

## ВЛИЯНИЕ ОСМОЛИТОВ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ РЕАКЦИЮ БАКТЕРИЙ: СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

© 2020 г. Л.А. Суковатый\*, А.Е. Лисица\*, В.А. Кратасюк\*, \*\*, Е.В. Немцева\*, \*\*

\*Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, Свободный просп., 79

\*\*Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

E-mail: lsukovaty@sfu-kras.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принята к публикации 24.07.2020 г.

Исследовано влияние вязких сред с глицерином и сахарозой (10–40%) на кинетику биолюминесцентной реакции бактерий методом остановленного потока. Показано увеличение квантового выхода реакции при концентрации осмолитов  $\geq 10\%$ . Дальнейшее увеличение концентрации до 30–40% приводит к снижению количества испускаемых квантов света в средах с глицерином, в то время как для сахарозы подобный эффект не наблюдается. Моделирование молекулярной динамики бактериальной люциферазы в окружении молекул воды и различного количества молекул глицерина и сахарозы показало, что оба осмолита в исследованном диапазоне концентраций не оказывают значительного эффекта на конформацию белка. Расчет среднеквадратичной флуктуации  $C_{\alpha}$ -атомов  $\alpha$ -субъединицы люциферазы указывает на то, что увеличение квантового выхода в присутствии 10% сахарозы и глицерина может объясняться большей подвижностью мобильной петли фермента по сравнению с водным окружением. Установлено, что глицерин, в отличие от сахарозы, имеет доступ в активный центр бактериальной люциферазы, а при высоких концентрациях (30 и 40%) вытесняет оттуда молекулы воды на протяжении всего времени моделирования (40 нс), что может объяснять снижение квантового выхода реакции.

*Ключевые слова:* биолюминесценция, светящиеся бактерии, бактериальная люцифераза, осмолит, молекулярная динамика, структура и динамика белка.

DOI: 10.31857/S0006302920060137

Биохимической основой биолюминесценции бактерий является реакция окисления восстановленного флавинонуклеотида (FMN) и длинноцепочечного альдегида кислородом воздуха, катализируемая ферментом – люциферазой [1, 2]. Светящиеся бактерии обитают по всему мировому океану: от глубоководных участков, при температуре около  $0^{\circ}\text{C}$ , до тропических вод, где температура поверхности может превышать  $30^{\circ}\text{C}$  [2]. В окружающей среде бактерии регулярно сталкиваются с изменением условий – температуры, pH, осмотического давления, радиации, концентрации питательных веществ и токсинов. Одна из стратегий, обуславливающих адаптивный потенциал бактерий в изменяющихся условиях, заключается в накоплении растворенных органических веществ в ответ на повышение осмолярности вне клетки и быстрого высвобождения этих веществ при ее снижении [3, 4]. Эти низкомолекулярные соединения называют осмолитами. Механизм влияния осмолитов на активность ферментов,

обеспечивающих функцию биолюминесценции бактерий, в настоящее время не исследован, хотя их эффекты были неоднократно зарегистрированы [5, 6].

Известно, что осмолиты способны вызывать изменение стабильности и функциональной активности белков [7, 8]. Это обусловлено, в частности, балансом между преимущественной гидратацией белка и преимущественным связыванием молекул осмолита с его поверхностью [9, 10]. Эффект осмолитов на активность ферментов может быть также вызван изменением структурно-динамических свойств отдельных функционально важных участков белка и проникновением осмолитов в область активного центра [8, 11]. В данной работе с помощью методов молекулярного моделирования были исследованы механизмы влияния глицерина и сахарозы на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой. Глицерин и сахароза являются известными осмолитами в бактериальных системах [4], а также соразтворителями, используемыми для изучения

Сокращение: FMN – флавинонуклеотид.

