

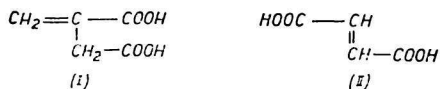
## ŠTÚDIUM KINETIKY BIOSYNTÉZY KYSELINY ITAKÓNOVEJ

J. ARPAI, F. VALENTIN

Výskumný ústav potravinárskeho priemyslu, oddelenie mikrobiológie  
a biochémie v Bratislave

## Úvod a problematika

Poznáme dve nenasýtené alifatické dikarbónové kyseliny, ktoré sa vo väčšom množstve biosyntetizujú ako finálny produkt skvasovania glycidov. Je to kyselina itakónová (I) čiže metylénjantárová a kyselina fumarová čiže *trans*-etyléndikarbónová (II), ktoré sú porovnávané na obr. 1.



Obr. 1.

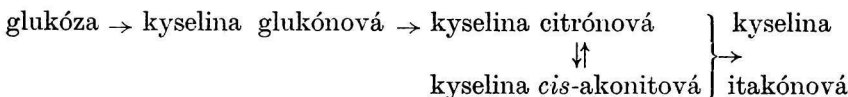
Najmä prvá z nich, t. j. kyselina itakónová má veľký praktický význam, keďže poskytuje cennú surovinu pri výrobe syntetických živíc na báze nenasýtených polyesterov, pri ktorých výrobe nahradzuje maleinanhydrid.

Tvorbu kyseliny itakónovej pri skvasovaní cukrov prvýkrát spozoroval Kinoshita [1], a to pri sledovaní novoizolovaného zeleného kameňa z rodu *Aspergillus*, ktorý označil ako *Asp. itaconicus*. Neskôršie Calam, Oxford a Raistrick [2] našli hnedý kmeň *Asp. terreus Thom*, ktorý mal vysokú produkciu kyseliny itakónovej. V súčasnosti sú k dispozícii mnohé produkčné kmene, ktoré buď za povrchovej, alebo za submerznej fermentácie dávajú až vyše 50 % výťažky kyseliny itakónovej, počítané na spotrebu cukornatej zložky média.

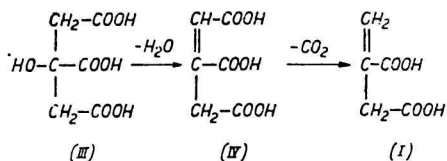
V zahraničí sú už v prevádzke priemyselné veľkovýroby kvasnej kyseliny itakónovej. Najväčšia, t. j. Pfizer v Brooklyne (USA) používa melasovú pôdu [3]. U nás pracovali na problémoch fermentácie Vopršal [4], Mergl [5] a najmä Jurmannová [6], kým na selekciu aktívnych producentov kyseliny itakónovej sa zamerail Arpai [7, 8, 9]. Dnes vyrába kvasné oddelenie Lachemy, n. p., Brno kyselinu itakónovú vo štvrtprevádzkovom a poloprevádzkovom rozsahu, pričom ako surovinu používa kukuričný cukor podľa Jurmannovej a Arpaia [10].

Kým v otázkach technológie kvasného priemyslu, ktorá sa v podstate opiera o technológiu fermentačnej výroby antibiotík, dosiahli sa pozoruhodné pokroky, resp. úspechy, mechanizmus tvorby kyseliny itakónovej je dosiaľ len ne-

dostatočne objasnený. Sám objaviteľ kyseliny itakónovej Kinoshita [11] vysvetľoval cestu biosyntézy takto:



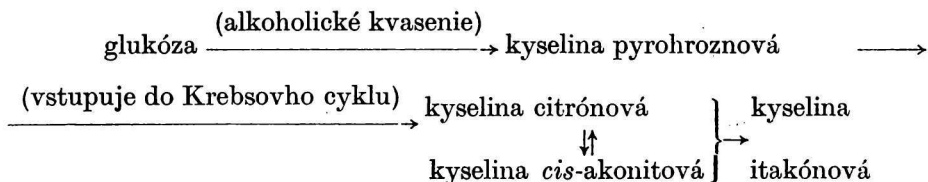
K tejto hypotéze sa dopracoval na základe pokusov, pri ktorých do kvasného média pridal ako neutralizátor uhličitan vápenatý, čím sa mu podarilo z prekvaseného substrátu získať kyselinu glukónovú a citrónovú vo forme ich vápenatých solí. Na základe toho vyslovil názor, že pri kvasení vzniká primárne kyselina citrónová (III), z ktorej prostredníctvom kyseliny cis-akonitovej (IV) sa až sekundárne tvorí kyselina itakónová (I) (pozri vzorce na obr. 2).



Obr. 2.

