

## БИОКАТАЛИЗ-2013

УДК 57.037

РЕГУЛИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ  $\beta$ -АМИЛАЗЫ  
АЛКИЛРЕЗОРЦИНАМИЕ.И. Мартиросова<sup>1</sup>, А.В. Поляков<sup>1</sup>, И.Г. Плащина<sup>1</sup>, Г.И. Эль-Регистан<sup>2</sup>*(<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; <sup>2</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН; e-mail: ms\_martins@mail.ru)*

Изучено влияние двух алкилрезорцинов (метилрезорцина (МР) и гексилрезорцина (ГР) – химических аналогов факторов анабиоза некоторых бактерий) на каталитическую активность  $\beta$ -амилазы. МР повышал активность  $\beta$ -амилазы до 170% в области концентраций 0,8–12,9 мМ при использовании в качестве субстрата водорастворимого картофельного крахмала. ГР стимулировал слабое повышение активности  $\beta$ -амилазы до 115% в диапазоне концентраций 0,05–0,35 мМ. При дальнейшем увеличении концентрации ГР (0,75 мМ) наблюдался эффект ингибирования до 50%. Взаимодействие МР с  $\beta$ -амилазой позволило увеличить конечный выход продуктов гидролиза таких промышленных субстратов как картофельный крахмал и крахмал солода в 1,5–1,6 раз; повысить скорость их гидролиза в 4–5 раз; расширить температурный и рН-диапазоны катализа. Определение кинетических параметров реакции гидролиза крахмала модифицированной резорцинами  $\beta$ -амилазой показало, что в присутствии МР наблюдается неконкурентный тип активации, ГР – неконкурентный тип ингибирования.

**Ключевые слова:** алкилрезорцины,  $\beta$ -амилаза, крахмал, солод, стимуляция и ингибирование каталитической активности.

Регулирование ферментативной активности и функциональной стабильности ферментов – актуальная проблема биотехнологии. Одним из возможных решений проблемы может служить использование в ферментативных процессах некоторых 5-алкилрезорцинов (АР).

Алкилрезорцины широко распространены в природе. Они являются вторичными метаболитами, синтезируемыми высшими растениями, в наибольших количествах зерновыми культурами, некоторыми видами водорослей, мхов, микроорганизмов [1]. Структура 5-алкилрезорцинов состоит из бензольного кольца с двумя гидроксигруппами в положениях 1 и 3 и алкильным заместителем в положении 5. АР отличаются длиной цепи углеводородного заместителя, который состоит из нечетного количества углеродных атомов со степенью ненасыщенности от 0 до 4. Совокупность исследований антиоксидантной активности длинноцепочечных АР (длина алкильного радикала С11–С29) показала перспективность их использования в составе продуктов функционального и лечебного питания в качестве нутрицевтиков, препаратов для профилактики и лечения таких заболеваний, как сердечно-сосудистые и некоторые формы рака, особенно, толстой кишки и молочной железы [2, 3], ишеми-

ческой болезни сердца [4, 5]. Антимикробная активность АР находит применение в медицине [6]. Также известно использование АР в качестве биомаркеров [7]. Короткоцепочечные АР (С1–С6) также проявляют антиоксидантную активность, при этом установлено, что последняя возрастает с увеличением длины алкильного радикала [8, 9]. Однако наибольшие перспективы использования короткоцепочечных АР связаны с их способностью разнонаправленно влиять на активность и стабильность ферментов. Данные эффекты получены с использованием АР – химических аналогов микробных ауторегуляторных факторов [10, 11]. Показано, что действие АР на ферменты зависит от их структуры, концентрации и времени воздействия. Первый член гомологического ряда – метилрезорцин – продемонстрировал способность увеличивать активность гидролаз на 150–400% [12–14]. Гексилрезорцин, обладающий более гидрофобной структурой, в зависимости от концентрации может выступать в качестве как активатора, так и ингибитора ферментативной активности [15, 16]. Другой эффект действия АР на ферменты заключается в существенном расширении их температурного и рН-диапазонов катализа, в которых активность модифицированного фермента была аналогичной или выше,

чем при оптимальных значениях этих параметров у немодифицированного фермента [12, 13, 15]. Наиболее интересным было обнаружение способности АР изменять устойчивость ферментов к денатурирующим воздействиям и расширять субстратную специфичность [15].

Цель данной работы – изучение влияния двух АР (метил- и гексилрезорцинов), отличающихся длиной алкильного радикала, на активность  $\beta$ -амилазы в реакциях гидролиза промышленных субстратов (картофельного крахмала и крахмала солода) в широком диапазоне температур и рН, а также определение кинетических параметров гидролиза крахмала  $\beta$ -амилазой, модифицированной АР.

