как димерное [6–8]. Для RgDAAO увеличение концентрации с 0,1 до 3,5 мг/мл приводит к увеличению температуры T_m (температуры, при которой фермент теряет половину активности после 30 мин инкубации) с 48 до 57 °С [9]. В работе [10] было показано, что уменьшение концентрации RgDAAO в три раза (с 0,15 до 0,05 мг/мл) приводит к дестабилизации – при 48 °С период полуинактивации снижается с 8 ч до 45 мин. Наличие в растворе экзогенного FAD в концентрации 10 мкМ стабилизирует RgDAAO, в то время как на TvDAAO он не оказывает существенного влияния [8]. В работе [11] было показано, что наличие экзогенного FAD в концентрации 0,1 и 1,0 мМ при концентрации TvDAAO, равной 10 мкМ, приводит к увеличению времени полуинактивации при 50 °С примерно в 1,6 раз в обоих случаях. В отсутствие экзогенного FAD понижение концентрации TvDAAO вызывает снижение температурной стабильности, но добавление 100-кратного избытка FAD приводит к тому, что скорость инактивации перестает зависеть от концентрации фермента. Ранее в нашей лаборатории был подробно изучен процесс инактивации рекомбинантной TvDAAO дикого типа и ее различных мутантных форм при повышенных значениях температуры [12–14]. Установлено, что в диапазоне температур от 50 до 60 °С процесс термоинактивации протекает в две стадии в соответствии с диссоциативным механизмом. Этот механизм включает в себя стадию обратимой диссоциации фермента на субъединицы, которые затем необратимо инактивируются. В работах [15–17] подробно описан механизм диссоциативной термоинактивации олигомерных ферментов.

Ранее нами были клонированы гены, получены и охарактеризованы пять новых DAAO из дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 (будет опубликовано). Оказалось, что среди всех описанных DAAO один из ферментов (OpaDAAO1) с D-Ala и D-Ser обладает наибольшими значениями k_{cat} . Это свойство делает OpaDAAO1 интересным для биотехнологии, в том числе для детекции небольших D-аминокислот и для биокаталитических процессов тонкого органического синтеза. Однако для повышения эффективности практического применения необходимо повысить его температурную стабильность. Для понимания потенциальных путей стабилизации OpaDAAO1 необходимо знать, каким образом происходит его инактивация. Для этого нами было определено олигомерное состояние фермента, а также изучена кинетика инактивации при разных значениях температуры, концентрации фермента и концентрации экзогенного FAD.

Экспериментальная часть

Получение высокоочищенных препаратов OpaDAAO1

Ген *opadaaol* был экспрессирован в клетках *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pOpaDAAO1. Плазмида была получена клонированием гена *opadaaol* в плазмиду pET24a(+) по сайтам рестрикции NdeI и XhoI. Условия культивирования и очистки были идентичны описанным для TvDAAO [13, 14]. Согласно данным аналитического электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, чистота полученных препаратов составляла не менее 98%.

Определение олигомерного состояния OpaDAAO1 с помощью гель-фильтрации

Гель-фильтрацию проводили на колонке «TSK-G 2000 SW» 7,5×600 мм с использованием хроматографической системы фирмы «Knauer» (Германия). Хроматографию проводили в Na-фосфатном буфере (pH 8,0) при трех разных значениях концентрации NaCl: 0,1; 0,3 и 0,5 М. Объем наносимого на колонку образца составлял 0,1 мл. Детекцию проводили на длине волны 280 нм. В качестве стандартов молекулярной массы использовали ДНКазу-I (31 кДа), овальбумин (44 кДа), бычий сывороточный альбумин (66 кДа), овальбумин (75 кДа), альдолазу (158 кДа) и ферретин (440 кДа).