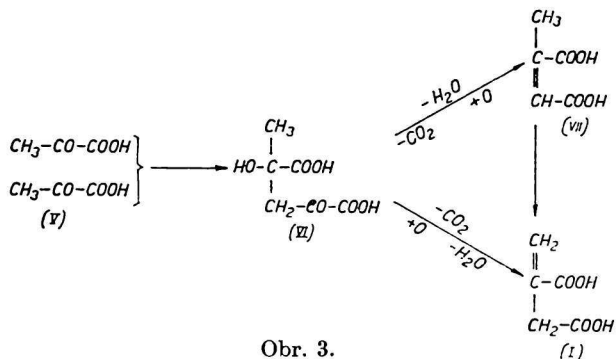
V substrátoch, ktoré sa skvasovali bez prídavku uhličitanu vápenatého, nedal sa dokázať vznik kyseliny glukónovej a citrónovej. Kinetiku premeny kyseliny citrónovej na kyselinu itakónovú v kyslom prostredí pokladal Kinoshita za takú istú ako pri tvorbe kyseliny citrónovej z cukru.

Prví, ktorí zaochybovali o správnosti uvedenej hypotézy, boli Calam, Oxford a Raistrick [2]. Experimentálne zistili, že pomocou mycélia huby *Asp. terreus* možno kyselinu citrónovú a jablčnú previesť na kyselinu itakónovú. Týmito premenami však dosiahli len malý zlomok toho množstva kyseliny itakónovej, ktoré produkovala kontrolná fermentácia z glukózy. Aj Foster [12] sa pri štúdiu biosyntézy kyseliny itakónovej zapodieval úlohou kyseliny citrónovej a jablčnej. Navrhuje túto schému vzniku kyseliny itakónovej z glukózy:

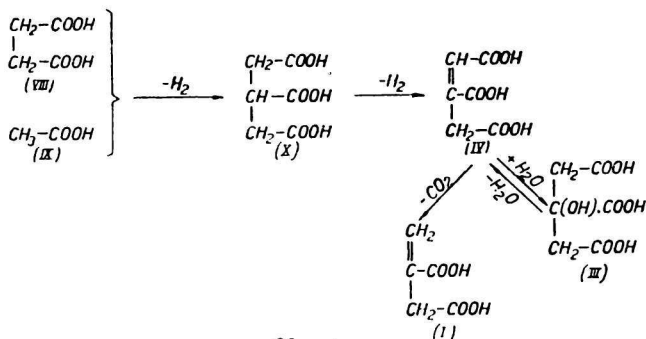


Podľa Fosteru musí enzymatický aparát plesne mať schopnosť premieňať kyselinu citrónovú vedľa kyseliny cis-akonitovej na kyselinu itakónovú.

Walker [13] už nepokladá za nevyhnutné, aby biosyntéza kyseliny itakónovej prebiehala cez kyselinu citrónovú, ba ani kyselinu *cis*-akonitovú neuvádza ako intermediárny produkt. Postup od kyseliny pyrohroznovej (V) si vysvetľuje aldolizáciou na 4-oxo-2-hydroxy-2,4-dikarboxylbután (VI), z ktorého oxydatívnou dekarboxyláciou môže vzniknúť priamo finálna kyselina itakónová (I), prípadne dehydratáciou vzniká ešte kyselina metyletylén-dikarbónová (VII) ako prekursor finálneho produktu. Walkerov postup znázorňuje obr. 3. Aj Yuill [14] sa pridrižiava posledne uvedenej schémy.



Bernhauer a spolupracovníci [15] postupovali síce odlišným spôsobom, avšak tak isto dospeli k názoru, že kyselina itakónová nevzniká z kyseliny citrónovej, ale z kyseliny *cis*-akonitovej, ktorá sa podľa Bernhauerovej teórie tvorí syntézou na základe dehydrogenizácie kyseliny jantárovej (VIII) a kyseliny octovej (IX), pokračujúc zo vzniknutej kyseliny trikarbalylovej (X) ďalšou dehydrogenizáciou na kyselinu *cis*-akonitovú (IV). Z kyseliny akonitovej ako intermediárneho produktu potom podľa toho, či dochádza k dekarboxylácii alebo k dehydratácii, produkuje sa v prvom prípade kyselina itakónová (I), kým v druhom prípade kyselina citrónová (III). Bernhauerova schéma je uvedená na obr. 4.