### Материалы и методы

В исследованиях использовали коммерческий препарат  $\beta$ -амилазы из ячменя КФ 3.2.1.2 (активность 15000 ед/мг) и водорастворимый крахмал из картофеля производства «Fluka». В качестве модификаторов фермента использовали алкилрезорцины – метилрезорцин (МР) с  $M = 124$  г/моль и гексилрезорцин (ГР) с  $M = 194$  г/моль производства «Sigma». МР вносили в реакционные смеси в виде водного раствора, ГР – в виде либо раствора этанола (так, чтобы конечная концентрация спирта в реакционной смеси составляла 5%), либо в виде водорастворимой калиевой соли. Последнюю получали титрованием водного раствора ГР 0,1 Н раствором КОН до значения рН 8,0.

Исходные растворы фермента и АР готовили в концентрациях в два раза больше заданных, смешивали в отношении 1:1 и выдерживали при комнатной температуре 20 мин (предынкубация). В контрольных опытах вместо раствора АР использовали эквивалентное количество растворителя.

**Определение активности фермента.** Готовили раствор водорастворимого крахмала (4 г/л) и раствор  $\beta$ -амилазы (0,4 г/л) в 1,0 М ацетатном буфере рН 4,8. Реакционная смесь включала 1 мл раствора  $\beta$ -амилазы, 4 мл раствора крахмала и 1 мл раствора АР или растворителя. Ферментативный гидролиз проводили в течение 5 мин при 25°C. Реакцию гидролиза останавливали добавлением 2 мл 1,0 Н НСl. Выход продуктов гидролиза определяли по цветной реакции редуцирующих веществ с динитросалициловым реагентом [17].

**Влияние температуры предварительного прогрева** на активность фермента определяли по содержанию мальтозы в опытах по гидролизу крахмала с использованием образцов интактного и модифицированного с помощью АР фермента после их предвари-

тельной термообработки в течение 15, 30, 45 и 60 мин при температуре 45°C. Контроль – гидролиз крахмала интактной  $\beta$ -амилазой, не подвергнутой термообработке. Гидролиз проводили при стандартной температуре 25°C.

**Влияние изменения температуры и рН на стабильности гидролиза** на активность  $\beta$ -амилазы определяли, проводя ферментативные реакции при разных (неоптимальных) значениях температуры (25–65°C) и рН (4,0–8,0).

**Статистическая обработка.** Экспериментальные данные обрабатывали с помощью пакета программ Microsoft Excel (Версия 7.0 для Windows), вычисляя средние значения, стандартную ошибку и доверительный интервал. Достоверность различий между средними величинами оценивали согласно  $t$ -критерию Стьюдента, различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Используемые в исследовании АР различаются по структуре, а именно по длине алкильного радикала, а следовательно, и по гидрофобности молекул, что предполагает различия в характере их влияния на активность фермента.

Исследование влияния МР на активность  $\beta$ -амилазы при гидролизе крахмала проводили в диапазоне концентраций 0,8–12,9 мМ. Максимальная активность фермента (170%) в присутствии наименьшего количества модификатора была получена при концентрации последнего 4,8 мМ (рис. 1). Дальнейшее повышение концентрации МР не влияло на изменение активности фермента. Можно полагать, что данный эффект связан с существованием определенной концентрации насыщения макромолекул белка низкомолекулярным гомологом алкилоксилбензола, при которой образуется «оптимальный» для катализа конформер. При этом нужно учитывать, что  $\beta$ -амилаза может функционировать как белок, состоящий из одной или четырех субъединиц с молекулярной массой до 50000 Да каждая [18]. Поэтому при предынкубации фермента с АР может происходить изменение его четвертичной структуры, дезагрегация на субъединицы или наоборот, увеличение молекулярной массы за счет самосборки субъединиц, вследствие чего ферментативная активность будет также изменяться. Этот вопрос требует дополнительного исследования.