влияния вязкости на ферментативные реакции [8, 11, 12].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие растворы: FMN (Sigma, США), 30 мкМ; ЭДТА (Roth, Германия), 0.02 М; рекомбинантная люцифераза *Photobacterium leiognathi* (ООО «Биолюмдиагностика», Красноярск), 1.96 мкМ; деканаль (Acros Organics, США),  $2 \cdot 10^{-3}$  М; глицерин (Panreac, Испания), 10–40 вес. %; сахароза (Gerbu, Германия), 10–40 вес. %. Все стоковые растворы были приготовлены с использованием калий-натрий фосфатного буфера (0.05 М, pH 6.9), за исключением раствора деканала, который готовили на этаноле.

**Определение активности бактериальной люциферазы в присутствии глицерина и сахарозы.** Регистрировали квантовый выход реакции (общее количество квантов, излученных в реакции за один оборот фермента) как площадь под кинетической кривой, измеренной методом остановленного потока с помощью анализатора кинетики SX-20 (Applied Photophysics, Великобритания) при 20°C. Реакцию инициировали, смешивая раствор люциферазы (1.96 мкМ) с раствором, содержащим фотовосстановленный в присутствии ЭДТА флавиномононуклеотид (30 мкМ) и деканаль (20–100 мкМ). Каждая кинетическая кривая была получена усреднением по пяти повторностям.

**Расчеты молекулярной динамики люциферазы в различных средах.** Трехмерная структура бактериальной люциферазы была получена из банка данных белковых структур (PDB ID: 3FGC) [13, 14]. Для данной структуры было проведено реконструирование участка мобильной петли  $\alpha$ -субъединицы белка (283–290 аминокислотных остатков), как описано в работе [15]. Флавиномононуклеотид, ионы и связанная вода, расшифрованные вместе с люциферазой, были исключены из структуры до старта вычислений.

Вычисление молекулярной динамики структуры бактериальной люциферазы в явном растворителе было проведено с помощью программы GROMACS версии 5.1.4 [16]. Для описания параметров взаимодействия между атомами системы было использовано силовое поле CHARMM36 [17].

Моделируемая система представляла собой кубический бокс с условиями периодической границы, в центре которого размещали молекулу люциферазы. Расстояние между боксом и ферментом составляло 12 Å от любого атома белка. Для создания водного окружения в данный бокс поместили 40821 молекулу воды (модель TIP3P). Начальная геометрия молекул глицерина и сахарозы была взята из Европейского банка данных

белковых структур (PDBeChem ID: GOL и SUC соответственно) [18]. Для моделирования концентраций осмолитов 5, 10, 20, 30 и 40 вес. % в боксе было размещено следующее количество молекул глицерина/воды: 399/38615, 799/36445, 1597/32289, 2396/28208 и 3194/24323 или сахарозы/воды: 108/39109, 215/37443, 430/34136, 645/30819, 859/27589 соответственно. Параметры силового поля для молекулы глицерина были получены с помощью онлайн-сервиса CGenFF [19], для сахарозы – посредством модификации уже известных параметров для  $\alpha$ -D-глюкозы и  $\beta$ -D-фруктозы, как рекомендовано в руководстве к CHARMM36 [16]. Для анализа полученных траекторий использовали программный пакет GROMACS.

До начала моделирования была проведена нейтрализация заряда всей системы, а затем – минимизация ее энергии при изохорно-изотермических (NVT-ансамбль) и изотермо-изобарических (NPT-ансамбль) условиях. В первом случае релаксация систем происходила в течение 5 нс при температуре в 300 К, во втором – в течение 10 нс при постоянной температуре (300 К) и давлении ( $10^5$  Па). Положение тяжелых атомов белка при данных минимизациях было зафиксировано. Далее был проделан еще один этап релаксации NPT-ансамбля в течение 10 нс без фиксации атомов белка, необходимость которого была связана с исключением FMN из активного центра кристаллической структуры люциферазы и реконструированием участка мобильной петли.

