

ENZYMATICKÁ OXYDÁCIA KYSELINY ITAKÓNOVEJ NA KYSELINU ITAVÍNNU

JÁN ARPAI

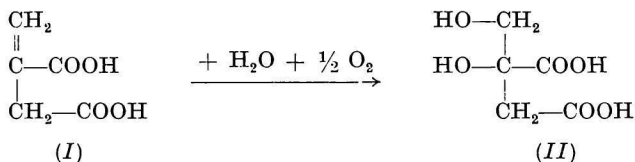
Oddelenie mikrobiológie a biochémie Výskumného ústavu mraziarenského
v Bratislave

Úvod

Glykolytickým procesom optimálnej, t. j. v prevažnej miere homofermentatívnej biosyntézy kyseliny itakónovej sme sa po stránke kvalitatívnej a kvantitatívnej, ako aj z hľadiska kinetiky enzymatickej premeny už v predchádzajúcich prácach zaoberali [1, 2]. Pri mutačnej selekcii aktívnych kmeňov producentov kyseliny itakónovej sme však našli aj výrazne heterofermentatívne kmene *Aspergillus terreus* Thom, ktoré popri kyseline itakónovej vytvárali aj iné kyseliny, a to najmä kyselinu oxalovú, citrónovú, fumarovú a jantárovú [1]. V literatúre sa uvádza i výskyt ďalších kyselín v metabolizme kmeňov *Aspergillus terreus*, ako napr. produkcia kyseliny fumarovej [3]. Osobitne zaujímavá je zpráva, že u genetických mutantov získaných vplyvom ultrafialového (UV) žiarenia sa ako jeden z metabolitov zistila kyselina itavínna [4]. Biosyntetická tvorba tohto homológa kyseliny vínnej sa dosiaľ pozorovala — pokiaľ je nám známe — výlučne v tomto jedinom prípade, t. j. v metabolizme nižšej huby vystavenej mutačnej dávke UV-žiarenia. Vedie to k predpokladu, že výskyt tejto kyseliny ako produktu látkovej premeny, resp. výskyt enzýmu, ktorý katalyzuje biosyntézu kyseliny itavínnej, možno hodnotiť ako špecifický, resp. traumatický znak fyziológie, na základe ktorého mohla by sa u aspergilov produkujúcich kyselinu itakónovú vykonať biochemická detekcia zmien dedičných vlastností vyvolaných silne pôsobiacimi faktormi.

Sledovanie a hodnotenie vzájomného vzťahu kyseliny itakónovej a kyseliny itavínnej z hľadiska mechanizmu ich enzymatickej premeny, ako aj v rámci procesov prebiehajúcich pri látkovej premene ich mikróbných producentov musí vychádzať z chemickej štruktúry týchto látok.

Z porovnania štruktúrnych vzorcov *I* a *II* je zrejmé, že kyselina itavínna môže vzniknúť oxidáciou kyseliny itakónovej. Táto možnosť sa už na sklonku minulého storočia realizovala manganistanovou oxidáciou [5]. O tom, že by



sa bol niekto pokúsil o podobnú reakciu enzymatickou cestou, nemáme zprávy. Tak isto sme sa nestretli s opisom príslušného enzýmu, ktorému podľa povahy katalyzovaného chemického procesu by prislúchalo označenie „itakón-oxydáza“ [6]. Vychádzajúc však zo skutočnosti, že v niektorých prípadoch mutanty producentov kyseliny itakónovej biosyntetizujú kyselinu itavínnu, ako aj z poznatkov o biochemizme metabolizmu producentov, predpokladali sme existenciu takéhoto enzýmu, ktorý by bol schopný spôsobiť oxydáciu kyseliny itakónovej na kyselinu itavínnu. Na overenie predpokladu sme vykonali pokusné práce.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Kyselinu itakónovú, ktorú sme používali ako základnú chemikáliu, dodala nám Lachema, n. p., Brno.