Анализ результатов, полученных при изучении динамики гидролиза крахмала (рис. 2) показал, что высокая скорость гидролиза в варианте с МР (4,8 мМ) и в контроле сохранялась в течение первых 5 мин

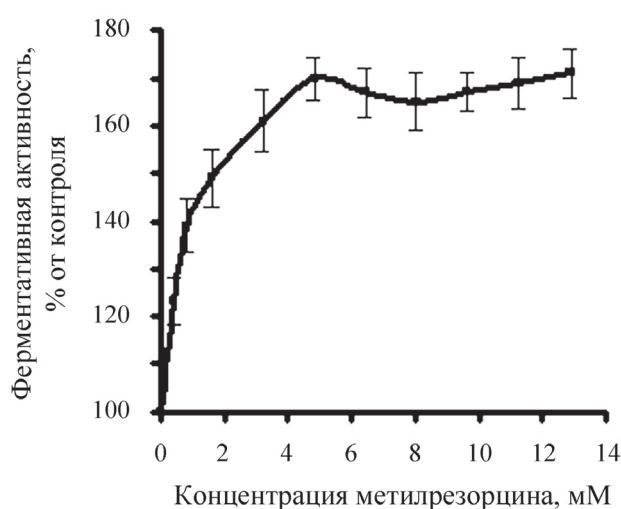


Рис. 1. Зависимость активности β-амилазы в реакции гидролиза крахмала от концентрации МР. Условия: температура 25°C; pH 4,8; 1,0 М ацетатный буфер; концентрация фермента 0,067 мг/мл, субстрата 2,67 мг/мл

процесса, при этом в присутствии модификатора она была существенно выше, затем (через 5–15 мин) она замедлялась, приближаясь к стационарной области в контроле и опыте. Время достижения полного гидролиза составило 30 мин и было одинаково для контрольного и опытного вариантов. Общее количество (приrost) продуктов гидролиза в присутствии МР относительно контроля было выше в 1,6 раза.

На следующем этапе наших исследований мы применяли в качестве субстрата широко используемый в бродильном производстве пивоваренный солод, в котором содержание крахмала составляет 60%.

В результате исследований показано, что модификация β-амилазы МР позволяет интенсифицировать и улучшать конечные показатели процесса гидролиза крахмала промышленного субстрата (рис. 3). Общий выход мальтозы через 1 ч процесса составил 4,5 мг/мл, что в 1,5 раза больше, чем в контрольном варианте.

Следует отметить, что гидролиз как водорастворимого картофельного крахмала, так и крахмала солода немодифицированной β-амилазой целесообразно проводить в течение приблизительно 20–30 мин, поскольку дальнейшее увеличение времени процесса уже не приводит к существенному повышению выхода продуктов гидролиза (рис. 2, 3). Аналогичное содержание мальтозы в варианте с модифицированной МР β-амилазой достигается уже после первых 4–5 мин ведения процесса. Таким образом, общее время гидролиза в присутствии МР может быть сокращено в 4–5 раз.

Для модификации β-амилазы гексилрезорцином использовали его калийную соль, основываясь на сравнении данных предварительных экспериментов, в которых калийная форма ГР демонстрировала меньший ингибирующий эффект, чем спиртовая форма ГР в отношении активности ферментов.

В случае обработки β-амилазы ГР имел место достоверный активирующий эффект (115% от контроля) в области концентраций от 0,05 до 0,35 мМ (рис. 4). При дальнейшем увеличении концентрации модификатора (до 1,29 мМ) происходит ингибирование активности фермента. Такая концентрационная

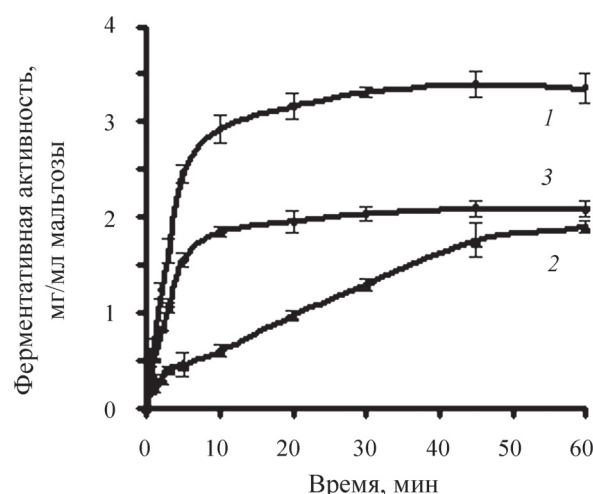


Рис. 2. Накопление продуктов гидролиза картофельного крахмала в присутствии: 1 – МР (4,8 мМ), 2 – ГР (0,64 мМ), 3 – контроль (без АР)