Определение активности оксидазы D-аминокислот

Активность ОраDAAO1 определяли с D-Ala спектрофотометрически на приборе «Shimadzu 1800» с термостатируемым отделением на элементах Пельтье по образованию пероксида водорода с помощью пероксидазы из корней хрена и ее субстрата *o*-фенилендиамина (OPD). В кювету спектрофотометра (рабочий объем 1 мл, оптический путь 1 см) добавляли 870 мкл 20 мМ раствора трис-хлоридного буфера (TrisHCl) (pH 8,0), 100 мкл 500 мМ раствора D-Ala в 20 мМ TrisHCl, 10 мкл раствора OPD (10 мг/мл) в воде и 10 мкл раствора пероксидазы из корней хрена (5 мг/мл) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 6,5). Перед анализом кювету термостатировали не менее 10 мин при 30 °С. Затем в нее добавляли 30 мкл раствора фермента и измеряли изменение поглощения при 460 нм. Активность ОраDAAO1 рассчитывали, исходя из коэффициента экстинкции продукта окисления OPD $11600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Исследование термостабильности ОраDAAO1

Температурную стабильность ОраDAAO1 изучали в 20 мМ Na-фосфатный буфере (pH 6,5) с добавлением глицерина 10% (v/v), в температурном диапазоне 44–52 °С с шагом в два градуса. Концентрационную зависимость стабильности изучали при разных значениях начальной концентрации фермента и фиксированной температуре 48 °С. Для проведения экспериментов готовили серию из пластиковых пробирок объемом 500 мкл, содержащих по 50 мкл раствора фермента заданной концентрации. Пробирки помещали в предварительно нагретый до необходимой температуры водный термостат (точность термостатирования $\pm 0,1$ °С). Через определенные промежутки времени отбирали по одной пробирке. Каждую пробирку помещали в лед на 1–2 мин. Интервал между отбором проб выбирали таким образом, чтобы за время эксперимента активность фермента в образцах уменьшилась до 10–25% от исходной. Остаточную активность измеряли, как описано выше.

В экспериментах по реактивации измерения проводили схожим образом, с той лишь разницей, что пробирки инкубировали заданное время при температуре инактивации, а затем помещали в лед для реактивации, проводя измерения остаточной активности через заданные промежутки времени.

Математическая обработка результатов экспериментов

Для определения кинетических параметров процесса инактивации ОраDAAO1 строили зависимости остаточной активности от времени и проводили их анализ с помощью программы OriginPro 2021b («OriginLab Corporation», США).

Результаты и их обсуждение

Определение олигомерного состояния ОраDAAO1

Для корректного установления механизма термоинактивации фермента необходимо знать его олигомерный состав. Для определения олигомерной формы ОраDAAO1 использовали гель-фильтрационную хроматографию на носителе Toyopearl HW55. Было установлено, что присутствие в буфере 0,3 М NaCl предотвращает неспецифические взаимодействия ОраDAAO1 с носителем. В результате хроматографического анализа установлено, что молекулярная масса ОраDAAO1 составляет 35 кДа, теоретическая молекулярная масса мономерной формы ОраDAAO1 – 36 659 кДа. Таким образом, на основании результатов гель-фильтрационной хроматографии можно сделать вывод, что в растворе ОраDAAO1 находится в виде мономера.

Инактивация ОраDAAO1 при повышенной температуре

Влияние температуры на стабильность ОраDAAO1 было изучено в температурном диапазоне 44–60 °С (рис. 1, А). Поскольку концентрация фермента может влиять на кинетику термоинактивации, на этой стадии эксперимента начальная концентрация ОраDAAO1 в растворе была фиксирована и составляла 30 мкг/мл. Повышение температуры ожидаемо приводит к понижению температурной стабильности фермента. Как правило, для большинства мономерных ферментов термоденатурация проходит по мономолекулярному механизму и зависимость остаточной активности от времени описывается одноэкспоненциальной функцией

$$y = A \cdot \exp(-k_1 \cdot x).$$

Однако при термоинактивации ОраDAAO1 наблюдаемые зависимости в большинстве случаев плохо описываются моноэкспоненциальной функцией и гораздо лучше описываются