Kyselinu itavínnu slúžiacu ako štandard sme pripravili chemickou oxydáciou [5]. Postupovali sme pri tom tak, že sme kyselinu itakónovú zaliali stonásobným váhovým množstvom vody. Roztok sme alkalizovali kyslým uhličitanom sodným. Tekutina sa v chladničke ochladila na 0 °C. Potom sme za stáleho miešania pridávali po kvapkách 2 % roztok manganistanu draselného (1 mól KMnO_4 na 1 mól kyseliny itakónovej), pričom sme dbali, aby teplota počas oxydácie nevstúpila nad 0 °C. Permanganátový roztok sa odfarbil, tvoriac mangánperoxyhydrát. Po dokonalom usadení kyslíčnika manganičitého sa čirý roztok zliat a zrazenina sa ešte vymyla horúcou vodou. Dekantovanú tekutinu sme prefiltrovali, zneutralizovali a zahustili na malý objem. Po okyslení kyselinou soľnou sme filtrát trikrát vytrepali éterom. Oddestilovaním éteru sme získali sirupovitú látku, ktorá zapáchala po kyseline octovej. Preto sme ju zriedili vodou a na vodnom kúpeli za stáleho miešania zahustili. Odparovanie sa opakovalo až do úplného vypudenia kyseliny octovej. Na sirupovitej látke sa vytvorili kryštáliky, ktoré sme identifikovali ako kyselinu štavetovú [7]. Pre odstránenie tejto kyseliny sme sirupovitú látku znovu rozpustili vo vode. Roztok sme zneutralizovali kyslíčnikom uhličitým za studena a filtrát znovu zahustili. Pri tom sa na stenách a na dne kadičky usadzovali biele kryštáliky vápenatej soli, zatiaľ čo kryštalizačný roztok nadobúdal kyslú reakciu. Z kryštalizačného líhu sa potom po oddelení vápenatej soli pomocou nadbytočného množstva épavku a chloridu vápenatého získala ťažko rozpustná zrazenina vápenatej soli, ktorá podľa metodiky mala byť itavínan vápenatý kryštalujúci s polovicou molekuly vody. Orientačným rozborom sme sa presvedčili o obsahu vápnika a kryštalovej vody. Keďže návažok 1,0015 g stratil pri 180 °C 0,0418 g H_2O a poskytol 0,6428 g CaSO_4 , znamená to, že sa zistilo 98,987 % vápnika a 98,955 % vody z teoretického množstva vyplývajúceho z rovnice $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_5\text{Ca} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$. Z tejto soli sme príslušnú kyselinu pripravili tak, že sme zrazeninu rozpustili v kyseline soľnej, zavarili a po vychladnutí vytrepali éterom. Po odparení éteru sme získali žltkastú látku medovitého vzhľadu, ktorej bod topenia (103 °C) sa zhodoval s údajmi literatúry o identifikácii kyseliny itavínnej [4]. Prekryštalovaním, ktoré sa robilo po rozpustení v éteri a po premytí kyselinou soľnou, získali sa dlhé ihlice kryštálov kyseliny itavínnej.

Kyselina itakónová sa vo fermentovanej tekutine stanovila podľa metodík obšírne opísaných v predchádzajúcich prácach [1, 2], kým pri stanovení, resp. izolácii kyseliny itavínnej v kultivačnej tekutine sa postupovalo tak, že sa kultivačná

tekutina zahustila vo vákuu až na desatinu pôvodného objemu. Vyzrážaná, resp. vykryštalovaná látka sa odfiltrovala za studena, potom sa vykonala éterová extrakcia, čím sa odstránili zvyšky kyseliny itakónovej. Filtrát sa zahustil do sirupovitej konzistencie, načo sa rozpustil v metanole s prídavkom éterického roztoku diazometánu. Takto pripravený metylester hľadanej kyseliny sme zachytili pomocou frakčnej vákuovej destilácie podľa metodiky, t. j. pri 129—134 °C (vo vákuu 2—3 mm Hg) vo forme žltkastej látky medovitej konzistencie, ktorá sa ďalej spracovala, resp. identifikovala obdobne ako štandard.