Najnovšie práce na objasnenie mechanizmu biosyntézy kyseliny itakónovej vykonal Bentley [16, 17]. Pomocou izotopov jednoznačne dokázal, že tvorba kyseliny itakónovej je spätá s trikarboxylovým cyklom. Poukázal na niekoľko nových zlúčenín, prípadne derivátov kyseliny ketoglutarovej, o ktorých možno predpokladať, že majú funkciu medziproduktov biosyntézy. Sú to kyselina  $\gamma$ -metylén- $\alpha$ -ketoglutarová, kyselina  $\gamma$ -metylénglutamová a  $\gamma$ -metylénglutamín. Naznačuje síce pravdepodobné prekurzory v podobe kyseliny 4-oxo-1-butén-1,2,4-trikarboxylovej, ktorá by mohla vzniknúť zo svojho 2-hydroxyderivátu, prípadne v podobe 4-fosfátovej soli uvedenej kyseliny, ale nezostáva nijaký obrazec o tom, ako zaradiť tieto intermediárne zlúčeniny. Bentley nerieši ani význam kyseliny citrónovej pri biosyntéze kyseliny itakónovej, i keď sa experimentálne zapodieva dekarboxyláciou kyseliny *cis*-akonitovej, s ktorou dosahuje takmer kvantitatívne dismutácie.

Keďže sme na základe priamej korešpondencie s R. Bentleyom dospeli k presvedčeniu, že uvedená problematika nie je ešte doriešená a že najmä z hľadiska kinetiky enzymatických reakcií nebola sledovaná, pokladali sme štúdium biosyntézy kyseliny itakónovej za aktuálne, najmä preto, že jeho výsledky môžu mať uplatnenie aj v praxi.

## Experimentálna časť

### *Materiál a metódy*

#### Enzymatický preparát

Z mycélia *sedeindesiathodino*vkej kultúry *Asp. terreus* sa pripravil enzymaticky účinný preparát. Použil sa produkčný kmeň, ktorý pod označením K2 opísal a pri selekčných prácach vyskúšal Arpai [18]. Kultivácia sa uskutočňovala v 500 ml bankách so 100 ml kvasného substrátu, na rotačnej trepačke, za fermentačných podmienok spresnených v predchádzajúcich prácach [8, 9, resp. 18]. Pôvodný kultivačný substrát, ktorý v tomto štádiu fermentácie obsahoval 11,4 mg čiže 29 % kyseliny itakónovej, počítané na prekvasený cukor, bol od mycélia filtračne oddelený. Potom sa mycéliová látka dvakrát premyla ľadovou vodou a separovala odstredením. Z takto upraveného mycélia, ktorého sušina bola 3,2 %, sme navážili 3,0 g. Po opätovnom premytí ľadovou vodou sa mycélium rozmiešalo s 3 ml 0,2 M fosfátového tlmivého roztoku o pH 6,5, do ktorého sa prímiešalo 1,5 g sterilnej sklenej drviny. Takto získaná kašovitá látka sa opäť rozrobila so 7 ml fosfátového tlmivého roztoku a po 20 minútovom odstredení pri 1500 obrátkach sa filtrovala. Číra tekutina vykazovala pH 6,5 a pri pokusoch slúžila ako enzymaticky účinná látka, ktorá sa uschovávala v ľadničke.

#### Dekarboxylácia

Priebeh enzymatickej dekarboxylácie sme sledovali manometricky na Warburgovom aparáte pri teplote 37 °C. Ako východiskovú látku sme použili kyselinu *cis*-akonitovú p. a. a kyselinu citrónovú p. a. Do hlavného priestoru každej nádobky sme dali 1,5 ml enzymaticky účinného substrátu. Z postranného ramena nádobky sme pridávali 1,5 ml fosfátového tlmivého roztoku o pH 5,6, ktorý pri prvej modifikácii obsahoval kyselinu

*cis*-akonitovú v koncentráciách 0,25 %, 0,50 % a 0,75 %, kým pri druhej modifikácii kyselinu citrónovú o molárne ekvivalentných koncentráciách 0,27 %, 0,54 % a 0,81 %. Kyseliny sme aplikovali vo forme ich sodných solí, t. j. pH ich roztokov sme upravili pomocou hydroxydu sodného. Pribeh dekarboxylácie sme sledovali priebehom 120 minút.

### Analytika

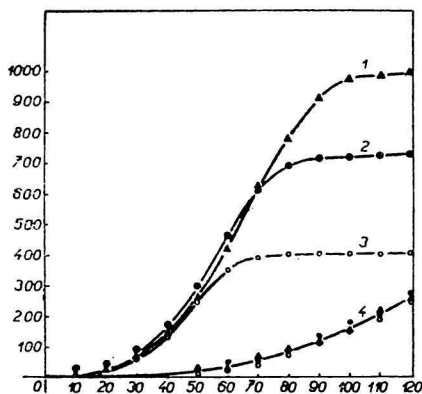
Kyseliny sa stanovovali podľa Bucha [19], prípadne Halliwella [20] na základe metodických pokynov M. Mergla [5], t. j. obdobne ako v predchádzajúcich prácach, kde sú aj obšírnejšie opísané [8, 9]. Hodnoty pH sa stanovovali elektrónkovým pH-metrom.