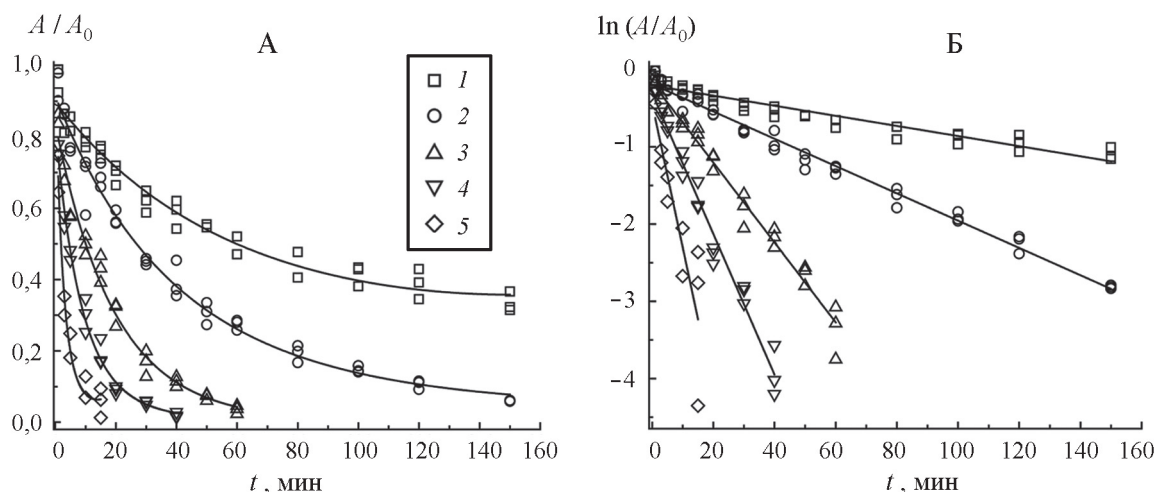


Рис. 1. Зависимости остаточной активности ОраDAAO1 от времени инкубации при разной температуре, °С (1 – 44, 2 – 46, 3 – 48, 4 – 50, 5 – 52) представленные в обычных (А) и полулогарифмических (Б) координатах. 20 мМ Na-фосфатный буфер pH 6,5 с добавлением 10% (v/v) глицерина. Начальная концентрация фермента $[E]_0 = 30$ мкг/мл

суммой двух экспонент. Для подтверждения этого вывода мы провели проверку адекватности моделей аппроксимации кривых зависимости активности фермента от времени одной и двумя экспонентами в соответствии с критерием Фишера (табл. 1). Теоретический коэффициент $F_{\text{теор.}}$ взят из таблицы распределения Фишера для доверительной вероятности, равной 0,95. Предложенная для аппроксимации экспериментальных данных модель считается адекватной, если расчетное значение коэффициента Фишера ($F_{\text{эсп.}}$) меньше теоретического ($F_{\text{теор.}}$) и соответственно отношение $F_{\text{эсп.}} / F_{\text{теор.}} < 1$. Из значений $F_{\text{эсп.}} / F_{\text{теор.}}$, представленных в табл. 1, видно, что двухэкспоненциальная функция $y = A \cdot \exp(-k_1 \cdot x) + (1 - A) \cdot \exp(-k_2 \cdot x)$ значительно лучше описывает полученные зависимости чем моноэкспоненциальная $y = A \cdot \exp(-k \cdot x)$. Это указывает на сложный характер процесса термоинактивации ОраDAAO1, включающего несколько стадий.

Зависимости остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах представляют собой прямые (рис. 1, Б). При диссоциативном механизме инактивации зачастую наблюдаются изломы в координатах ($t, \ln(A/A_0)$), связанные с установлением квазиравновесия. Для ОраDAAO1 в полулогарифмических координатах наличие излома достоверно определить нельзя. Однако все прямые пересекают ось y не в нуле. Диапазон отсекаемых отрезков на оси y составлял 0,16–0,44. Это может быть связано с быстрым установ-

лением равновесия между разными формами фермента во время инактивации.

Влияние начальной концентрации ОраDAAO1 на термостабильность

На рис. 2 представлены результаты исследования термоинактивации при 48 °С и разной концентрации ОраDAAO1. Оказалось, что повышение начальной концентрации фермента приводит к увеличению его стабильности. Это может свидетельствовать о наличии обратной стадии второго порядка. Зависимости в полулогарифмических координатах представляют собой прямые, пересекающие ось y не в нуле.