Enzymatický preparát sme pripravili z mycélia desaťdennej povrchovej kultúry UV-svetlom vyselektovaného kmeňa *Aspergillus terreus*, v ktorého kultivačnej pôde sa zistili asi 3 % kyseliny itavínnej, počítané na množstvo skvaseného cukru. Kultivácia producenta sa robila pri 30 °C na fermentačnej pôde tohto zloženia: glukóza 22,0 g, MgSO₄ · 7 H₂O 0,5 g, KCl 0,05 g, H₃PO₄ 0,418 g, ZnSO₄ · 7 H₂O 0,022 g, 0,5 N-HCl 4 ml, 0,5 N-HNO₃ 8 ml, NH₄NO₃ 4,0 g, kukuričný výluh 50 % sušiny 1,0 g a destilovaná voda do 1000 ml. Táto pôda sa rozdelila po 500 ml do dvojlitrových Rouxových nádob a frakčne sa sterilizovala v prúdiacej pare. Po filtračnom oddelení mycélia od kultivačného substrátu sa dvakrát premyla ľadovou vodou a separovala odstredením. Z takto upraveného mycélia, ktorého sušina bola 3,8 %, navážili sme 3,0 g. Po opätovnom premytí ľadovou vodou sa mycélium rozmiešalo s 3 ml 0,2 M citrátového tlmivého roztoku o pH 4,16. Táto hodnota pH sa po predchádzajúcich orientačných pokusoch zvolila so zreteľom na to, aby sa pre biosyntézu kyseliny itavínnej zachovala výhodná aktuálna acidita prostredia poslednej fázy fermentácie, keď dochádza k maximálnej tvorbe uvedeného produktu. Do tlmivého roztoku sa primiešalo 1,5 g sterilnej sklenej drviny. Takto získaná kašovitá látka sa opäť rozrobila so 7 ml citrátového tlmivého roztoku a po 20 minútovom odstredení pri 1500 ot./min. sa filtrovala. Číra tekutina vykazovala pH 4,2 a pri pokusoch slúžila ako enzymaticky účinná látka, ktorá sa uschovávala v chladničke.

Oxydácia. Priebeh enzymatickej oxydácie sme sledovali manometricky na Warburgovom prístroji. Do hlavného priestoru každej nádoby sme pipetovali 2,0 ml enzymaticky účinného preparátu. Do absorpčného kališka sme dali 0,2 ml 2 N-KOH. Z postranného ramena nádoby sme pridávali 1,0 ml citrátového tlmivého roztoku o pH 4,16, ktorý obsahoval kyselinu itakónovú o koncentrácii 0,25 %, 0,50 % a 0,75 %. Keďže sme pH upravovali pomocou hydroxydu sodného, skúšaná kyselina bola vo forme sodnej soli. Plynnou fázou bol vzduch. Po dosiahnutí tepelnej rovnováhy pri 37 °C sme obsah nádobiek zmiešali a v 10 minútových intervaloch merali spotrebu O₂ po dobu 90 minút. Paralelne sme nasadili kontrolu s enzymatickým preparátom pripraveným z mycélia iného kmeňa *Asp. terreus*, ktorý neprodukoval kyselinu itavínnu, t. j. bol identický s enzymatickým preparátom použitým na dismutáciu kyseliny *cis*-akonitovej [2]. Popri termobarometri sme sledovali aj slepé pokusy s enzymatickým preparátom v tlmivom roztoku bez obsahu kyseliny itakónovej.

