

# Biosyntéza a vlastnosti $\alpha$ -amyláz morfológických variantov *Bacillus subtilis* R-623

A. A. GLEMŽA, A. B. BALSIS, I. V. BACHMATOVA, L. A. BARATOVA, A. P. SINICYN, Vedecko-výrobné združenie „Ferment“, Vilnius, ZSSR

**Kľúčové slová:**  $\alpha$ -amyláza, *Bacillus subtilis* R-623, biosyntéza

Priemyselne kmene *Bacillus subtilis* — producenti  $\alpha$ -amylázy — sa počas skladovania a kultivácie štiepia na morfológické varianty, ktoré sa líšia medzi sebou v rade znakov, včítane schopnosti syntetizovať mimobunečné hydrolytické enzýmy [1, 2].

Dokázali sme, že morfológický variant *Bacillus subtilis* R-623 syntetizuje rôzne proteázy [3], a takisto do určitej miery sa líšiaci  $\alpha$ -amylázy [4]. Podrobnejšie štúdium molekulárnych, imunologických a katalytických vlastností  $\alpha$ -amyláz morfológického variantu *B. subtilis* R-623 je nepochybne zaujímavé. Za tým účelom bolo potrebné vypracovať účinnú metódu separácie a rafinácie  $\alpha$ -amylázy. Najúčinnnejšími sú metódy špecifickej sorpcie na prírodných polymérnych substrátoch [5—8]. Vzájomné pôsobenie amyláz s nerozpustným substrátom v mnohých prípadoch [9, 10] vytvára dobré možnosti ich rafinácie. Ako príklad možno uviesť, že trojnásobná sorpcia a desorpcia na obilnom škrobe umožnila rafinovať termofilnú  $\alpha$ -amylázu 1500krát [11]. Analogický postup bol použitý v tejto práci, následkom čoho boli získané homogénne preparáty  $\alpha$ -amylázy z morfológického variantu R, P a S *B. subtilis* R 623. Metodika bola popísaná v posledných publikáciách [12, 13].

Ako potenciálne sorbenty sme skúmali glykogén, rozpustný škrob, kukuričný škrob a kukuričný škrob s plnidlom. Najvýhodnejšími sorbentami sa ukázali byť rozpustný škrob a glykogén. Keďže stupeň rafinácie na

obidvoch sorbentoch sa ukázal byť takmer rovnakým, v ďalšom sme na rafináciu  $\alpha$ -amylázy používali rozpustný škrob [12].

Overenie proteolytickej aktivity ukázalo, že v eluáte  $\alpha$ -amylázy je asi 2 % pôvodného množstva proteáz, ktoré bolo potrebné odstrániť. Študovala sa možnosť odstránenie proteáz tepelným spracovaním čiastočne rafinovaného roztoku  $\alpha$ -amyláz. Pri inkubácii roztoku  $\alpha$ -amylázy 30 minút pri teplote 60 °C sa celkom zachovala amylolytická aktivita, zatiaľ čo proteáza sa z 90 % inaktivovala. Ako vidno z údajov tabuľky 1, množstvo proteáz, sprevádzajúcich  $\alpha$ -amylázu, sa znížilo takmer o jeden rád. Špecifická aktivita  $\alpha$ -amylázy po tepelnom ošetrovaní takisto trochu vzrástla. Preto sme do schémy rafinácie  $\alpha$ -amyláz zaradili inkubáciu pri zvýšenej teplote.

Na definitívnu rafináciu  $\alpha$ -amyláz sa použila preparačná izoelektrofokusácia v gradiente sacharózy. Na základe toho sme obdržali homogénne preparáty  $\alpha$ -amyláz. Overenie proteolytickej aktivity v preparátoch  $\alpha$ -amyláz ukázalo, že izoelektrofokusáciou sa dokonale podarilo zbaviť sa sprievodných proteáz. Výsledky rafinácie  $\alpha$ -amyláz z kultivačnej kvapaliny morfológických variantov R, P a S *Bacillus subtilis* R-623 sú zahrnuté v tabuľke 2.