Влияние экзогенного FAD на термостабильность ОраDAAO1

Как уже отмечалось, в некоторых случаях при термоинактивации RgDAAO и TvDAAO добавление в раствор FAD приводит к повышению стабильности фермента. Аналогичные эксперименты показали, что в случае ОраDAAO1 добавление экзогенного FAD при его соотношении с ферментом от 1:1 до 10:1 приводит также к повышению температурной стабильности фермента (рис. 3). Из этого можно сделать предположение, что предложенная выше обратимая стадия второго порядка протекает с участием молекулы FAD. Отметим, что последующее увеличение концентрации FAD по отношению к концентрации фермента до соотношения 100:1, наоборот, вызывает

Тест на адекватность моделей аппроксимации зависимости остаточной активности от времени по критерию Фишера*

T, °C	$F_{\text{эксп.}}/F_{\text{теор.}}$	
	$y = \exp(-k \cdot x)$	$y = A \cdot \exp(-k_1 \cdot x) + (1 - A) \cdot \exp(-k_2 \cdot x)$
44	8,6	1,1
46	0,49	0,16
48	3,7	0,71
50	5,5	0,78
52	1,04	0,45

* Значения <1 выделены полужирным шрифтом.

дестабилизацию фермента. Это может быть вызвано наличием дополнительных FAD-ассоциированных стадий инактивации, наблюдаемых при высокой концентрации FAD в растворе. Зависимости в полулогарифмических координатах представляют собой прямые, пересекающие ось y не в нуле в отсутствие FAD и при соотношении [FAD] : [OpaDAAO1] = 1:1. Однако при соотношении [FAD] : [OpaDAAO1] = 10:1 отсекаемый на оси y отрезок достоверно нельзя отличить от нуля с учетом ошибки эксперимента. Это может свидетельствовать о смещении равновесной стадии в сторону активной формы OpaDAAO1.

Реактивация OpaDAAO1

На основании предположения о наличии при инактивации равновесной стадии диссоциации FAD можно ожидать, что при остановке воздействия повышенной температуры активность OpaDAAO1 при снижении температуры будет восстанавливаться вследствие смещения равновесия в сторону исходного состояния фермента. Нами была изучена реактивация фермента (рис. 4). Для этого фермент после инкубации при повышенной температуре переносили в лед и проводили определение его активности через определенные промежутки времени (0, 20, 40, 60 мин реактивации).

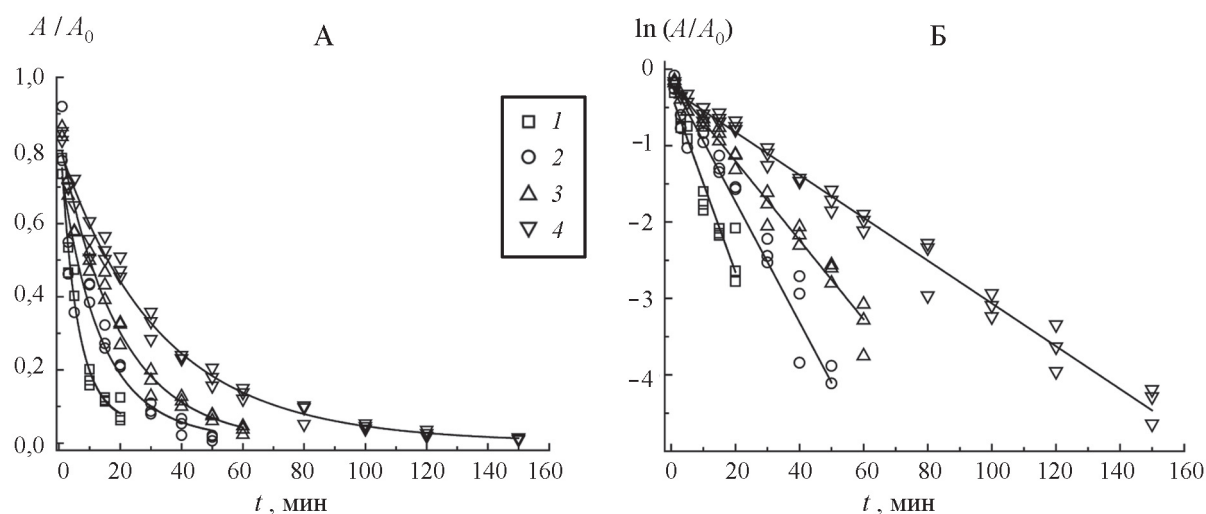


Рис. 2. Зависимости остаточной активности OpaDAAO1 от времени при разных значениях начальной концентрации фермента, мкг/мл (1 – 10, 2 – 20, 3 – 30, 4 – 50) в обычных (А) и полулогарифмических (Б) координатах. 20 мМ Na-фосфатный буфер pH 6,5 с добавлением 10% (v/v) глицерина. T = 48 °C