Вычисление молекулярно-динамической траектории проводили для канонического NPT-ансамбля при постоянной температуре (300 К) и давлении ( $10^5$  Па) в течение 40 нс с шагом вычисления 2 фс. Для каждой из систем были проведены три независимых запуска, включающих в себя все шаги релаксации и молекулярную динамику.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

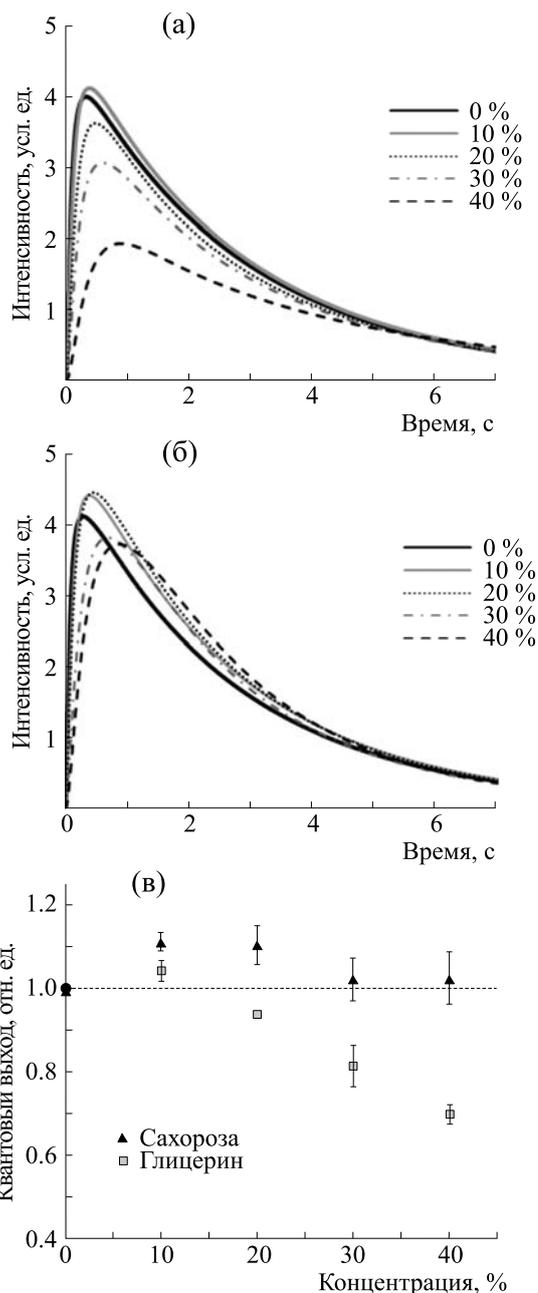
**Влияние глицерина и сахарозы на квантовый выход реакции, катализируемой бактериальной люциферазой.** Была измерена нестационарная кинетика биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в средах с различным содержанием глицерина или сахарозы. Для различных концентраций деканала (10–50 мкМ) наблюдали сходные закономерности изменения кинетики в модельных средах, отраженные на рис. 1а,б. Видно, что эффекты глицерина и сахарозы на кинетику реакции различаются. В области малых концентраций осмолитов (10% для глицерина и 10–20% для сахарозы) наблюдается увеличение максимальной интенсивности свечения. Дальнейший рост содержания осмолитов в среде до 30–40% приводит к снижению мак-

симальной интенсивности, что особенно ярко проявляется для сред с глицерином. Также видно, что в средах с глицерином и сахарозой кинетика реакции замедляется, что выражается в более позднем выходе свечения на максимальный уровень по сравнению с реакцией в буфере. Замедление кинетики может быть связано с увеличением вязкости реакционной среды и, как следствие, уменьшением скорости диффузии компонентов реакции.