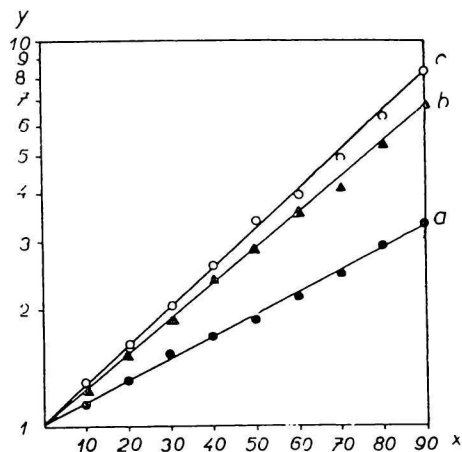
Výsledky a vyhodnotenie

Priemerné hodnoty údajov o priebehu enzymatickej oxydácie, sledovanej v trikrát opakovaných manometrických meraniach, sú zostavené do grafu 1.

Po ukončení oxydácie sa stanovovala v substráte prítomnosť kyseliny itavínnej, a to po použití enzymatického extraktu mycélia mutanta, ako aj fyziologicky nezmeneného kmeňa. Pokusné výsledky uvádzame v tab. 1.

Vyhodnotením pokusov sa dochádza k týmto podstatným záverom:

1. Mycélium UV-mutanta obsahuje endoenzým, ktorý katalyzuje biologickú oxydáciu kyseliny itakónovej vzdušným kyslíkom na kyselinu itavínnu. Takúto oxydačnú reakciu sa však nepodarilo vyvolať enzymatickým preparátom, ktorý bol obdobným spôsobom pripravený z mycélia kmeňa neproduktujúceho kyselinu itavínnu. Poukazuje to na určitú špecifickosť výskytu sledo-



Graf 1. Pribeh enzymatickej oxydácie kyseliny itakónovej na kyselinu itavínnu sledovanej na základe manometrického merania spotreby kyslíka.

x — doba v minútach, y — logaritmus hodnoty celkového množstva O_2 v μl . Priamka a — substrát s obsahom 0,25 % kyseliny itakónovej, priamka b — ako priamka a pri koncentrácii 0,50 %, priamka c — ako priamka a , resp. b pri koncentrácii 0,75 %.

Tabuľka 1

I	II	III	IV	V	VI
2,5	218	36	<2	85	0
5,0	488	45	<5	97	0
7,5	681	28	<3	89	0

I — počiatočné množstvo kyseliny itakónovej v mg

II — spotreba kyslíka v μl pri použití enzymatického substrátu z mycélia UV-mutanta

III — ako v stĺpci II pri použití enzymatického substrátu z nemutovaného kmeňa

IV — dýchanie enzýmov v čistom tlmivom roztoku v μl

V — percentuálny podiel dismutácie kyseliny itakónovej na kyselinu itavínnu pri použití enzýmu ako v stĺpci II

VI — ako v stĺpci V pri použití enzymatického substrátu ako v stĺpci III

vaného enzýmu, z ktorej sa dá usúdiť na cestu biosyntetickej tvorby kyseliny itavínnej oxydatívne pokračujúcej cez intermediárnu kyselinu itakónovú.

2. Kinetické pomery sledovaného oxydačného enzýmu zodpovedajú charakteristickým znakom enzymatického systému akonitázy, ktorou dochádza k biosyntéze kyseliny *izocitrónovej* a kyseliny *citrónovej* [8], uplatňujúcim sa pri tvorbe kyseliny itakónovej [2]. Pri rovnakej počiatočnej rýchlosti sledovaných enzymatických reakcií, za ktorých v rozpätí sledovaných koncentrácií za približne rovnaký čas sa substráty rovnakým podielom oxydovali, mal ich priebeh taký plynulý, t. j. na semilogaritmickej sústave lineárny spád, že možno právom predpokladať jednostupňové pôsobenie enzýmu. To však neznamená vylúčenie intermediárneho vzniku nestabilného hydroperoxydu a účinku peroxydázy, resp. katalázy, ktoré vždy zasahujú do aeróbného metabolizmu mikróbov. Tak isto v danom prípade ich pôsobením je vysvetliteľná hydroxylácia uhlíkov dvojitej väzby [9].