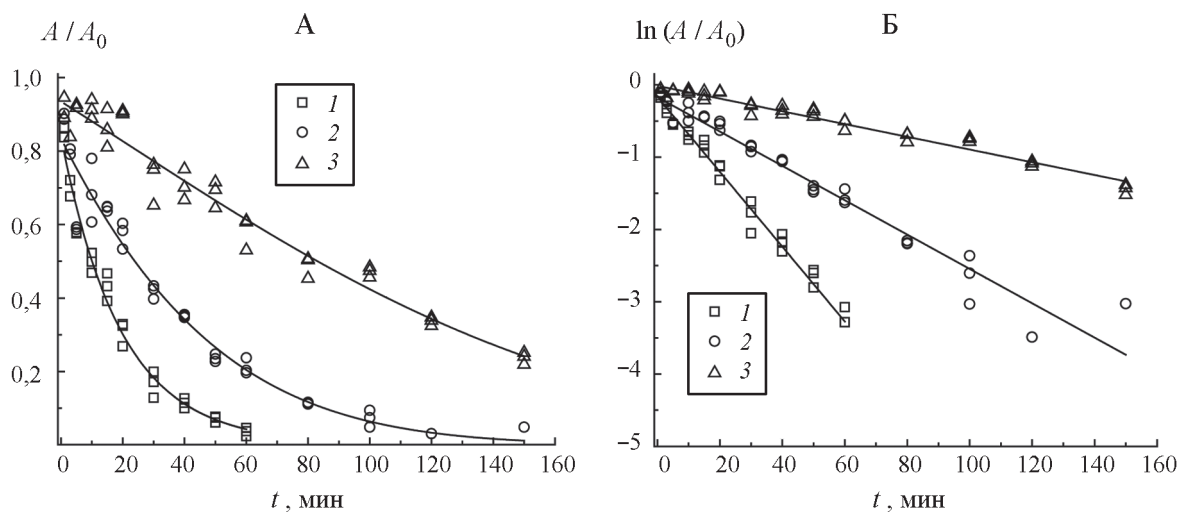


Рис. 3. Зависимости остаточной активности ОраDAAO1 от времени при разных значениях начальной концентрации FAD в обычных (А) и полулогарифмических (Б) координатах (20 мМ Na-фосфатный буфер pH 6,5 с добавлением 10% (v/v) глицерина; $T = 48\text{ }^{\circ}\text{C}$; начальная концентрация фермента $[E]_0 = 30\text{ мкг/мл}$): 1 – без добавления FAD, 2 – $[\text{FAD}]_{\text{ex}} : [\text{ОраDAAO1}]_0 = 1:1$, 3 – $[\text{FAD}]_{\text{ex}} : [\text{ОраDAAO1}]_0 = 10:1$