На основе кинетических кривых был рассчитан квантовый выход реакции, т. е. общее количество квантов света, излученных за один оборот фермента (рис. 1в). Видно, что присутствие в среде как 10% сахарозы, так и 10% глицерина приводит к увеличению квантового выхода реакции. При высоких концентрациях глицерина (30–40%) эффективность реакции снижается, в то время как в средах с таким же содержанием сахарозы квантовый выход не изменяется по сравнению с контролем (буфер). Полученные тенденции сохраняются при вариации концентрации альдегида в диапазоне 10–50 мкМ. Следует отметить, что такая немонотонная зависимость квантового выхода реакции от концентрации осмолитов говорит о наличии нескольких механизмов их влияния на фермент и/или субстраты, вовлеченные в реакцию. Также очевидно, что наблюдаемые эффекты не могут объясняться только увеличением вязкости раствора, поскольку эта характеристика изменяется монотонно с ростом концентрации осмолитов.

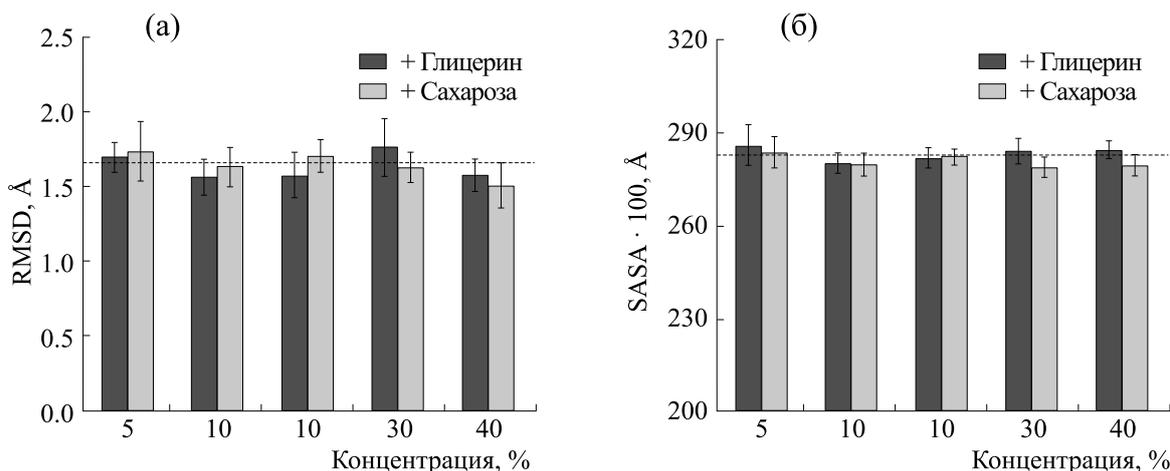
Полученные результаты позволяют предположить, что в присутствии глицерина и сахарозы происходит изменение структурно-динамических характеристик фермента люциферазы в целом, либо функционально важных структурных элементов данного белка. Для выявления таких эффектов были применены методы молекулярного моделирования.

**Влияние глицерина и сахарозы на стабильность и компактность бактериальной люциферазы.** Изменение конформации люциферазы под влиянием осмолитов было оценено с помощью двух параметров: среднеквадратичного отклонения  $C_{\alpha}$ -атомов белка и площади поверхности белка, доступной растворителю. Вычисление среднеквадратичного отклонения было проведено относительно координат атомов в расшифрованной кристаллической структуре люциферазы (PDB ID: 3FGC). Для люциферазы расчет площади поверхности, доступной растворителю, проводили с помощью пробной сферы радиусом 1.4 Å. Значения параметров среднеквадратичного отклонения и площади поверхности, доступной растворителю при различном содержании осмолитов, усредненные для последних 20 нс молекулярного моделирования, представлены на рис. 2.



**Рис. 1.** Кинетика биолуминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в присутствии различных концентраций (в %) глицерина (а) или сахарозы (б) и изменение квантового выхода реакции (в). Концентрация люциферазы – 0.96 мкМ, FMNH<sub>2</sub> – 15 мкМ, C<sub>10</sub> – 50 мкМ. Среднее значение и погрешность определения квантового выхода вычислена на основе экспериментов с разными концентрациями альдегида (10–50 мкМ). Горизонтальная штриховая линия указывает на величину квантового выхода реакции в буфере.