### Kinetika enzymatických premien

Teoretické podklady pre výpočty účinnosti, resp. reakčnej rýchlosti fermentov sa prevzali od Friedrich-Freksa a Martiusa [21] za použitia hodnôt rovnovážneho stavu kyseliny citrónovej, *cis*-akonitovej a *izo*-citrónovej podľa Martiusa a Leonharda [22].

### Výsledky a ich vyhodnotenie

Priemerné hodnoty údajov o priebehu dekarboxylačných reakcií manometricky sledovaných v troch opakovaníach sú zostavené do grafu 1. Z vyhodnotených pokusov vyplývajú tieto podstatné závery:



Graf 1. Priebeh produkcie CO<sub>2</sub> pri dekarboxylácii kyseliny *cis*-akonitovej a kyseliny citrónovej enzymatickým preparátom z mycélia *Aspergillus terreus*.

$x$  = doba v minútach,  $y$  = celkové množstvo CO<sub>2</sub> v µl, krivka 1 = substrát s obsahom 0,75 % kyseliny *cis*-akonitovej, 2 = ako krivka 1 pri koncentrácii 0,50 %, 3 = ako krivka 1 a 2 pri koncentrácii 0,25 %, 4 = substrát s obsahom kyseliny citrónovej pri všetkých sledovaných koncentráciách (0,81 %, 0,54 %, 0,27 %).

1. Dekarboxylácia, prípadne analyticky zachytená tvorba kyseliny itakónovej prebieha pri kyseline *cis*-akonitovej rýchlejšie, a to až štvornásobne, než pri enzymatickej premene kyseliny citrónovej.

2. Priebeh, najmä počiatočná rýchlosť sledovaných enzymatických reakcií nie je v podmienosti od koncentrácie substrátu. Platí to aspoň v rozpätí sledovaných koncentrácií, pri ktorých substráty za približne rovnaký čas rovnakým podielom dismutovali. Z toho vyplýva, že enzýmy sú pri reakcii so súbstrátom prakticky nasýtené a že za podmienok pokusu sú rýchlosti premien podmienené kvalitou a kvantitou enzýmov. Rozdiely reakčnej rýchlosti zodpovedajú predpokladu, že pri premene kyseliny *cis*-akonitovej na kyselinu itakónovú pôsobí jeden ferment, a to jednostupňovo, kým premena kyseliny citrónovej si vyžaduje predstavu o dvoch fermentoch, ktoré katalyzujú vo dvoch stupňoch, pričom prvý stupeň zodpovedá účinnosti systému akonitázy, riadiacej premenu kyseliny citrónovej na kyselinu akonitovú a kyselinu *izo*-citrónovú.

Na základe rovníc o priebehu reakcií akonitázy sa rýchlosti premeny javia takto:

$$\frac{dC}{dt} = k_1 E_A - k_2 E_C$$

$$\frac{dI}{dt} = k_3 E_A - k_4 E_I$$

pričom

$C$  = koncentrácia kyseliny citrónovej,

$I$  = koncentrácia kyseliny *izo*-citrónovej, resp. koncentrácia kyseliny itakónovej (It), podľa toho, na aký smer rovnicu aplikujeme,

$t$  = čas,

$E_A$  = koncentrácia časti enzýmu obsadenej kyselinou akonitovou; obdobné platí pre  $E_C$  vo vzťahu ku kyseline citrónovej a pre  $E_I$  vo vzťahu ku kyseline *izo*-citrónovej, prípadne ku kyseline itakónovej ( $E_{It}$ ),

$k_1$  až  $k_4$  = rýchlostné konštanty.

Tretia rovnica pre kyselinu akonitovú, ktorej koncentrácia je  $A$ , nie je potrebná, keďže súčet sledovaných kyselín, resp. produktov premien sa rovná jednej, ak sa koncentrácie kyselín vyjadrujú v ekvivalentných molárnych pomeroch, pričom sa neprihliada na nepatrné množstvá viazané na enzýmy.

Pre riešenie uvedených diferenciálnych rovníc musí byť daná závislosť, ktorá je medzi relatívnym podielom koncentrácie enzýmu a substrátu. Ak sa voľný enzým označuje  $E$ , podľa zákona účinnosti mása platí:

$$C \frac{E}{E_C} = K_C; \quad A \frac{E}{E_A} = K_A; \quad I \frac{E}{E_I} = K_I,$$

kde  $K_C$ ,  $K_A$  a  $K_I$  sú disociačné konštanty zlúčenín príslušného substrátu a enzýmu, ktoré bývajú označované ako Michaelisove konštanty. Keďže Warburg [23] zistil, že látky zanikajúce a vznikajúce sú takmer vždy rovnako silne bielkovinovú zložkou enzýmu viazané, môžeme predpokladať, že