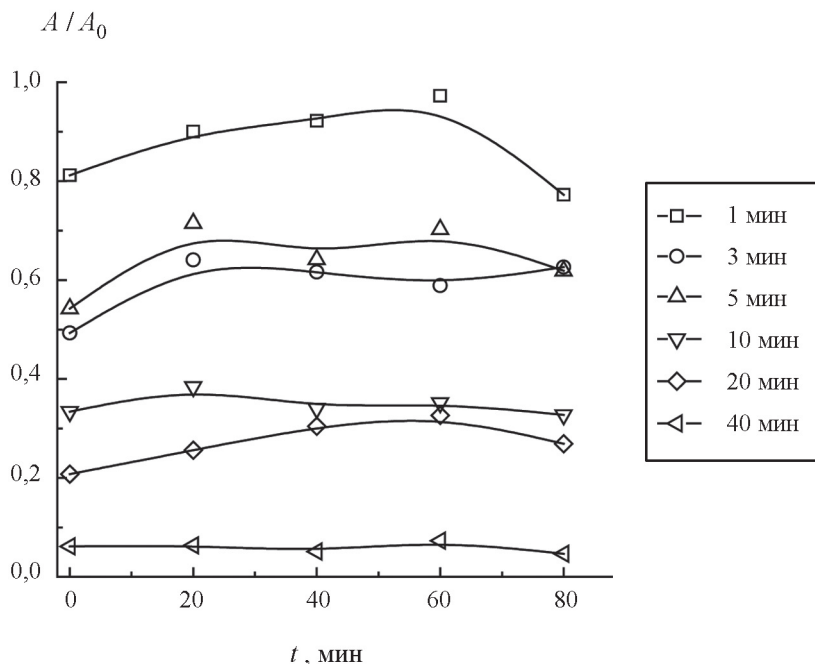


Рис. 4. Исследование реактивации препаратов ОраDAAO1, отобранных после заданного значения времени на стадии термоинактивации при $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20 мМ Na-фосфатный буфер pH 6,5 с добавлением 10% (v/v) глицерина; начальная концентрация фермента $[E]_0 = 30\text{ мкг/мл}$)

Оказалось, что фермент склонен к частичному восстановлению своей активности.

Возможная схема термоинактивации ОраDAAO1

По результатам проведенных экспериментов можно сделать следующие выводы.

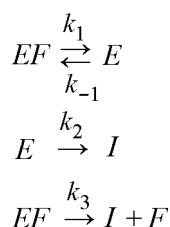
1. ОраDAAO1 в растворе находится в виде мономера.

2. Схема термоинактивации ОраDAAO1 включает в себя обратимую стадию второго порядка.

3. Эта обратимая стадия протекает с участием FAD.

На основании этих выводов мы сделали предположение, что инактивация ОраDAAO1 протекает по механизму, представленному на схеме, где EF и E – холо- и апоформы ОраDAAO1 соответственно; I – денатурированная форма ОраDAAO1; F – молекула FAD.

С х е м а



Холоформа фермента EF содержит связанный FAD и представляет собой активную форму ОраDAAO1. Если принять, что $[E]_0$ – это общая начальная концентрация ОраDAAO1, то отношение $[EF] / [E]_0$ будет определять значение остаточной активности A/A_0 . Эта схема инактивации также объясняет процесс реактивации фермента, который заключается в переходе апоформы фермента в холоформу при остановке термоинактивации. Это происходит в следствие существенного уменьшения значений констант k_1, k_2, k_3 при охлаждении, что приводит к смещению равновесия в сторону исходной холоформы ОраDAAO1.

Вывод уравнений

Уравнения материального баланса:

$$\begin{array}{l} [E]_0 = [E] + [EF] + [I], \\ [E]_0 = [E]_{ex} + [F] + [EF]. \end{array}$$

где $[E]_0$ – начальная концентрация ОраDAAO1, $[F]_{ex}$ – концентрация FAD, дополнительно добавленного в систему. В условиях квазистационарного приближения:

$$-\frac{d[EF]}{dt} = k_2 K_D \frac{[EF]}{[E]_0 + [F]_{ex} - [EF]} + k_3 [EF].$$

Решая это уравнение, получаем следующее:

$$\begin{aligned} & \frac{[E]_0 + [F]_{ex}}{k_2 K_D + k_3 ([E]_0 + [F]_{ex})} \ln \frac{[EF]}{[E]_0} + \\ & + \frac{k_2 K_D}{(k_2 K_D + k_3 [EF]_0 + k_3 [F]_{ex}) k_3} \times \\ & \times \ln \frac{-[EF] + \frac{k_2}{k_3} K_D + [E]_0 + [F]_{ex}}{\frac{k_2}{k_3} K_D + [F]_{ex}} = t. \end{aligned}$$

В большинстве случаев холоформы ферментов стабильнее их апоформ. Кроме того, по результатам эксперимента наблюдается стабилизация фермента при добавлении дополнительного количества FAD, что может служить указанием на большую стабильность холоформы фермента. При $k_2 > k_3$ (холоформа стабильнее апоформы) и значение K_D сравнимо с $[E]_0$ (что верно для большинства белков), одно из слагаемых уравнения можно считать константой:

$$\ln \frac{-[EF] + \frac{k_2}{k_3} K_D + [E]_0 + [F]_{ex}}{\frac{k_2}{k_3} K_D + [F]_{ex}} = \text{const.}$$

Тогда уравнение приобретет вид:

$$\begin{aligned} \ln \frac{[EF]}{[E]_0} & \approx - \frac{([E]_0 + [F]_{ex}) k_3 + k_2 K_D}{[E]_0 + [F]_{ex}} t + \\ & + \frac{k_2 K_D}{(k_2 K_D + k_3 [E]_0 + k_3 [F]_{ex}) k_3} \text{const.} \end{aligned}$$