Видно, что при разном количестве глицерина и сахарозы в среде данные параметры варьируют незначительно. Это говорит об отсутствии влия-



**Рис. 2.** Значения среднеквадратичного отклонения  $C_{\alpha}$ -атомов (а) и площади поверхности, доступной растворителю (б), бактериальной люциферазы в средах с осмолитами, усредненные для последних 20 нс молекулярной динамики. Штриховые горизонтальные линии показывают значения для люциферазы в воде.

ния рассматриваемых осмолитов на конформацию люциферазы, аналогично тому, как это было установлено для лизоцима [10]. Таким образом, ингибирующее влияние на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой, сред с 30–40% глицерина не связано с изменением структуры фермента (взаимным положением атомов основной цепи).

**Влияние сред на динамические свойства бактериальной люциферазы.** Для оценки подвижности различных участков бактериальной люциферазы в присутствии осмолитов на основе полученных молекулярно-динамических траекторий был рассчитан такой параметр, как среднеквадратичная флуктуация  $C_{\alpha}$ -атомов  $\alpha$ -субъединицы белка (рис. 3). Видно, что большинство  $C_{\alpha}$ -атомов испытывают небольшие колебания около своего положения с амплитудой  $\leq 1$  Å. Наиболее подвижным элементом  $\alpha$ -субъединицы как в водном окружении, так и в присутствии осмолитов является мобильная петля (262–291 а.о.). Получено, что при 5–10%-м содержании глицерина и сахарозы в среде наблюдается увеличение среднеквадратичной флуктуации данного участка структуры, особенно аминокислотных остатков 282–285 (рис. 3, врезки). При дальнейшем росте концентрации осмолитов влияние среды на подвижность петли пропадает. Известно, что мобильная петля  $\alpha$ -субъединицы играет важную роль в ходе ферментативной реакции [13, 20]. Считается, что данный участок отвечает за стабилизацию интермедиатов реакции и предотвращает попадание молекул растворителя в активный центр после связывания белка с флавином [21].

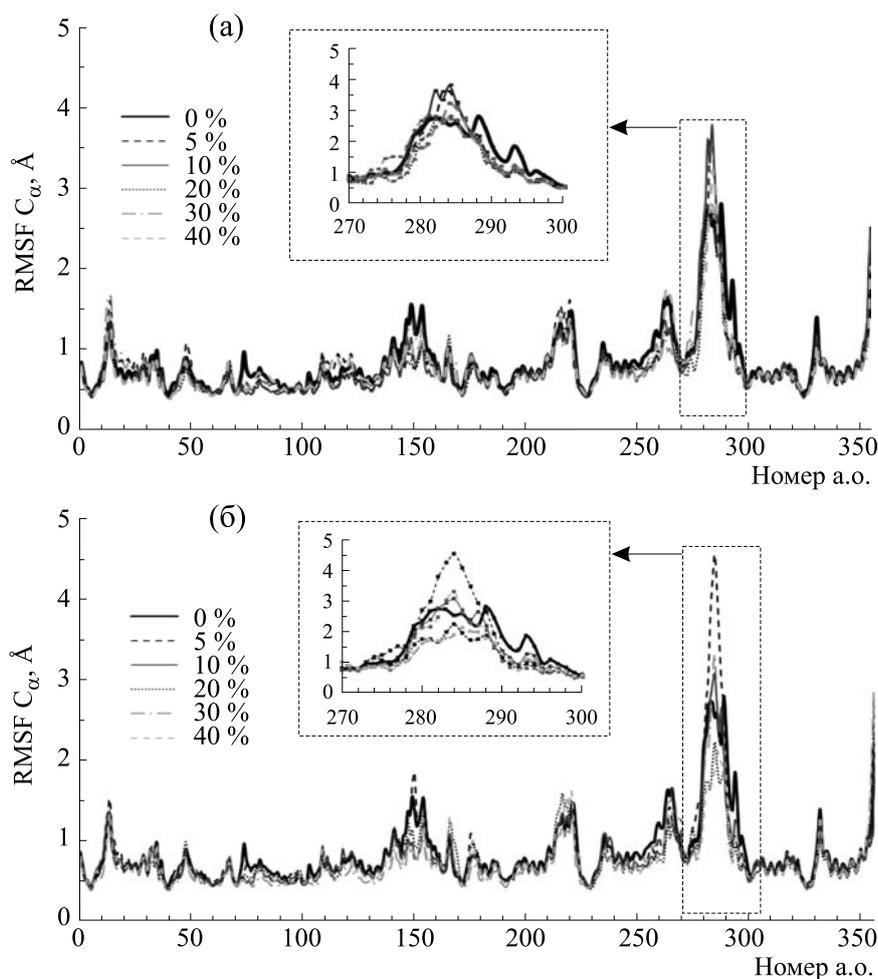
Полученный эффект сред с низкими концентрациями глицерина и сахарозы на мобильность функционально важного участка бактериальной