Molekulárna hmotnosť  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov R, P, a S *Bacillus subtilis* R-623 sa stanovovala



Tabuľka 1. Vplyv podmienok štepenia komplexu  $\alpha$ -amylázy a škrobu na stupeň rafinácie  $\alpha$ -amylázy a odstránenie proteáz

Podmienky štepenia komplexu $\alpha$ -amylázy a škrobu*	Zvyšná proteázová aktivita [%]	Výťažok amylolytickej aktivity [%]	Stupeň rafinácie $\alpha$ -amylázy
Inkubácia pri 40 °C počas 3 hodín	1,84	60	14
Inkubácia pri 40 °C počas 3 hodín a pri 60 °C počas 30 minút	0,23	54	18

\* Zloženie inkubačnej zmesi: 100 cm<sup>3</sup> filtrátu kultivačnej kvapaliny morfológického variantu P (bielkoviny 8 mg · cm<sup>-3</sup>, amylolytická aktivita 500 jed. · cm<sup>-3</sup>, proteolytická aktivita 540 jed. · cm<sup>-3</sup>) + 2,5 cm<sup>3</sup> 1,6 % rozpustného škrobu + 100 mg acetátu vápenatého + 43 cm<sup>3</sup> etylalkoholu.

Tabuľka 2. Rafinácia  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov *B. subtilis* R-623

Štádium rafinácie	Morf. variant	Bielkoviny, [mg]	Aktivita		Stupeň rafinácie	Výťažok [%]
			celková [j · l]	špeciálna [j · l]		
Kultivačná kvapalina	R	831,0	77 000	92,6	1,0	100
	P	678,0	77 000	113,6	1,0	100
	S	1702,0	77 000	45,2	1,0	100
Sorbacia-desorbcia na rozpustnom škrobe	R	25,3	41 600	1644,3	17,8	54
	P	24,6	37 700	1532,5	13,5	49
	S	31,6	40 000	1265,8	28,0	52
Gélová filtrácia na biogéle R-2	R	8,9	25 400	2853,9	30,8	33
	P	11,2	27 700	2473,2	21,8	36
	S	12,7	24 600	1937,0	42,8	32
Elektrofokúsacia a gélová filtrácia na Sephadex G-50	R	2,7	20 000	7404,4	80,0	26
	P	3,4	20 800	6117,6	53,8	27
	S	3,1	16 900	5451,6	120,6	22

metódou diskovej elektroforézy a získali sa hodnoty 57 000, 58 000 a 56 000. Ako vyplýva zo získaných výsledkov, čo do molekulárnej hmotnosti sa tri  $\alpha$ -amylázy z morfológických variantov medzi sebou nelíšia. Z porovnania nami stanovených molekulárnych hmotností  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov s literárnymi údajmi vyplýva, že naše  $\alpha$ -amylázy sú podobné tým, ktoré izoloval Saito et. al., molekulárne hmotnosti, ktoré izolovali z *B. subtilis*, *B. subtilis* Na64 a *B. subtilis* 6160 sa rovnajú 55 000 [14–16]. Moseley a Kisluchina [18] uvádzajú hodnoty molekulárnych hmotností o niečo menšie (asi 50 000).

V ďalšom boli pre všetky tri  $\alpha$ -amylázy z morfológických variantov *B. subtilis* R-623 stanovené aminokyselinové spektrá. Ako je zrejmé z údajov uvedených v tabuľke 3,  $\alpha$ -amylázy morfológických variantov *B. subtilis* R-623 majú prakticky rovnaké aminokyselinové zloženie. S ohľadom na tú okolnosť, že zhodnosť aminokyselinového zloženia je nepriamym dôkazom identity štruktúr, predsa treba konštatovať, že tento výsledok neprotirečí predpokladu možnej identity alebo štruktúrnej zhode  $\alpha$ -amyláz z morfológických variantov *B. subtilis*. Pritom porovnanie nami získaných aminokyselinových spektrier  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov s literárnymi údajmi ukazuje, že v plnej miere zodpovedajú údajom, uvádzaným pre  $\alpha$ -amylázy z iných kmeňov *B. subtilis*. Pre všetky  $\alpha$ -amylázy je charakteristické veľké množstvo kyseliny asparágovej a glutámovej, absencia cysteínu, nepatrné množstvo (4–8 zvyškov) metionínu [16, 18, 19]. Pritom porovnanie údajov, získaných radom autorov, umožňuje konštatovať široké kolísanie aminokyselinového zloženia  $\alpha$ -amyláz z kmeňov *B. subtilis* R-623 rôzneho pôvodu [16, 19]. To umožňuje

predpokladať, že praktickú identity aminokyselinového zloženia  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov *B. subtilis* R-623 možno považovať za určitý dôkaz v prospech toho, že biosyntéza  $\alpha$ -amylázy je vo všetkých morfológických variantoch ovládaná jedným a tým istým génom.