$$K_C = K_A = K_I,$$

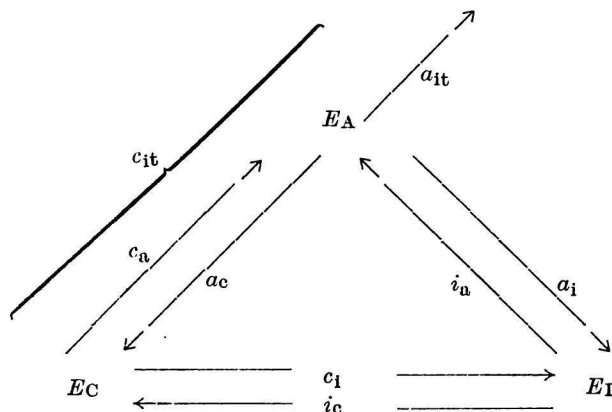
čiže  $E$  je časovo konštantné. Z toho vyplýva, že relatívne podiely sledovaných kyselín budú úmerné koncentrácii enzymatickej látky. Ak východiskové rovnice prepíšeme do tvaru

$$\frac{dC}{dt} = a_c A - c_a C$$

$$\frac{dI}{dt} = a_i A - i_a I,$$

pričom napr.  $a_c = k_1 \frac{E}{K_A}$ , znamená  $a_c$  konštantu pre reakciu: kyselina akonitová  $\rightarrow$  kyselina citrónová. Obdobne platia aj symboly  $a_i$  (akonitová  $\rightarrow$  *izo*-citrónová),  $c_a$  (citrónová  $\rightarrow$  akonitová),  $i_a$  (*izo*-citrónová  $\rightarrow$  akonitová), prípadne  $a_{it}$  (akonitová  $\rightarrow$  itakónová).

Po riešení rovníc dosadzovaním zjednodušených údajov rovnovážnych hodnôt korelácie kyselín zapojených na akonitázový systém, ktoré sa dajú vyjadriť hodnotami Michaelisových konštánt v približnom pomere  $K_A : K_I : K_C = 0,12 : 0,15 : 1$ , možno kinetiku enzymatických premien systému akonitázy schematicky znázorniť takto:



kde

$$c_i = x \text{ (základná hodnota)}$$

$$i_c = 2x$$

$$c_a = (x + 1)$$

$$a_c = 2(x + 1)$$

$$i_a = x + 2(x + 1)$$

$$a_i = x + 2(x + 1)$$

Alebo

$$c_a = c_i + 1$$

$$a_c = i_c + 2$$

$$i_a = c_i + a_c$$

$$a_i = c_i + a_c$$

Ak sa podľa práce citovanej v metodologickej časti [22] základná hodnota ( $x$ ) vyšli pre kinetické pomery akonitázy na základe rovnovážnych koncentrácií komplexu — substrát numerickou hodnotou 3, možno počiatočné rýchlosti enzymatických premien vyjadriť, resp. graficky znázorniť ako na grafe 2.

Keďže sa pokusne zistilo, že premena kyseliny akonitovej na kyselinu itakónovú prebieha väčšou rýchlosťou než z kyseliny citrónovej, platí:

$$a_{it} > c_{it}$$

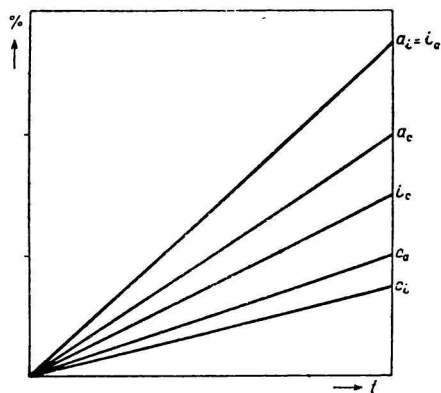
pričom za našich pokusov zodpovedá priemerne:

$$a_{it} = 1,6 c_{it} \sim 4 c_{it}$$

Vzhľadom na to, že v enzymatickom systéme akonitázy najmenšiu rýchlosť vykazuje reakcia premeny kyseliny citrónovej na kyselinu *cis*-akonitovú ( $x$ ), priebeh prechodu

kyseliny citrónovej na kyselinu itakónovú je rýchlejší, ak sa uskutoční cez kyselinu ízo-citrónovú.

Otázku nahodenú v úvode, o ktorej, ako sme videli z prehľadu literatúry, niet jednotného názoru, t. j. či biosyntéza kyseliny itakónovej prebieha intermediárne cez kyselinu citrónovú, možno zodpovedať v tom zmysle, že priebeh fermentácie kyseliny itakónovej zavádzanej enzymatickým aparátom mycélia *Asp. terreus* je priaznivejší, ak neprebieha cez kyselinu citrónovú, ale sa deje prostredníctvom kyseliny *cis*-akonitovej. Vyplýva to



Graf 2. Počiatočné rýchlosti enzymatického systému akonitázy vyjadrené smernicami.