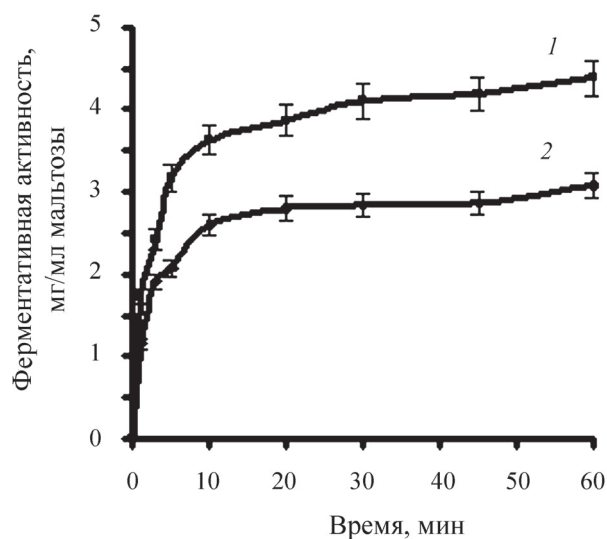


Рис. 3. Накопление продуктов гидролиза крахмала солода: 1 – в присутствии МР (4,8 мМ); 2 – без МР (контроль)

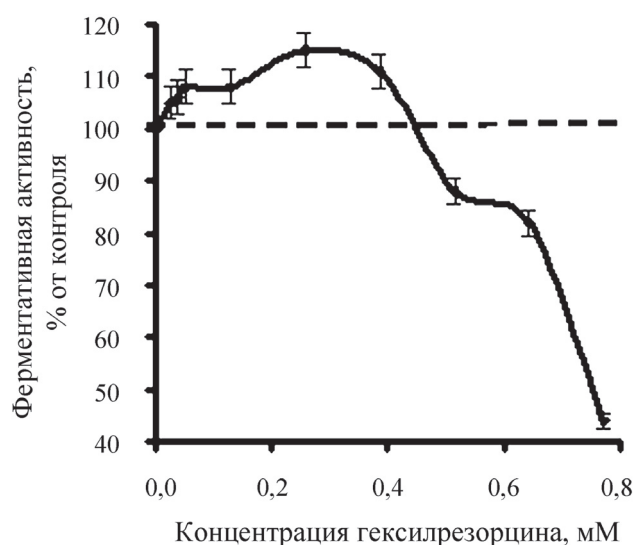


Рис. 4. Зависимость активности  $\beta$ -амилазы в реакции гидролиза крахмала от концентрации ГР. Условия: температура 25°C; pH 4,8; 1,0 М ацетатный буфер, концентрация фермента 0,067 мг/мл, субстрата 2,67 мг/мл. Пунктир — максимальная активность в контрольном варианте (100%)

двойственность действия ГР имеет большие практические перспективы для процессов интенсивного брожения с последующим его ингибированием.

Для исследований динамики ингибирующего действия ГР как возможного консерванта мы выбрали концентрацию 0,64 мМ, при которой активность  $\beta$ -амилазы ингибировалась на 20–30%. Для практических целей может быть рекомендована концентрация ГР, равная 0,75 мМ, что соответствует ингибированию фермента на 50%.

Полученные данные по действию ГР на динамику гидролиза крахмала (рис. 2) свидетельствуют о том, что начальная скорость гидролиза в присутствии ГР ниже, чем в контроле. Было отмечено, что, если время активного гидролиза для контроля составляет около 5 мин, после чего происходит заметное снижение скорости процесса, то для опыта (в присутствии ГР) эта величина составляет 45 мин, а через 60 мин ведения процесса обе кривые сближаются настолько, что разница между их величинами находится в области погрешности измерений. Отмечено, что кривые накопления продуктов гидролиза в контроле и опыте приобретают параллельный характер приблизительно через 45 мин от начала процесса гидролиза. Заметное падение скорости гидролиза в контрольном и опытном вариантах происходит при концентрации мальтозы в среде 1,50–1,75 мг/мл. По-видимому, в обоих случаях это связано с ингибированием функционирования фермента конечным продуктом реакции.

Таким образом, было показано, что изменение свойств фермента в смесях с алкилрезорцинами принципиально зависит от концентрации и структуры модификатора. Так, на примере двух различных по гидрофобности АР в широком диапазоне их концентраций было показано ингибирующее ферментативную активность действие одного (ГР), и стимулирующее действие другого (МР). Следует отметить, что в низких концентрациях ГР также оказывает стимулирующий эффект. Полученные результаты не противоречат литературным данным [19, 20], в которых длинноцепочечные АР демонстрируют только ингибирующий эффект.