Štúdium imunologických vlastností jednotlivých  $\alpha$ -amyláz *B. subtilis* R-623 (R, P, S) ukázalo, že pri tvorbe precipitačných oblúkov sa objavujú ostruhy, čo znamená, že sú imunologicky čiastočne príbuzné. To hovorí v prospech toho, že  $\alpha$ -amylázy morfológických variantov sú produktami jedného génu, lebo sú totožné vo väčšine antigénových determinantov. Avšak štúdium  $\alpha$ -amylázy morfológických variantov ukazuje, že sú imunologicky príbuzné nie celkom, ale čiastočne, čo môže byť podmienené vznikom určitých poškodení štruktúry bielkovín počas biosyntézy, sekrecie, alebo účinkom modifikačných faktorov kultivačnej kvapaliny.

Štúdium katalytických vlastností  $\alpha$ -amyláz sa začalo stanovením Michaelisovej konštanty ( $K_M$ ), maximálnej rýchlosti ( $V_M$ ) a pomeru  $V_M/K_M$ , ktoré hodnoty sa uvádzajú v tabuľke 4. Ako substráty boli použité rozpustné a nerozpustné amylázy a škrob. Najnižšie hodnoty  $K_M$  boli získané pre vo vode nerozpustnú amylózu a škrob (0,6–0,8 mg · cm<sup>-3</sup>), pričom čo do hodnôt  $K_M$  sa  $\alpha$ -amylázy morfológických variantov pre obidva tieto nerozpustné substráty medzi sebou prakticky nelíšili. Pokiaľ ide o  $V_M$  hydrolýzy nerozpustných substrátov, boli  $\alpha$ -amylázy všetkých troch morfológických variantov blízke:  $V_M$  hydrolýzy nerozpustnej amylózy bola v rozmedzí 35 · 10<sup>3</sup> až 37 · 10<sup>3</sup>  $\mu$ mol vzniknutých redukujúcich látok na 1 mg bielkoviny za 1 minútu,  $V_M$  hydrolýzy nerozpustného škrobu bola o niečo vyššia a predstavovala 66 · 10<sup>3</sup> až 79 · 10<sup>3</sup>  $\mu$ mol vzniknutých redukujúcich látok na 1 mg bielkoviny za 1 minútu. Hodnoty  $V_M/K_M$  boli takisto blízke a predstavovali pre nerozpustnú amylózu 44 · 10<sup>3</sup> až 53 · 10<sup>3</sup> a pre nerozpustný škrob 110 · 10<sup>3</sup> až 132 · 10<sup>3</sup>  $\mu$ mol vzniknutých redukujúcich látok v 1 cm<sup>3</sup> na 1 mg substrátu na 1 mg bielkoviny za 1 minútu. Rýchlosť a účinnosť katalýzy nerozpustných substrátov  $\alpha$ -amylázami troch morfológických variantov sa nelíšila od seba viac ako 1,2krát. Čo do účinnosti katalýzy  $\alpha$ -amylázy možno zoradiť nasledovne  $R < P < S$ , pričom aktivita  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov voči nerozpustnému škrobu bola 2krát (ak súdime podľa  $V_M$ ), poľahke 2,5krát (ak súdime podľa  $V_M/K_M$ ) väčšia, ako voči nerozpustnej amylóze.

Pri hydrolýze rozpustnej amylózy hodnota  $K_M$  klesala v rade morfológických variantov  $R > P > S$  (od 2,0 po 0,9 mg · cm<sup>-3</sup>), naproti tomu, pre hydrolýzu rozpustného škrobu trocha rástla (od 2,0 do 5,0 mg · cm<sup>-3</sup>).  $V_M$  hydrolýzy amylózy pre tri  $\alpha$ -amylázy ubúdala v rade  $R > P > S$  z 208 · 10<sup>3</sup> po 142 · 10<sup>3</sup>, zatiaľ čo pri hydrolýze

Tabuľka 3. Aminokyselinové zloženie  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov *Bacillus subtilis* R-623 v porovnaní s  $\alpha$ -amylázami z iných kmeňov *B. subtilis*