$x$  = jednotky času,  $y$  = percento premeny kyselín,  $a_i$ ,  $i_a$ ,  $a_c$ ,  $i_c$ ,  $c_a$ ,  $c_i$  = reakčné rýchlosti enzymatických prechodov (označenie ako v texte).

už z okolnosti, že kyselina *cis*-akonitová je bezprostredným prekursorom kyseliny itakónovej, zatiaľ čo kyselina citrónová ako eventuálne vzdialenejší prekursor vyžaduje predchádzajúce premeny systémom akonitázy, ktorého aktivita v použítom extrakte plesne určuje rýchlosť premeny kyseliny citrónovej na kyselinu *cis*-akonitovú. Ďalej to vyplýva aj zo štúdia kinetiky akonitázy, ktoré nasvedčuje tomu, že dismutačný proces, resp. transport energie fosfatázami cez kyselinu citrónovú je podstatne pomalší než prostredníctvom kyseliny *cis*-akonitovej. Znamená to, že fermentačné podmienky musia prednostne vyhovovať požiadavkám účinnosti špecifickej dekarboxylázy, i keď zaručením aktivity jedného enzýmu nie je ešte zaistený priebeh celej enzymatickej reakcie, ktorá vyžaduje stály prísun substrátu. To však predpokladá činnosť iných enzýmov, ktoré vytvárajú dostatočnú koncentráciu kyseliny *cis*-akonitovej. Okrem toho je rýchlosť tvorby kyseliny itakónovej určená najpomalšou enzymatickou reakciou v celkovom reakčnom reťazci. Preto fermentačné podmienky musia vyhovovať celému radu enzýmov, čiže pri fermentácii treba dbať komplexne na optimálne podmienky enzymatických procesov.

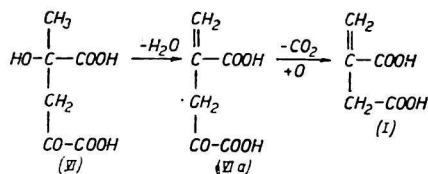
Možno to dosiahnuť najmä úpravou aktuálnej acidity prostredia, ktorej optimum pre *cis*-akonitín dekarboxylázu je v rozmedzí pH 5,6–5,9 (Bentley [17]). Tento záver našej práce je síce v rozpore s údajmi L. B. Lockwooda [24], A. J. Moyera a spolupracovníkov [25], ako aj niektorých iných autorov, ktorí uvádzajú podstatne nižšie hodnoty pH (1,9–3,8) ako optimálne pre kvasné médium pri biosyntéze kyseliny itakónovej, avšak teoreticky sa týmto potvrdzujú praktické výsledky K. Jurmannovej [6], ktorá na základe empirie došla k tomu, že pH fermentačnej tekutiny upravuje na iniciálnu hodnotu  $\sim 5$ , pri ktorej dosahuje optimálne výťažky za poloprevádzkovej



výroby kyseliny itakónovej. Pritom treba zdôrazniť, že kvasná výroba v Lachema, n. p., Brno, vedená Jumannovou, pracuje s tým istým produkčným kmeňom, s ktorým sme robili naše pokusy.

### Diskusia

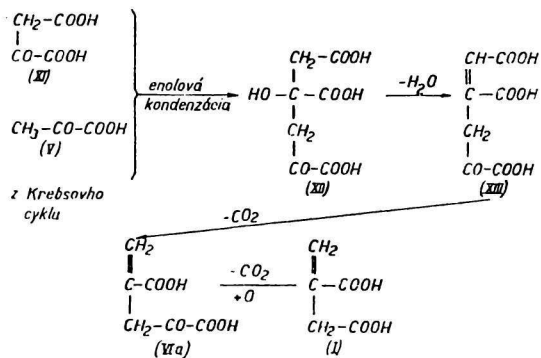
Kinetické pomery enzýmov akonitázy kvalitatívne potvrdzujú časť Bernhauerovej hypotézy, podľa ktorej kyselina *cis*-akonitová sa považuje za bezprostredne predchádzajúci intermediárny produkt kyseliny itakónovej, bez obligátnej závislosti od tvorby kyseliny citrónovej. Nemožno však potvrdiť, ba ťažko pripustiť, že Bernhauer [15, 26] vo svojom reakčnom procese operuje s kyselinou jantárovou, ktorú možno vyderivovať z glukózy, a s kyselinou octovou, ktorá však nevzniká z glukózy ani z iného glycidu, ale je posledným členom beta-oxydácie mastnej kyseliny s párnym počtom uhlíkatých atómov. Druhú teóriu, ktorá nepokladá kyselinu citrónovú, ba ani kyselinu *cis*-akonitovú za potrebný intermediárny produkt, vyslovil Walker [13]. Táto operuje so 7-uhlíkatou dvojsýtnou kyselinou vzniknutou z prvej pyrohroznovej aldolnej kondenzácie, pričom nie je jasná oxydatívna dekarboxylácia 4-oxo-2-hydroxy-2,4-dikarboxylbutánu (VI) na kyselinu itakónovú (I). Dismutácia by bola vysvetliteľná cez intermediárnu zlúčeninu, za ktorú by sa mohol prijať 2,4-dikarboxyl-4-oxo-1-butén (VIa). Walkerova schéma na obr. 3 je takto doplnená na obr. 5.