3. Jednou zo zvláštností reakčných podmienok sledovaného enzymatického preparátu, resp. ním vyvolanej oxydačnej reakcie je požiadavka voči aktuálnej acidite, ktorá je v tomto prípade podstatne nižšia (okolo pH 4) ako u enzýmov akonitázového systému (okolo pH 6). Aj keď treba pripustiť, že optimálne pH závisí nielen od kvalitatívnych vlastností samého enzýmu, ale aj od donátora vodíka, možno túto zvláštnu reakčnú podmienku hodnotiť ako znak, ktorým sa sledovaný enzým systematicky rozlišuje od obligátnych enzýmov trikarboxylového cyklu zúčastnených na biosyntéze kyseliny itakónovej, ktorá má pre itakónoxydázu metastatickú funkciu.

Diskusia

Pri štúdiu literatúry pravých oxydačných enzýmov mikroorganizmov [10—14] možno zistiť, že o týchto biokatalyzátoroch — nepočítajúc k nim peroxydázy — je nepomerne menej poznatkov u plesní než u kvasiniek alebo baktérií. Prekvapuje to tým viac, že práve plesne sa vyznačujú oxydatívnymi kvasnými schopnosťami, z ktorých mnohé majú veľký technický význam. Za najlepšie prebádanú plesňovú oxydázu bude možno považovať enzým glukónového kvasenia, tzv. glukózoxydázu [12, 13]. Ak porovnáваме vlastnosti, resp. funkciu enzýmu, o ktorom tu referujeme, s charakteristikami glukózoxydázy, dochádzame k názoru, že „itakónoxydáza“ by mala byť na rozdiel od glukózoxydázy pravým oxydačným enzýmom (t. j. neakceptujúcim metylénovú modrú ako donátor vodíka), ktorý nejaví vlastnosti aerodehydráz (citlivosť na azid sodný a špecifická inhibícia kyselinou kyanovodíkovou). Oproti tomu už z funkcie vyplýva, že zhodne s glukózoxydázou aj itakónoxydáza je flavínovým enzýmom, účinkujúcim bez účasti ťažkého kovu, ktorý tvorí hydroperoxyd, dokázateľný (sírovodíkom) po selektívnej otrave katalázy

vždy prítomnej v mycéliu. Na tomto mieste treba poznamenať, že všetky diskutované vlastnosti sa mali pokusne sledovať, lebo len takto by bolo možné meritórne systemizovať nový enzým. Táto práca však nezapadala do nášho výskumu, ktorým sme v rámci štúdia genetických zmien mikroorganizmov pod vplyvom silne pôsobiacich faktorov určovali nové biochemické kvality metabolizmu.

Očakávame však, že vzhľadom na praktický význam, ktorý najnovšie nadobúdajú niektoré oxydačné enzýmy plesní, najmä glukózoxydáza, pri snáhach o stabilizáciu živočíšnych produktov, napr. u zmrazených a lyofilizovaných potravinách, prikróči sa aj k biochemickému výskumu itakónoxydázy. O stabilizačnom mechanizme zdanlivo protirečivého účinku oxydáz je známe len toľko, že popri inhibícii mikroorganizmov prostredníctvom hydroperoxydu a možnosti oxydačnej deštrukcie niektorej rastovej látky potrebnej pre mikróby je možný aj priamy účinok na prostetickú zložku proteolytických a lypolytických enzýmov.

Ďakujem prof. dr. inž. F. Valentínovi za usmernenie v chemickej časti práce.

Сúhrn

Z mycélia mutanta *Aspergillus terreus Thom* selektovaného UV-žiarením sa získal enzymatický substrát, ktorý pri $\text{pH} \sim 4$ katalyzoval takmer kvantitatívnu oxydáciu kyseliny itakónovej na kyselinu itavínnu. Výberovosť výskytu tohto dosiaľ neopísaného enzýmu, ktorému by prislúchalo označenie „itakónoxydáza“, hodnotí sa z hľadiska biochemicky stanovovateľného kritéria pre genetické zmeny vyvolané na mikróbných producentoch kyseliny itakónovej.