Amino-kyseliny	<i>B. subtilis</i> R-623 [13]			<i>B. subtilis</i> [19]	<i>B. subtilis</i> 6160 [26]	<i>B. subtilis</i> var. amylosaccharificus [16]	<i>B. subtilis</i> Na [16]
	R	P	S				
ASP	60	62	58	53	76	60	80
THR	26	29	29	23	43	22	39
SER	27	30	30	24	40	34	39
GLU	54	55	54	43	43	36	46
PRO	30	30	28	14	12	7	10
GLY	45	45	46	39	44	32	46
ALA	33	37	38	29	42	33	44
CYS	0	0	0	0	0	0	0
VAL	27	28	27	25	26	17	18
MET	4	4	5	5	7	7	8
ILE	17	18	18	17	27	22	28
LEU	28	26	28	23	24	26	30
TYR	25	28	28	24	20	14	12
PHE	16	18	17	18	18	15	19
LYS	29	30	27	25	27	18	30
HIS	13	13	11	12	14	11	15
ARG	19	19	19	17	18	18	21



Tabuľka 4. Kinetické parametre pôsobenia  $\alpha$ -amylázy morfológických variantov *Bacillus subtilis* R-623 na rôzne substráty (pH 6,0; 40 °C)

Substráty	R			P			S		
	$K_M$	$V^{**}$	$V/K_M^{***}$	$K_M$	$V$	$V/K_M$	$K_M$	$V$	$V/K_M$
Amylóza rozpustená $M_w = 81\,000$	2,0	$208 \cdot 10^3$	$104 \cdot 10^3$	1,7	$165 \cdot 10^3$	$97 \cdot 10^3$	0,9	$142 \cdot 10^3$	$158 \cdot 10^3$
Amylóza nerozpustená $M_w = 81\,000$	0,8	$35 \cdot 10^3$	$44 \cdot 10^3$	0,8	$38 \cdot 10^3$	$45 \cdot 10^3$	0,7	$37 \cdot 10^3$	$53 \cdot 10^3$
Škrob rozpustný $M_w = 10^3$	2,0	$109 \cdot 10^3$	$54 \cdot 10^3$	3,5	$129 \cdot 10^3$	$37 \cdot 10^3$	5,0	$163 \cdot 10^3$	$33 \cdot 10^3$
Škrob nerozpustný $M_w = 10^6$	0,6	$66 \cdot 10^3$	$110 \cdot 10^3$	0,6	$73 \cdot 10^3$	$122 \cdot 10^3$	0,6	$79 \cdot 10^3$	$132 \cdot 10^3$

\*  $K_M$ , mg (substrátu)  $\cdot$  cm $^{-3}$ ,

\*\*  $V$ ,  $\mu$ mol (vzniknutých redukujúcich cukrov) mg $^{-1}$  (bielkoviny) min $^{-1}$ ,

\*\*\*  $V/K_M$ ,  $\mu$ mol (vzniknutých redukujúcich cukrov) cm $^3$   $\cdot$  mg $^{-1}$  (substrátu) mg $^{-1}$  (bielkoviny) min $^{-1}$

škrobu naopak rástla v rade  $R < P < S$  zo  $109 \cdot 10^3$  na  $163 \cdot 10^3$   $\mu$ mol vzniknutých redukujúcich látok na 1 mg bielkoviny za 1 minútu. Takéto zmeny kinetických parametrov viedli k tomu, že účinnosť katalýzy  $\alpha$ -amylázami morfológických variantov ( $V/K_M$ ) pre rozpustnú amylozu rástla v rade morfológických variantov  $R < P < S$  z  $97 \cdot 10^3$  po  $158 \cdot 10^3$ , a pre rozpustný škrob ubúdala v rade morfológických variantov  $R > P > S$  z  $54 \cdot 10^3$  po  $33 \cdot 10^3$   $\mu$ mol vznikajúcich redukujúcich látok v 1 cm $^3$  na 1 mg bielkoviny za 1 minútu. Keď analyzujeme rozdiely hodnôt kinetických parametrov hydrolýzy rozpustných substrátov  $\alpha$ -amylázami, môžeme konštatovať, že účinnosť hydrolýzy amylozy je v prípade všetkých troch morfológických variantov vyššia, než účinnosť hydrolýzy škrobu, zatiaľ čo pre nerozpustné substráty platil opačný obraz. Zrejme komplementárnosť aktívneho centra  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov voči molekulárnej, alebo nadmolekulárnej štruktúre nerozpustného škrobu je vyššia, než voči štruktúram nerozpustnej amylozy. Rozpúšťanie substrátov nepochybne vedie k takým zmenám ich konformácie, že aktívne centrum  $\alpha$ -amyláz sa stáva viac komplementárnym voči amyloze.