Для дальнейших исследований использовали три системы: раствор  $\beta$ -амилазы с содержанием МР 4,8 мМ в пересчете на конечную концентрацию в реакционной смеси с субстратом, раствор фермента с содержанием ГР 0,64 мМ и контроль (без АР). Влияние температуры на изменение активности модифицированной АР  $\beta$ -амилазы было оценено в двух сериях экспериментов. В первой серии варьировали температуру реакции гидролиза от 25 до 65°C (рис. 5, А). Активность у образцов оценивали, принимая за 100% активность контроля при оптимальном для гидролиза значении температуры (50°C). Использование МР позволило вести реакцию с такой же или большей эффективностью, чем при оптимуме в контроле в диапазоне температур 35–60°C. Однако отмечено, что фермент, модифицированный МР, более резко теряет активность при отступлении от оптимальных условий катализа, чем контроль. В случае с ГР модифицированный белок менее подвержен влиянию температуры, чем контрольный вариант, а в области высоких температур (65°C), значения их активности практически неразличимы. Таким образом, у  $\beta$ -амилазы, обработанной ГР, проявляется более высокая устойчивость к действию температуры.

Во второй серии фермент, модифицированный АР, выдерживали в течение разных промежутков времени (0–60 мин) при 45°C до проведения реакции гидролиза (рис. 5, Б). За 100% принимали также активность интактного фермента (контроль). Установленная тенденция влияния АР на термостабильность фермента сохранилась, и при данной постановке эксперимента (в присутствии МР) падение активности было более резким во времени. Однако МР позволяет ферменту сохранить активность практически на уровне начального значения в контроле после 30 мин термообработки. Присутствие ГР позволяет несколько повысить устойчивость фермента к длительности температурного воздействия.

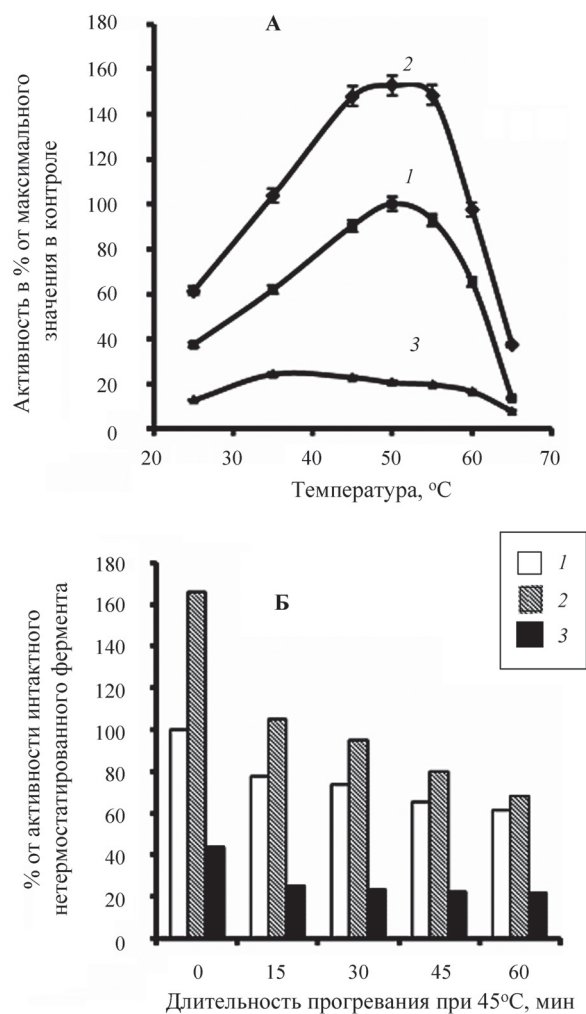


Рис. 5. Изменение активности  $\beta$ -амилазы, модифицированной АР: А – при разных значениях температуры гидролиза; Б – после предварительного прогрева растворов фермента при 45°C в течение заданного времени (1 – контроль (без АР); 2 – МР (4,8 мМ); 3 – ГР (0,64 мМ))

Взаимодействие  $\beta$ -амилазы с МР позволило расширить рН-диапазон эффективного катализа от 4,3 до 7,7 единиц рН при сохранении рН-оптимума 6,0 (рис. 6, А). ГР для данной серии использовали в виде спиртового раствора, чтобы снять ограничения по растворимости, накладываемые щелочной калийной формой модификатора. В случае с использованием ГР прослеживается тенденция, аналогичная с термозависимостью активности фермента (рис. 6, Б). Наиболее существенные различия модифицированного и контрольного ферментов наблюдаются в диапазоне рН, близком к оптимальному значению. При крайних значениях рН (4,0 и 8,0) значения активности практически совпадают.