V práci sú uvedené aj niektoré porovnania funkcií a vlastností oxydačných enzýmov so zreteľom na itakónoxydázu.

ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ ИТАКОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА КИСЛОТУ ИТАВИННУЮ

ЯН АРПАЙ

Отделение микробиологии и биохимии Исследовательского института
замораживания в Братиславе

Выводы

Из мицелия Уф-облучением селективированного мутанта *Aspergillus terreus Thom* был получен субстрат, который при $\text{pH} \sim 4$ катализировал почти полностью количественное окисление итаконовой кислоты на кислоту итавинную. Условие существования этого до сих пор неопisanного энзима, которому бы принадлежало название «итаконоксидаза», оценивается с точки зрения биохимически определяемых критериев для генетических изменений, вызываемых на микробных продуцентах итаконовой кислоты.

В работе приведены также некоторые сравнения функций и свойств окислительных энзимов по отношению к итаконоксидазе.

Поступило в редакцию 14. 4. 1958 г.

ENZYMATISCHE OXYDATION DER ITACONSÄURE ZU ITAWEIN-
SÄURE

JÁN ARPAI

Abteilung für Mikrobiologie und Biochemie des Forschungsinstituts für Gefiertechnik
in Bratislava

Zusammenfassung

Aus dem Myzel eines durch Ultraviolettbestrahlung selektierten Mutanten von *Aspergillus terreus Thom* wurde ein enzymatisch wirksames Substrat gewonnen, welches bei einem pH-Wert von ~ 4 die Fähigkeit besitzt, die Umwandlung der Itaconsäure in Itaweinsäure in fast quantitativer Ausbeute zu katalysieren. Die spezifische Produktion des angeführten enzymatischen Wirkstoffs, welcher bis jetzt nach Wissen des Autors noch nicht beschrieben wurde und welchem man die Bezeichnung „Itaconoxydase“ geben könnte, weist den Charakter eines biochemischen Merkmals auf, auf Grund dessen die genetische Mutation mikrobieller Produzenten der Itaconsäure festgestellt werden kann.

In dieser Arbeit werden auch einige Funktionen und Eigenschaften von Oxydationsfermenten in Bezug auf die Itaconoxydase behandelt.

In die Redaktion eingelangt den 14. 4. 1958

LITERATÚRA

1. Arpai J., *Fraciovanie spór pri selekcii producentov kyseliny itakónovej*. Biologické práce (SAV), Bratislava 1957. — 2. Arpai J., Valentín F., Chem. zvesti 11, 669 (1957). — 3. Yuill J. L., Nature (Brit.) 161, 397 (1948). — 4. Stodola F. H., Friedkin M., Moyer A. J., Coghill R. D., Biol. Chem. (Amer.) 161, 739 (1945). — 5. Fittig R., Ann. Chem. 305, 41 (1899). — 6. Arpai J., *Itaconic-oxidase*, Nature (Brit.) 182, 661 (1958). — 7. Tomiček O., *Kvantitatívni analyza*, Praha 1950. — 8. Fridrich—Freksa H., Martius C., Z. Naturforsch. 6b, 296 (1951). — 9. Maehly A. G., *The Assay of Catalases and Peroxidases I. General Methods*. V sborníku *Methods of Biochem. Analysis*, New York 1954. — 10. Müller D., Naturwissenschaften 28, 516 (1940).
11. Coulthard C. E., Biochem. J. 39, 24 (1945). — 12. Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J. 42, 221 (1948). — 13. Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J. 42, 230 (1948a). — 14. Kitavin G. C., Biochimija 16, 125 (1953).

Došlo do redakcie 14. 4. 1958