Okrem kinetiky účinku  $\alpha$ -amyláz pri neveľkej hĺbke hydrolýzy (čo do počiatočných rýchlostí) sa študovala hydrolýza substrátu do väčšej hĺbky, kedy reakcia trvala nie 5–30 min, ale 20 hodín a viac [13]. Pri dosiahnutí medznej hĺbky hydrolýzy sa zistil rozdiel medzi preparátmi  $\alpha$ -amylázy, získanými z rôznych morfológických variantov.  $\alpha$ -amyláza hydrolyzovala amylozu do 24 %,  $\alpha$ -amyláza P do 20 % a  $\alpha$ -amyláza R do 15 %.

Pri použití rozpustnej a nerozpustnej amylozy ako substrátu, sme vykonali porovnávaciu analýzu  $\alpha$ -amyláz troch morfológických variantov z hľadiska zloženia vznikajúcich nízkomolekulárnych produktov hydrolýzy [13]. Keďže k depolymerizácii polysacharidov  $\alpha$ -amylázou dochádza náhodne [20, 21], okrem oligosacharidov sme stanovovali i zmenu molekulárnej hmotnosti  $M_w$  amylozy v priebehu hydrolýzy. Zo získaných údajov [13] vyplýva, že účinkom  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov R, P a S z rozpustného a nerozpustného substrátu vznikali di-, tri-, tetra- i hexamaltoligosacharidy ( $G_2, G_3, G_4, G_5$  a  $G_6$ ). Penta- a vyššie vysokomolekulárne oligosacharidy sa v našom pokuse nestanovovali. Glukóza bola zistená iba po dlhodobom účinku enzýmu, pri 15 až 23 % hydrolýze substrátu, i tak v nepatrných množstvách — 0,08 g  $\cdot$  dm $^{-3}$ , 0,09 g  $\cdot$  dm $^{-3}$  a 0,06 g  $\cdot$  dm $^{-3}$  pre  $\alpha$ -amylázy morfológických variantov R, P poľahke S. Produkty hydrolýzy rozpustného substrátu boli na začiatku reakcie obohatené frakciami  $G_2$  a  $G_6$ , obsahovali pomerne menej frakcií  $G_5$  a  $G_3$  a iba stopy  $G_4$ . Pri dlhotrvajúcej hydrolýze možno zoradiť maltoligosacharidy, čo do relatívneho obsahu v hydrolyzátach rozpustnej amylozy, do klesajúceho radu  $G_5, G_6, G_2, G_3, G_4$ .

Toto poradie je rovnaké pre  $\alpha$ -amylázy všetkých troch morfológických variantov. V hydrolyzátach nerozpustnej amylozy bol väčší obsah frakcií  $G_3$  a  $G_6$ , ako  $G_5, G_4$  a  $G_2$ , pričom toto poradie platilo pre všetky tri  $\alpha$ -amylázy.

Súčasne so vznikom maltoligosacharidov dochádzalo ku zníženiu priemernej molekulárnej hmotnosti polysacharidových substrátov. Osobitne rýchlo sa znižovala molekulárna hmotnosť rozpustnej amylozy. Hĺbka hydrolýzy substrátov bola ešte neveľká (4 %), ale priemerná molekulárna hmotnosť sa znížila z 81 000 na 10 000 až 13 000 [13]. Hydrolýza nerozpustnej amylozy prebiehala trochu pomalšie. Hĺbke hydrolýzy 4,0 % zodpovedala priemerná molekulárna hmotnosť 20 000, zrejme teda hydrolýza nerozpustnej amylozy prebieha ináč, než v prípade rozpustnej. Na priebeh procesu hydrolýzy teda do určitej miery vplýval stav substrátu, čo sa odzrkadľovalo na rozmeroch vysokomolekulárnych produktov hydrolýzy. Okrem toho, keď sa substrát nachádza v nerozpustnom stave, jeho hydrolýza  $\alpha$ -amylázami morfológických variantov prebieha pomalšie: je to zrejme ako z množstva vznikajúcich redukujúcich látok, tak aj z kinetických parametrov, stanovených podľa počiatočných rýchlostí.