люциферазы может объяснять увеличение квантового выхода реакции в присутствии 10% глицерина и сахарозы, наблюдавшееся в экспериментах *in vitro* (рис. 1в). Однако он не объясняет снижение квантового выхода реакции при более высоких концентрациях глицерина.

**Доступность активного центра фермента для молекул осмолитов.** Проникновение молекул глицерина или сахарозы в область активного центра фермента может приводить к снижению эффективности реакции за счет таких механизмов, как конкурентное ингибирование, изменение сродства к субстрату посредством изменения полярности среды, нарушение сети водородных связей между функционально важными аминокислотными остатками и других [8, 11, 22].

Для количественной оценки доступности активного центра бактериальной люциферазы для молекул осмолитов было вычислено число молекул глицерина и сахарозы, находящихся на расстоянии  $\leq 8$  Å от атома серы  $\alpha$ Cys106. В рассматриваемую область вошли все аминокислотные остатки, участвующие в связывании флавина. Расчет и усреднение количества молекул осмолитов проводили для последних 20 нс моделирования динамики белка в различных средах.

Установлено, что присутствие молекул глицерина в активном центре наблюдается при всех его концентрациях, изменяется только доля времени, в течение которого глицерин находится там (таблица). При концентрациях 30 и 40% в среднем хотя бы одна молекула глицерина находится в активном центре в течение всего времени моделирования, а количество молекул воды снижается. В то же время в активном центре фермента не было обнаружено ни одной молекулы сахарозы, а количество молекул воды оставалось неизмен-



**Рис. 3.** Среднеквадратичная флуктуация  $C_{\alpha}$ -атомов  $\alpha$ -субъединицы люциферазы в присутствии различных концентраций глицерина (а) и сахарозы (б). На вставках показаны значения среднеквадратичной флуктуации для участка мобильной петли фермента (части последовательности, выделенной серой штриховой рамкой).

ным при увеличении концентрации сахарозы в среде.

Данный результат может объяснять снижение квантового выхода биолюминесцентной реакции в средах с 30 и 40% глицерина и отсутствие такого эффекта при больших концентрациях сахарозы. Разница в доступности области активного центра люциферазы для глицерина и сахарозы может быть связана с размерами этих молекул (их молекулярная масса составляет 92 и 342 Да соответственно). Вероятно, бо́льшая по размеру молекула сахарозы испытывает стерические ограничения, не позволяющие ей проникать в активный центр фермента, в отличие от молекулы глицерина. Аналогичный эффект для других белков был ранее продемонстрирован в ряде работ [7, 8, 22].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизмов влияния природных осмолитов на структуру и функцию белков

является актуальной задачей как с точки зрения необходимости понимания принципов организации метаболизма клеток в экстремальных условиях, так и учитывая потребность в разработке методов стабилизации и активации полипептидов для нужд биотехнологии. Биолюминесцентная реакция бактерий широко используется как элемент различных биоаналитических систем [23, 24].