Obr. 5.

Nedostatky v uvedených schémach možno odstrániť tým, že sa prijíma Krebsov cyklus, ale len pre kyselinu pyrohroznovú (V) a oxaloctovú (XI). Od vzniknutej 7-uhlíkatej kyseliny sa však už ďalšia derivácia členov Krebsovho cyklu nepripúšťa. Podľa toho by enolizáciou vzniknutý 2-hydroxy-4-oxo-1,2,4-trikarboxylbután (XII) prechádzal dehydratáciou na 1,2,4-trikarboxyl-4-oxo-1-butén (XIII), z ktorého podobne ako v predchádzajúcej modifikácii vznikne cez 2,4-dikarboxyl-4-oxo-1-butén (VIa) kyselina itakónová (I), ako to vidieť na obr. 6. Pri tejto schéme je však potrebné predpokladať zvláštny druh enzymatickej dekarboxylácie, kde 4-oxoskupina prechádza v karboxyl. Keďže kinetika podobnej reakcie nie je známa, pravdepodobnejšia je biosyntéza kyseliny itakónovej prostredníctvom kyseliny *cis*-akonitovej. Nasvedčuje tomu aj okolnosť, že kyselina oxaloctová, z ktorej sa vychádza, je posledným

členom Krebsovho cyklu, a tak tento musel prebehnúť úplne, pričom počas cyklu bola daná príležitosť pre vznik kyseliny *cis*-akonitovej. Pri vyhodnocovaní tejto alternatívy treba prihliadať na špecifickú účinnosť enzymatického substrátu mycélia produkčného kmeňa, ktorá sa v priebehu dekarboxylácie kyseliny *cis*-akonitovej za našich pokusov veľmi výrazne prejavovala.



Obr. 6.

Napokon možno vziať do úvahy aj názory K. E. Eimhjellena a H. Lar-sena [27], ktorí na základe pokusov s rozličnými substrátmi a inhibítormi predpokladajú prechod glukózy na  $\text{C}_3$ -zlúčeninu, pravdepodobne na kyselinu pyrohroznovú a hypotetickú aktivovanú kyselinu citrónovú, ktorá má byť bližším prekursorom kyseliny itakónovej než kyselina *cis*-akonitová. Klasic-kými reakčnými vzorcami však túto hypotetickú aktivovanú kyselinu citrón-ovú nemôžeme vyjadriť.

### Súhrn

Priebeh enzymatickej dekarboxylácie kyseliny *cis*-akonitovej a kyseliny citrónovej na kyselinu itakónovú sa sledoval manometrickou metódou. Enzy-maticky účinný substrát sa pripravil zo submerzne kultivovaného mycélia kmeňa *Aspergillus terreus Thom.*, aktívneho producenta kyseliny itakónovej.

Zistilo sa, že premena kyseliny *cis*-akonitovej na kyselinu itakónovú pre-bieha podstatne väčšou rýchlosťou než premena kyseliny citrónovej, pričom za optimálnych podmienok účinnosti *cis*-akonitín dekarboxylázy v rozmedzí pH 5,6—5,9 má dismutácia takmer kvantitatívny charakter. Z toho vyplýva pre prax, že kvasné médium upravené pre podmienky účinnosti *cis*-akonitín dekarboxylázy má najlepšie predpoklady pre rýchlu biosyntézu kyseliny itakónovej. Tvorbu intermediárnej kyseliny citrónovej treba však na základe štúdia kinetických pomerov akonitázového systému pokladať za prejav menej vyhovujúceho priebehu fermentácie, keďže má až štvornásobne nižšiu rýchlosť.

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ БИОСИНТЕЗА ИТАКОНОВОЙ  
КИСЛОТЫ

Я. АРПАЙ, Ф. ВАЛЕНТИН

Исследовательский институт пищевой промышленности, отделение микробиологии  
и биохимии в Bratislave

## Выводы

Ход ферментативной декарбоксиляции цис-aconитовой и лимонной кислот на итаконовую кислоту был следован манометрическим способом. Ферментатически активный субстрат был приготовлен из субмерсно-культивируемого мицелиума штамма *Aspergillus terreus Thom*, который был активным продуктом итаконовой кислоты.

Было найдено, что перемена цис-aconитовой кислоты на итаконовую проходит значительно большей скоростью, чем перемена лимонной кислоты, при чем при оптимальных условиях действия цис-aconитин декарбоксилазы, которые лежат в границах pH от 5,6 до 5,9, дисмутация имеет почти количественный характер.