Štúdium produktov hydrolýzy amylozy teda ukázalo, že  $\alpha$ -amylázy morfológických variantov R, P a S v počiatočných štádiách hydrolýzy skvapalňujú substrát, čo vedie k značnému zníženiu  $M_w$ , zatiaľ čo nízkomolekulárne produkty hydrolýzy ( $G_2$ – $G_6$ ) v počiatočných štádiách hydrolýzy vznikajú v nepatrných množstvách. Štúdium  $\alpha$ -amylázy čo do špecifčnosti účinku na polymérny substrát ukázalo, že  $\alpha$ -amylázy R, P a S sú podobné na  $\alpha$ -amylázy niektorých kmeňov *B. subtilis* [22], *St. griseus* [23], *B. licheniformis* NCIB 6346 [24], *Asp. oryzae* [25] a *Calvatia gigantes* [26] a účinkujú na substrát viacvetvovým mechanizmom (inými slovami štatisticky „neusporiadaným“ mechanizmom) [20, 21, 27–29]. Pri hydrolýze nerozpustnej amylozy stupeň „usporiadania“ hydrolýzy substrátu  $\alpha$ -amylázami troch morfológických variantov je prakticky rovnaký. Avšak pri hydrolýze rozpustnej amylozy stupeň „usporiadania“ účinku  $\alpha$ -amyláz R a P je o niečo vyšší, než v prípade  $\alpha$ -amylázy S. Ak účinkom  $\alpha$ -amyláz R a P na amylozu sa od samého začiatku hydrolýzy začínajú hromadiť maltoligosacharidy  $G_2$ – $G_6$ , vznik maltoligosacharidov účinkom  $\alpha$ -amylázy S nastáva po lag-fáze, zatiaľ čo v počiatočnom okamžiku hydrolýzy všetky  $\alpha$ -amylázy rovnako znižujú  $M_w$  rozpustnej amylozy.

Získané výsledky ukazujú, že  $\alpha$ -amylázy, separované z kultivačnej kvapaliny troch morfológických variantov R, P a S *B. subtilis* R-623 majú prakticky rovnakú molekulárnu hmotnosť a rovnaké aminokyselinové zloženie, čo svedčí v prospech toho, že sú produktami jedného génu. Nami získané výsledky súhlasia s údajmi ostatných autorov [30, 31]. Imunochemická analýza tak



isto poukazuje na ich rovnakosť, avšak objavujú sa niektoré štruktúrne vady, ktoré zrejme aj podmieniajú veľké rozdiely v izoelektrických bodoch a optimách pH a v čiastočnej imunochemickej príbuznosti, čo sa najzreteľnejšie prejavuje na  $\alpha$ -amyláze morfológického variantu S [13].

Získané údaje umožňujú predpokladať, že morfológické varianty *B. subtilis* R-623 syntetizujú rovnaké mimobunecné  $\alpha$ -amylázy. Súčasne bunky morfológických variantov *B. subtilis* R-623 syntetizujú rôzne proteázy [1]. Na základe predložených výsledkov možno pripustiť, že rozdiely medzi morfológickými variantami R, P a S *B. subtilis* R-623 možno aj nesúvisia s biosyntézou  $\alpha$ -amyláz.

Účinnosť katalytického pôsobenia čo do počiatkových rýchlostí je najvyššia u  $\alpha$ -amylázy S, nasleduje  $\alpha$ -amyláza R a P (ako pri hydrolýze rozpustných, tak aj nerozpustných substrátov). Avšak pri realizácii hlbkej hydrolýzy substrátov (najmä rozpustných)  $\alpha$ -amyláza vedie ku vzniku pomerne menších množstiev nízkomolekulárnych maltooligosacharidov ( $G_2-G_6$ ), čo je zrejme spôsobené nižším stupňom „usporiadania“ hydrolýzy substrátu viacetvovými [20] mechanizmami, než v prípade  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov R a P. Boli takisto zistené rozdiely aktivity  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov v závislosti od teploty. Vcelku sa  $\alpha$ -amylázy morfológických variantov R, P a S čo do kinetických charakteristík principiálne nelíšia — rozdiely v katalytických parametroch spravidla neprevyšujú 50 až 100 %.

Údaje o štruktúre, fyzikálno-chemických, imunologických a katalytických vlastnostiach  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov R, P a S kmeňa *Bacillus subtilis* R-623 potvrdzujú predpoklad, že rozdiely medzi morfológickými variantami R, P a S *B. subtilis* R-623 nemôžu súvisieť s biosyntézou  $\alpha$ -amyláz [3]. Niektoré zistené rozdiely medzi študovanými  $\alpha$ -amylázami morfológických variantov možno vysvetliť tak, že počas vylučovania alebo účinkom modifikačných faktorov kultivačnej kvapaliny dochádza k určitým poškodeniam štruktúry bielkoviny, ktoré do určitej miery vplývajú na aktívne centrum  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov.