В данной работе было рассмотрено влияние растворов глицерина и сахарозы (10–40%) на эффективность биолюминесцентной реакции бактерий. Экспериментально было зарегистрировано увеличение квантового выхода реакции при концентрации 10% для обоих осмолитов. В то же время в присутствии 30 и 40% глицерина происходит снижение количества квантов света, испускаемых за один оборот фермента, а высокие концентрации сахарозы не изменяют эффективность реакции. Моделирование молекулярной динамики бактериальной люциферазы в окружении мо-

Число молекул воды и осмолитов в активном центре бактериальной люциферазы

Параметр		Число молекул воды в активном центре, шт.		Число молекул осмолита в активном центре, шт.	
		Глицерин	Сахароза	Глицерин	Сахароза
Концентрация осмолита, %	0	20,1 ± 5,8		0	
	5	19,7 ± 2,6	19,0 ± 2,5	0,2 ± 0,4	0
	10	16,5 ± 4,5	19,4 ± 3,6	0,5 ± 0,6	0
	20	20,6 ± 2,2	20,8 ± 3,4	0,2 ± 0,4	0
	30	15,9 ± 4,0	21,6 ± 2,3	1,1 ± 0,8	0
	40	14,4 ± 3,3	20,6 ± 2,2	1,5 ± 0,7	0

Примечание. Усреднение проведено по последним 20 нс моделирования.

лекул воды и различного количества молекул осмолитов позволило установить возможные механизмы наблюдаемых эффектов: при малых концентрациях глицерина и сахарозы наблюдается увеличение подвижности мобильной петли белка, а при высоких концентрациях глицерина его молекулы непрерывно присутствуют в области активного центра фермента. При этом конформация бактериальной люциферазы не претерпевает существенных изменений в средах с глицерином и сахарозой. Таким образом, в работе установлено, что влияние исследованных осмолитов на функционирование биолюминесцентной системы бактерий может осуществляться через изменение динамических, а не структурных, свойств люциферазы. Интересным новым результатом работы является выявленная избирательность активного центра бактериальной люциферазы относительно химической природы осмолита: молекулы сахарозы не проникают в область связывания субстратов даже при 40%-м содержании в среде, в отличие от молекул глицерина.

Следует заметить, что для понимания того, какой эффект оказывают осмолиты на бактериальную биолюминесценцию *in vivo*, требуется изучение их влияния на активность других ферментов, обеспечивающих свечение бактерий: например, NADH:FMN-оксидоредуктазы, работающей в сопряжении с люциферазой [25].

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (№ FSRZ-2020-0006) и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-04-00420 и № 20-34-90118\20).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. В. Немцева и Н. С. Кудряшева, Успехи химии **76** (1), 101 (2007).
2. J. Lee, *Bioluminescence, the nature of the light* (University of Georgia, 2017).
3. P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, et al., *Science* **217** (4566), 1214 (1982).
4. I. Dandapath, M. Chatterjee, D. Sarkar, et al., in *Cellular osmolytes: From chaperoning protein folding to clinical perspectives*, Ed. by S. L. Rajendrakumar and T. A. Dar (Springer, Singapore, 2017) pp. 229-249.
5. O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, S. Pande, and V. A. Kratasjuk, *Mol. Catalysis* **458**, 60 (2018).
6. О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая и В. А. Кратасюк, Вестн. Оренбург. гос. ун-та **10**, 159 (2013).