Практически из этого следует, что медium брожения, приспособленное условиям действия цис-aconитин декарбоксилазы, имеет самое лучшее предположение к быстрому биосинтезу итаконовой кислоты. Возникновение интермедиарной лимонной кислоты на основании изучения кинетических отношений аconитовой системы, нужно полагать за явление менее удовлетворяющее ходу ферментации, потому что оно имеет скорость меньшую в четыре раза.

Поступило в редакцию 22. 3. 1957 г.

## STUDIUM DER KINETIK DER BIOSYNTHESE VON ITACONSÄURE

J. ARPAI, F. VALENTIN

Forschungsinstitut für die Nahrungsmittelindustrie, Abteilung für Mikrobiologie  
und Biochemie in Bratislava

## Zusammenfassung

Der Verlauf der enzymatischen Decarboxylierung der *cis*-Aconitsäure und Citronensäure zu Itaconsäure wurde durch die manometrische Methode verfolgt. Das enzymatisch wirksame Substrat wurde aus dem submers kultivierten Myzel des Stamms *Aspergillus terreus Thom*, des aktiven Produzenten der Itaconsäure, zubereitet.

Es wurde festgestellt, dass die Umwandlung der *cis*-Aconitsäure in die Itaconsäure mit wesentlich grösserer Geschwindigkeit verläuft, als die Umwandlung der Citronensäure, wobei unter optimalen Bedingungen der Wirksamkeit der *cis*-Aconitin Decarboxylase, welche im Bereich des pH 5,6—5,9 liegen, die Dismutation fast einen quantitativen Charakter aufweist.

Daraus geht für die Praxis hervor, dass das Gärungsmedium, welches auf die Bedingungen der Wirksamkeit von *cis*-Aconitin Decarboxylase eingestellt wurde, die besten Voraussetzungen für eine rasche Biosynthese der Itaconsäure besitzt. Die Bildung der intermediären Citronensäure muss man hingegen auf der Grundlage des Studiums der kinetischen Verhältnisse des Aconitase-Systems als Ausdruck eines weniger entsprechenden Verlaufs der Fermentation ansehen, nachdem sie eine fast vierfach niedrigere Geschwindigkeit aufweist.

In die Redaktion eingelangt den 22. 3. 1957

## LITERATÚRA

1. Kinoshita K., J. chem. Soc. Japan 50, 583 (1929). — 2. Calam C. T., Oxford A. E., Raistrick H., Biochem. J. 33, 1488 (1939). — 3. Pfizer Ch. a spol., Chem. Eng. 62, 116 (1955); Brit. patent 602 866 (4. 6. 1948). — 4. Vopřsal J., Osobné oznámenie, 1954. — 5. Mergl M., Diplomová práca, Praha 1954. — 6. Jurmannová K., Osobné oznámenie, 1954—1956. — 7. Arpai J., Kvasný Průmysl 2, 12 (1956). — 8. Arpai J., *Frakciovanie spór pri selekcii producentov itakónovej kyseliny*, Bratislava, v edícii: Biologické práce, č. 3 (1957). — 9. Arpai J., Čs. Mikrobiol. 2, 213 (1957). — 10. Jurmannová K., Arpai J., Referáty prednesené na konferencii Deň novej techniky škrobárenského priemyslu, Smolenice 1955.

11. Kinoshita K., Acta phytochim. Japan 5, 271 (1931). — 12. Foster J. W., *Chemical Activities of Fungi*, New York 1949. — 13. Walker T., Advances in Biochem. 9, 537 (1949). — 14. Yuill J. L., Nature 161, 397 (1948). — 15. Bernhauer K., Inglauer A., Knobloch H., Biochem. Z. 307, 298 (1941). — 16. Bentley R., Federation. Proc. 13, 182 (1954). — 17. Bentley R., Science 122, 330 (1955). — 18. Arpai J., *Selekcia producentov itakónovej kyseliny*. Dizertačná práca, Bratislava 1957. — 19. Buch J., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 24, 489 (1952). — 20. Halliwell G., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 17, 637 (1945).

21. Friedrich-Freksa H., Martius C., Z. Naturforsch. 6b, 296 (1951). — 22. Martius C., Leonhard H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 278, 208 (1943). — 23. Warburg O., *Wasserstoffübertragende Fermente*, Berlin 1948. — 24. Lockwood L. B., USP 2 462 981 (1. 3. 1949). — 25. Moyer A. J., Coghill R. D., Arch. Biochem. 7, 167 (1945). — 26. Bernhauer K., Ergeb. Enzymforsch. 3, 185 (1934). — 27. Eimhjellen K. E., Larsen H., Biochem. J. 60, 139 (1955).

Došlo do redakcie 22. 3. 1957