Таким образом, установлено, что в широком диапазоне температур и рН, а также после предварительного прогревания характер изменения активности фермента в комплексе с АР не претерпевает значительных изменений. Это обстоятельство, в свою очередь, не только не вносит дополнительных ограничений на использование АР, но и позволяет вести гидролиз с высокой эффективностью в более широких диапазонах температур и рН при использовании МР.

Можно предположить, что различия в изменении каталитической активности (стимуляция–ингибирование) стабилизированных АР ферментных белков, селективно зависящие от гидрофобности и поляр-

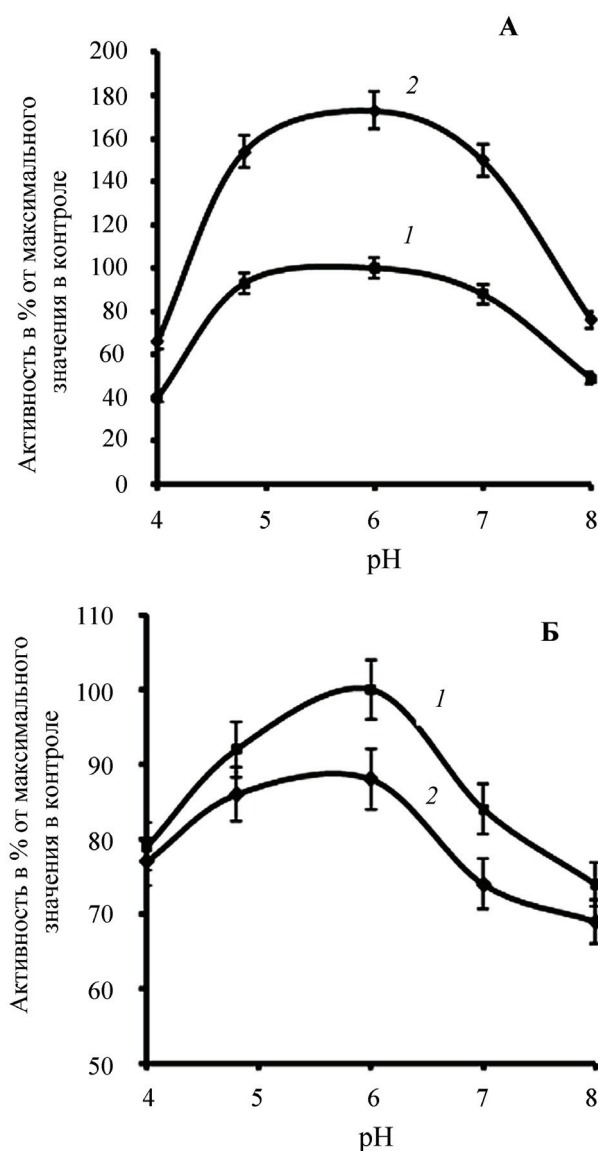


Рис. 6. Изменение активности  $\beta$ -амилазы, модифицированной АР, при разных значениях рН гидролиза. А: 1 – контроль (без МР), 2 – МР (4,8 мМ); Б: 1 – контроль (без ГР), 2 – ГР (0,64 мМ) спиртовой раствор

ности используемого модификатора, проявятся в характере изменения кинетических параметров гидролиза.

В работе определены кинетические параметры гидролиза крахмала β-амилазой, модифицированной АР. В экспериментах использовали разные концентрации крахмала (1,33–33,3 мг/мл) при стандартной концентрации фермента 0,067 мг/мл. Полученные результаты проанализированы графически в координатах Лайнуивера–Берка для расчета значений  $V_{\text{макс}}$  (начальная скорость ферментативного гидролиза при насыщающих концентрациях субстрата) и  $K_M$  (константа Михаэлиса) [21]. Эксперименты показали, что основные кинетические параметры  $K_M$  и  $V_{\text{макс}}$ , позволяющие интерпретировать взаимодействия фермента с модификатором, изменялись различным образом при использовании МР (4,8 мМ) или ГР (0,64 мМ) в качестве лигандов (рис. 7, таблица).

При взаимодействии белка с МР константа  $K_M$  практически не изменялась (в пределах ошибки) и была равна  $K_M$  контрольного варианта, в отличие от  $V_{\text{макс}}$ , которая в присутствии МР увеличивалась в два раза, что характеризует процесс как неконкурентную активацию. При использовании ГР (в ингибирующей концентрации) наблюдается сохранение значения  $K_M$  и двукратное уменьшение  $V_{\text{макс}}$  по сравнению с контролем, что позволяет отнести взаимодействия β-амилазы с ГР к неконкурентному типу ингибирования (таблица).