## Literatura

- [1] BACHMATOVA, I. V., ŽARIKOVA, G. G.: Mikrobiologia, 1978, **47**, s. 893
- [2] BACHMATOVA, I. V., ŽARIKOVA, G. G.: Mikrobiologia, 1979, **50**, s. 514–516
- [3] BACHMATOVA, I. V., GLEMŽA, A. A., ŽARIKOVA, G. G.: Prikl. biochimija i mikrobiol. 1981, **17**, s. 18–23
- [4] BACHMATOVA, I. V., BALSIS, A. B., ČJURLIS, T. K., JANULAJTENE, K. K., GLEMŽA, A. A.: Prikl. biochimija i mikrobiol. 1984, **20**, 6, s. 804–809
- [5] HOCKENHULL, D. J. D., HERBERT, D.: Biotech. J. 1945, **39**, s. 102–106
- [6] SCHWIMMER, S., BALLS, A. K. K.: Biol. Chem. 1949, **179**, s. 1083–1074
- [7] THAYER, P. S. J.: Bacteriol., 1953, **66**, s. 656–663
- [8] HASEGAWA, A., MIWA, N., OSHIMA, T., IMAHORI, K. J.: Biochem., 1976, **79**, s. 35–42
- [9] LOYTER, A., SCHRAMM, M.: Biochem. et biophys. acta, 1962, **63**, s. 200–206
- [10] LEVITZKI, A., HELLER, J., SCHRAMM, M.: Biochem. et biophys. acta, 1964, **81**, s. 101–107
- [11] HASEGAWA, A., MIWA, N., OSHIMA, T. J.: Biochem., 1976, **79**, s. 126–129
- [12] BALSIS, A. B., BARATOVA, L. A., BACHMATOVA, I. V., GLEMŽA, A. A., JANULAJTENE, K. K.: Biochimija, 1985, **50**, s. 928–935
- [13] BALSIS, A. B., BACHMATOVA, I. V., GLEMŽA, A. A., ČJURLIS, T. K., SINICYN, A. P., TALEBOROVSKAJA, I. K.: Biochimija, 1986, **51**, s. 378–386
- [14] SAITO, N.: Arch. Biochem. Biophys. 1973, **155**, s. 290–298
- [15] YAMANE, K., MARUO, B.: J. Bacteriol. 1974, **120**, s. 792–798
- [16] MATSUZAKI, H., YAMANE, K., MARUO, B.: Biochem. et biophys. acta, 1974, **365**, s. 248–258
- [17] MOSELEY, M. H., KLEY, L.: Biotechnol. and Bioeng. 1970, **12**, s. 251–271
- [18] KISLUCHINA, O. B.: Mikrobiol. promyšlenost, 1971, **3**, s. 3–8
- [19] JUNG, J. M., STEIN, E. A., NEURATH, H., FISCHER, E. H.: J. Biol. Chem. 1959, **234**, s. 556–561
- [20] BANKS, W.: Carbohydr. Res. 1977, **57**, s. 301–315
- [21] BANKS, W., MAZUNDER, N. K., SPOONER, R. L.: Int. J. Biochem. 1976, **7**, s. 107–110
- [22] KENNEDY, J. F., WHITE, C. A.: Starch, 1979, **31**, č. 3, s. 93–99
- [23] WAKO, K. J.: Jap. Soc. Starch Sci., 1981, **28**, č. 3, s. 215–218
- [24] MORGAN, F. J., PRIEST, F. G.: J. Appl. Bacteriol. 1981, **50**, s. 107–114
- [25] ZULFIQUAR, S., KHAN, M. R.: J. of Natural Sciences and Mathematics. 1982, **22**, č. 1, s. 39–48
- [26] KEKOS, D., MACRIS, B.: J. Appl. Environ. Microbiol. 1983, **45**, 3, s. 935–941
- [27] BIRD, R., HOPKINS, R. H.: Biochem. J., 1954, **55**, s. 89–99
- [28] ROBYT, J. E., FRENCH, D.: Archs. Biochem. Biophys. 1976, **122**, s. 8–18
- [29] FRENCH, D.: In: Friends Biol. Ferment, Fuels and Chem. Proc. Symp., New York, London, 1981, s. 151–180
- [30] STRONGIN, A. Ja., ABRAMOV, Z. T., LEVIN, E. D., STEPANOV, B. M.: Bioorgan. chimija, 1975, **1**, s. 1441–1448
- [31] STRONGIN, A. Ja., LUKIN, A. A., IZOTOV, L. S., ABRAMOV, Z. T., JERMAKOVA, L. M., STEPANOV, B. M.: Mikrobiologija, 1977, **46**, s. 539–546