7. А. В. Фонин, В. Н. Уверский, И. М. Кузнецова и К. К. Туроверов, *Биофизика* **61** (2), 222 (2016).
8. P. Masson, S. Lushchekina, L. M. Schopfer, and O. Lockridge, *Biochem. J.* **454** (3), 387 (2013).
9. V. Vagenende, M. G. S. Yap, and B. L. Trout, *Biochem.* **48**, 11084 (2009).
10. A. Lerbret, P. Bordat, F. Affouard, et al., *J. Phys. Chem. B* **111**, 9410, (2007).
11. Y. Meng, Y. Yuan, Y. Zhu, et al., *J. Mol. Model.* **19** (9), 3749 (2013).
12. G. Gadda and P. Sobrado, *Biochem.* **57** (25), 3445 (2018).
13. Z. T. Campbell, A. Weichsel, W. R. Montfort, and T. O. Baldwin, *Biochemistry* **48**, 6085 (2009).
14. H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, et al., *Nucl. Acids Res.* **28**, 235 (2000).
15. Z. T. Campbell, Thomas O. Baldwin, and O. Miyashita, *Biophys. J.* **99**, 4012 (2010).
16. D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, et al., *J. Comput. Chem.*, **26** (16), 1701, (2005).
17. R. B. Best, X. Zhu, J. Shim, et al., *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3257 (2012).
18. A. Gutmanas, Y. Alhroub, G. M. Battle, et al., *Nucl. Acids Res.* **42**, 285 (2014).
19. K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, et al., *J. Comput. Chem.* **31**, 671 (2010).
20. R. Tinikul and P. Chaiyen, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **154**, 47 (2016).
21. J. C. Low and S.-C. Tu, *Biochemistry* **41** (6), 1724 (2002).
22. Д. Э. Хоштария, Н. Г. Гогоуадзе и Е. Ульstrup, *Биоорганическая химия* **17** (5), 618 (1991).
23. E. Esimbekova, V. Kratasyuk, and O. Shimomura, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **144**, 67 (2014).
24. E. N. Esimbekova, E. V. Nemtseva, A. E. Bezrukikh, et al., *Toxic. in Vitro* **45**, 128 (2017).
25. A. A. Deeva, E. A. Zyкова, E. V. Nemtseva, and V. A. Kratasyuk, *Proteins* **87** (9), 723 (2019).

## The Effects of Osmolytes on the Bioluminescent Reaction of Bacteria: Structural and Dynamic Aspects

L.A. Sukovatyi\*, A.E. Lisitsa\*, V.A. Kratasyuk\*, \*\*, and E.V. Nemtseva\*, \*\*

\*Siberian Federal University, Svobodnyi prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

\*\*Institute of Biophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

The effects of viscous media with glycerol and sucrose (10–40%) on the kinetics of the bacterial bioluminescent reaction have been investigated by stopped-flow technique. Increment of quantum yield in media with 10% of both osmolytes was shown. Higher concentrations of glycerol, up to 30–40%, were found to reduce the efficiency of the reaction, while this effect was not observed in the media with sucrose. The molecular dynamics simulation was used to study the structure of bacterial luciferase surrounded by either water molecules solely or by mixture of water with various numbers of glycerol/sucrose molecules. It was found that both cosolvents at studied concentrations did not cause a significant change in conformation of bacterial luciferase. The calculated root mean square fluctuations for C $\alpha$ -atoms of bacterial luciferase  $\alpha$ -subunit indicated that the higher flexibility of the enzyme mobile loop could be responsible for increment of quantum yield in the presence of 10% of both osmolytes. The active site of bacterial luciferase was found to be accessible for glycerol molecules while sucrose did not enter catalytic gorge. Moreover, at 30% and 40% concentration the glycerol molecules were found to locate in the active site of bacterial luciferase throughout the whole simulation time (40 ns) and to exclude water molecules, which can explain the experimentally obtained reaction quantum yield decrease.

*Keywords: bioluminescence, luminous bacteria, bacterial luciferase, osmolyte, molecular dynamics, protein structure and dynamics*