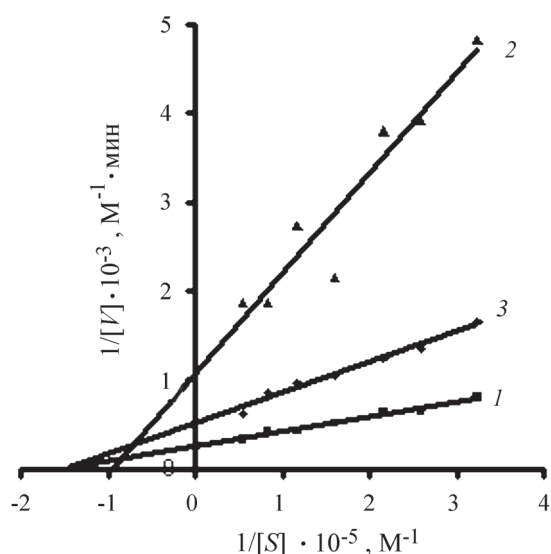


Рис. 7. Определение кинетических параметров гидролиза крахмала β-амилазой в присутствии: 1 – МР (4,8 мМ), 2 – ГР (0,64 мМ), 3 – без АР (контроль)

### Влияние алкилрезорцинов на изменение кинетических параметров β-амилазы

Модификатор	Кинетические параметры	
	$K_M$ , (мкМ)	$V_{\text{макс}}$ (ммоль / (мг·мин))
Контроль	$6,7 \pm 0,3$	$0,0305 \pm 0,0003$
Метилрезорцин	$6,8 \pm 0,2$	$0,0601 \pm 0,0008$
Гексилрезорцин	$7,1 \pm 0,4$	$0,0141 \pm 0,0001$

Аналогичный эффект получен и для других гидролаз, например трипсина, модификация которого МР также приводит к неконкурентной активации, а модификация ГР – к неконкурентному ингибированию [14]. Аналогичное действие МР оказывает на кинетику ферментативного гидролиза коллоидного хитина лизоцимом, что позволяет интерпретировать процесс так же, как неконкурентную активацию. ГР проявляет себя как ингибитор смешанного типа в отношении лизоцима в процессе гидролиза пептидогликана и хитина [15].

Таким образом, совокупность представленных данных демонстрирует, что АР оказывают модифицирующее действие в отношении активности различных гидролаз неспецифически к их структуре. Неконкурентный тип действия АР свидетельствует о том, что при их взаимодействии с ферментами не меняется конфигурация активного центра биокатализатора и сохраняется сродство фермента к субстрату. Это подтверждают данные по сохранению рН-оптимумов катализа β-амилазы, модифицированной разными гомологами, из чего следует, что при взаимодействии фермента с АР не происходит изменений, которые бы затрагивали ионогенные группы активных центров и косвенно свидетельствует о стабильности их организации [22].

Активирующее действие АР может быть связано с повышением внутримолекулярной динамики комплекса, что приводит к увеличению скорости образования продукта [23]. Последнее предположение нашло подтверждение в работах [16, 24].