**Glemža A. A., Baisis A. B., Bachmatova I. V., Baratova L. A., Sinicyn A. P.: Biosyntéza a vlastnosti  $\alpha$ -amyláz morfológických variantov *Bacillus subtilis* R-623. Kvas. prům. 32, 1986, č. 11, s. 269–273.**

V tejto práci sa predstavuje metóda získavania homogénnych  $\alpha$ -amyláz z kultivačnej kvapaliny morfológických variantov R, P a S *Bacillus subtilis* R-623 afinným zrážaním, gélovou filtráciou a izoelektrofokusáciou. Študovali sa fyzikálno-chemické, imunologické a katalytické vlastnosti vylučovaných  $\alpha$ -amyláz. Zistilo sa, že čo do molekulárnych hmotností, aminokyselinového zloženia a izoelektrického bodu sú si navzájom celkom blízke. Nie celkom rovnaké sú po imunochemickej stránke. Bola zistená určitá variabilita katalytických vlastností  $\alpha$ -amyláz z morfológických variantov *Bacillus subtilis* R-623.

**Глемжа, А. А. — Бальсис, А. Б. — Бахматова, И. В. — Баратова, Л. А. — Синицын, А. П.: Биосинтез и свойства  $\alpha$ -амилаз морфологических вариантов *Bacillus subtilis* R-623. Квас. прум. 32, 1986, № 11, стр. 269–273.**

В настоящей работе представлен метод получения однородных  $\alpha$ -амилаз из культуральной жидкости R, P и S морфологических вариантов *Bacillus subtilis* R-623 путем аффинного осаждения, гель-фильтрации и изоэлектrofокусирования. Изучены физико-химические, иммунологические и каталитические свойства выделения  $\alpha$ -амилаз. Установлено, что они весьма близки по молекулярным массам, аминокислотному составу, изoeлектрической точке. Неполностью идентичны иммунохимически. Обнаружена некоторая вариабельность каталитических свойств  $\alpha$ -амилаз из морфологических вариантов *Bacillus subtilis* R-623.

**Glemža, A. A. - Baisis, A. B. - Bachmatova, I. V. - Baratova, L. A. - Sinicyn, A. P.: Biosynthesis and Some Properties of  $\alpha$ -Amylases from Morphologically Different Forms of *Bacillus subtilis* R-623. Kvas. prům. 32, 1986, No. 11, pp. 269–273.**

Homogeneous preparations of extracellular  $\alpha$ -amylases from cultural medium of P, R and S morphological forms of *Bacillus subtilis* R-623 were isolated by affinity precipitation followed by gel filtration and isoelectrical focusing. Some physico-chemical, immunochemical and catalytical properties of isolated  $\alpha$ -amylases were studied. They have identical molecular weights, isoelectrical points and amino acid compositions, yet are only partially similar immunochemically.  $\alpha$ -Amylases from morphological forms *Bacillus subtilis* R-623 are slightly different on their catalytical properties.

**Glemža A. A. - Baisis A. B. - Bachmatova I. V. - Baratova L. A. - Sinicyn A. P.: Biosynthese und Eigenschaften der  $\alpha$ -Amylasen der morphologischen Varianten von *Bacillus subtilis* R-623. Kvas. prům. 32, 1986, Nr. 11, S. 269–273.**

In dem Artikel wird die Methode der Gewinnung homogener  $\alpha$ -Amylasen aus der Kultivationsflüssigkeit morphologischer Varianten R, P und S von *Bacillus subtilis* R 623 mittels Affinfällung, Gelfiltration und Isoelektrofokussation vorgestellt. Es wurden die physikalisch-



chemischen, imunologischen und katalytischen Eigenschaften der gewonnenen  $\alpha$ -Amylasen studiert und es wurde festgestellt, daß sie in den Kriterien Molekularmasse, Aminosäurezusammensetzung und im isoelektrischen Punkt einander sehr nahe sind. Relativ grössere

Differenzen zeigten sich in den imunologischen Eigenschaften. Es wurde weiter auch eine bestimmte Variabilität der katalytischen Eigenschaften der  $\alpha$ -Amylasen aus den morphologischen Varianten von *Bacillus subtilis* R-623 festgestellt.