Следовательно, угол наклона прямой в полупологарифмических координатах ($\ln([EF]/[E]_0) - t$), будет равен наблюдаемой эффективной константе скорости инактивации k_{eff} :

$$k_{eff} = \frac{([E]_0 + [F]_{ex}) k_3 + k_2 K_D}{[E]_0 + [F]_{ex}} = k_3 + \frac{k_2 K_D}{[E]_0 + [F]_{ex}}.$$

С помощью полученного уравнения можно провести оценку констант отдельных стадий, построив зависимость k_{eff} от $1/([E]_0 + [F]_{ex})$ (рис. 5). На основании этой зависимости по

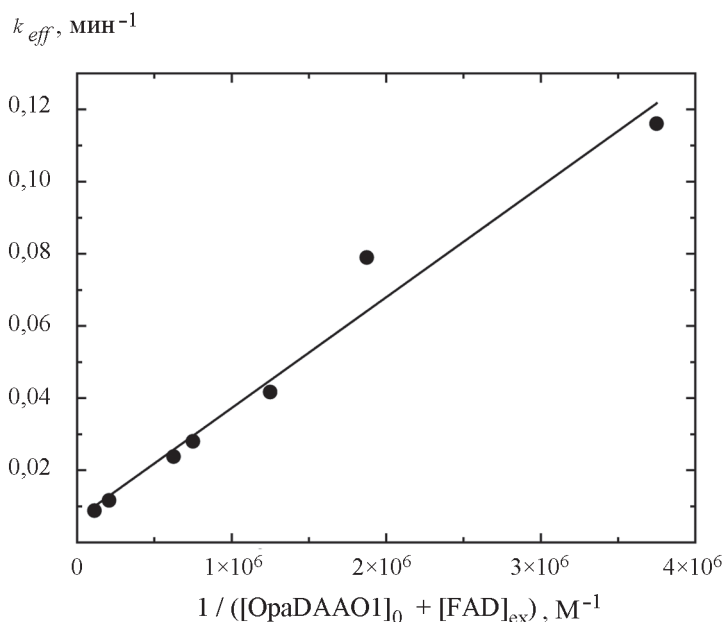


Рис. 5. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации k_{eff} от $1/([E]_0 + [F]_{ex})$

углу наклона можно определить значение $k_2 K_D = (3,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-8} \text{ M} \cdot \text{мин}^{-1}$. С учетом того, что константа диссоциации FAD из активного центра многих оксидаз D-аминокислот составляет порядка $(1-5) \cdot 10^{-8} \text{ M}$, значения k_2 должны находиться в диапазоне $0,6-3,0 \text{ мин}^{-1}$. Значение k_3 , определенное по величине отсекаемого отрезка (рис. 5), составляет $5,6 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$, но точность определения этой величины низкая, поскольку ошибка определения превышает само значение. Тем не менее, сравнение оценочных значений k_2 и k_3 хорошо подтверждает факт более высокой стабильности холоформы по сравнению с апоформой OpaDAAO1.

Таким образом, в ходе настоящей работы подробно изучена кинетика термоинактивации OpaDAAO1 в разных условиях. Показано, что повышение начальной концентрации фермента в диапазоне $10-50 \text{ мкг/мл}$ приводит к повышению температурной стабильности. При добавлении экзогенного количества FAD в отношении 1:1 и 10:1 к начальной концентрации OpaDAAO1 наблюдается эффект стабилизации, в то время как