Таким образом, при взаимодействии ферментных белков с различными по структуре и степени гидрофобности АР наблюдается (в зависимости от их концентрации) изменение каталитической активности, имеющее противоположные векторы – в сторону активации или ингибирования. Выявленные возможности регуляции активности ферментных белков при использовании доступных и дешевых АР открывают новые перспективы оптимизации биотехнологических процессов, в частности в бродильных производствах.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozubek A., Tyman J.H.P. // Chem. Rev. 1999. **99**. P. 125.
2. Pietinen P., Rimm E.B., Korhonen P., Hartman A.M., Willett W.C., Albanes D., Virtamo J. // Circulation. 1996. **94**. P. 2720.
3. Adlercreutz H., Mazur W. // Ann. Med. 1997. **29**. P. 95.
4. Gey K.F. // Biochem. Soc. Trans. 1990. **18**. P. 1041.
5. Ames B.N. // Science. 1983. **221**. P. 1256.
6. Himejima M., Kubo I. // J. Agric. Food Chem. 1991. **39**. P. 418.
7. Ross A.B., Kamal-Eldin A., Aman P. // Nutr. Rev. 2004. **62**. P. 81.
8. Hladyszowski J., Zubik L., Kozubek A. // Free Radical Research. 1998. **28**. P. 359.
9. Николаев Ю.А. Автореф. ... докт. биол. наук. М., 2011. 49 с.
10. Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Капрельянц А.С., Эль-Регистан Г.И. // Микробиол. 1996. **65**. С. 20.
11. Осипов Г.А., Эль-Регистан Г.И., Светличный В.А., Козлова А.Н., Дуда В.И., Капрельянц А.С., Помазанов В.В. // Микробиол. 1985. **54**. С. 184.
12. Мартиросова Е.И., Карпекина Т.А., Эль-Регистан Г.И. // Микробиол. 2004. **73**. С. 708.
13. Мартиросова Е.И., Николаев Ю.А., Шаненко Е.Ф., Крупянский Ю.Ф., Лойко Н.Г., Эль-Регистан Г.И. // Хим. технол. 2007. **6**. С. 250.
14. Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Степаненко И.Ю., Шаненко Е.Ф., Мартиросова Е.И., Плакунов В.К., Козлова А.Н., Борзенков И.А., Коротина О.А., Родин Д.С., Крупянский Ю.Ф., Эль-Регистан Г.И. // Прикл. биохим. микробиол. 2008. **44**. С. 159.
15. Петровский А.С., Дерябин Д.Г., Лойко Н.Г., Михайленко Н.А., Кобзева Т.Г., Канаев П.А., Николаев Ю.А., Крупянский Ю.Ф., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. // Микробиол. 2009. **78**. С. 146.
16. Крупянский Ю.Ф., Нокс П.П., Лойко Н.Г., Абдулнасыров Э.Г., Коротина О.А., Степанов С.А., Захарова Н.И., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И., Рубин А.Б. // Биофиз. 2011. **56**. С. 13.
17. Miller G.L. // Anal. Chem. 1959. **31**. P. 426.
18. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. М., 2000.
19. Deszcz L., Kozubek A. // Cell Mol. Biol. Lett. 1997. **2**. P. 213.
20. Roufogalis B., Li Q., Tran V.H., Kable E.P.W., Duke C.C. // Drug DeV. Res. 1999. **46**. P. 235.
21. Плакунов В.К. Основы энзимологии. М., 2001. 128 с.
22. Березин И.В. Действие ферментов в обращенных мицеллах. 39-е Баховское чтение. М., 1985. 40 с.
23. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М., 1977. 280 с.
24. Крупянский Ю.Ф., Абдулнасыров Э.Г., Лойко Н.Г., Степанов С.А., Терешкина К.Б., Эль-Регистан Г.И. // Хим. физ. 2012. **31**. С. 60.

Поступила в редакцию 12.01.13

REGULATION OF  $\beta$ -AMYLASE'S ACTIVITY BY ALKYLRESORCINOLS

E.I. Martirosova<sup>1</sup>, A.V. Polyakov<sup>1</sup>, I.G. Plashchina<sup>1</sup>, G.I. El-Registan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Science, <sup>2</sup>Winogradsky Institute of Microbiology Russian Academy of Science; e-mail: ms\_martins@mail.ru)

Herein the effects of two alkylresorcinols (methylresorcinol (MR) and hexylresorcinol (HR) - chemical analogous of natural anabiosis factors of some bacteria) on the catalytic activity of  $\beta$ -amylase are shown. MR stimulated the activity of  $\beta$ -amylase up to 170% within the range of concentrations 0.8-12.9 mM when the water-soluble potato starch as substratum was used. HR displayed weak stimulated effect up to 115% within the range of concentrations 0.05-0.35 mM, and then inhibition is observed up to 50% (0.75 mM). Interaction MR with  $\beta$ -amylase allows to increase general yield of potato and malt starch hydrolysis products in 1.5-1.6 times at enhancing of hydrolysis rate in 4-5 times. The increasing of modified enzyme activity was demonstrated in extended temperature and pH ranges. The kinetic parameters of starch hydrolysis by  $\beta$ -amylase modified with alkylresorcinols were determined. MR demonstrated the non-competitive type of activation, HR - the non-competitive type of inhibition.

**Key words:** alkylresorcinols,  $\beta$ -amylase, starch, malt, stimulation and inhibition of the catalytic activity.

**Сведения об авторах:** Мартиросова Елена Игоревна – ст. науч. сотр. лаборатории физико-химической модификации биополимеров ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН, канд. биол. наук (ms\_martins@mail.ru); Поляков Александр Викторович – аспирант лаборатории физико-химической модификации биополимеров ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН, (polyakov-a-v@mail.ru); Плащина Ирина Германовна – зав. лаб. физико-химической модификации биополимеров ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН, канд. хим. наук (igplashchina@sky.chph.ras.ru); Эль-Регистан Галина Ивановна – глав. науч. сотр. лаборатории классификации и хранения уникальных микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, профессор, докт. биол. наук (loikonat@mail.ru).