при отношении 100:1 экзогенный FAD, наоборот, вызывает дестабилизацию. Предложена кинетическая схема, описывающая термоинактивацию в исследуемых условиях. Она включает в себя обратимую стадию диссоциации FAD из активного центра фермента и необратимые стадии инактивации холо- и апоформ OpaDAAO1. Получено аналитическое решение этой схемы в условиях квазиравновесного приближения. Объединив экспериментальные данные, мы оценили величины констант скорости инактивации апо- и холоформ фермента. Результаты сравнения этих констант свидетельствуют о большой разнице в стабильности апо- и холо-OpaDAAO1 в пользу последней. Предложенный нами подход для дискриминации механизма термоинактивации и оценки стабильности можно использовать при анализе других FAD-содержащих ферментов. Кроме того, предложенная кинетическая схема температурной инактивации OpaDAAO1 может быть использована для количественной оценки экспериментов по рациональному дизайну этого фермента в целях повышения его температурной стабильности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Shelomov M.D., Kovalevski R.P., Boiko K.M., Eldarov M.A., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Savin S.S. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. Vol. 73. N 1. P. 1-6 (DOI: 10.3103/S0027131418020153).
2. Khoronenkova S. V., Tishkov V. I. // Biochemistry (Moscow). 2008. Vol. 73. N 13. P. 1511 (DOI: 10.1134/S0006297908130105).
3. Pollegioni L., Diederichs K., Molla G., Um-

- hau S., Welte W., Ghisla S., Pilone M.S. // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 324. N 3. P. 535 (DOI: 10.1016/S0022-2836(02)01062-8).
4. Tishkov V.I., Khoronenkova S.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. Vol. 70. N 1. P. 40–54 (DOI: 10.1007/s10541-005-0050-2).
5. Bakke M., Setoyama C., Miura R., Kajiyama N. // *Biotechnol. Bioeng.* 2006. Vol. 93. N 5. P. 1023-1027 (DOI: 10.1002/bit.20754).
6. Kubicek-Pranz E.M., Röhr M. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1985. Vol. 7. N 2. P. 104.
7. Szwajcer E., Mosbach K. // *Biotechnol. Lett.* 1985. Vol. 7. N 1. P. 1 (DOI: 10.1007/Bf01032410).
8. Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M.S. // *Biotechnol. Prog.* 2004. Vol. 20. N 2. P. 467 (DOI: 10.1021/bp034206q).
9. Pollegioni L., Iametti S., Fessas D., Caldinelli L., Piubelli L., Barbiroli A., Pilone M.S., Bonomi F. // *Protein Sci.* 2003. Vol. 12. N 5. P. 1018 (DOI: 10.1110/ps.0234603).
10. Betancor L., Hidalgo A., Fernández-Lorente G., Mateo C., Rodríguez V., Fuentes M., López-Gallego F., Fernández-Lafuente R., Guisan J.M. // *Biotechnol. Prog.* 2003. Vol. 19. N 3. P. 784 (DOI: 10.1021/bp025761f).
11. Dib I., Slavica A., Riethorst W., Nidetzky B. // *Biotechnol. Bioeng.* 2006. Vol. 94. N 4. P. 645–654 (DOI: 10.1002/bit.20854).
12. Хороненкова С.В. Рекомбинантная оксидаза D-аминокислот: получение и структурно-функциональные исследования: Дис. ... канд. хим. наук. М., 2008. 162 с.
13. Atroshenko D.L., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2016. Vol. 71. N 4. P. 243 (DOI: 10.3103/S0027131416040039).
14. Atroshenko D.L., Shelomov M.D., Zarubina S.A., Negrú N.Y., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20. N 18. Paper 4412 (DOI: 10.3390/ijms20184412).
15. Poltorak O.M., Chukhray E.S., Torshin I.Y. // *Biochemistry (Mosc)*. 1998. Vol. 63. N 3. P. 303.
16. Полторак О.М., Чухрай Е.С., Ташлицкий В.Н., Сванидзе Р.С. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 1980. Т. 21. № 3. P. 224.
17. Полторак О.М., Чухрай Е.С. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 1979. Т. 20. № 3. P. 195.

Информация об авторах

Кошкина Мария Константиновна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, mariia.koshkina@chemistry.msu.ru;

Сергеев Егор Павлович – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, egor.sergeev001@yandex.ru;

Федоров Тимофей Алексеевич – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, [timoteo2001@mail.ru](mailto:timotoe2001@mail.ru);

Шеломов Михаил Дмитриевич – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, scarshell@gmail.com;

Пометун Анастасия Александровна – ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, aapometun@gmail.com;

Савин Святослав Сергеевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук, savinslava@gmail.com;

Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; докт. хим. наук, профессор, vitishkov@gmail.com;

Атрошенко Денис Леонидович – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук, atrdenis@gmail.com.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.09.2022;
одобрена после рецензирования 12.10.2022;
принята к публикации 14.10.2022.