

# 3-Keto-L-gulonat-Decarboxylase aus *Schwanniomyces occidentalis*

Von

**P. Dworsky und O. Hoffmann-Ostenhof\***

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 30. März 1967)

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, daß in der Hefe *Schwanniomyces occidentalis*, die auf einem Medium mit *myo*-Inosit als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann, die Überführung von L-Gulonsäure in L-Xylulose durch zwei nacheinander wirkende Enzyme katalysiert wird, von denen das erste — in völliger Analogie zu den Verhältnissen in tierischem Gewebe — die Dehydrogenierung von L-Gulonsäure zu 3-Keto-L-gulonsäure bewirkt<sup>1</sup>. Es konnte nunmehr auch das für den zweiten Schritt, die Decarboxylierung der 3-Keto-L-gulonsäure zur L-Xylulose, verantwortliche Enzym nachgewiesen werden, das ebenfalls dem analogen tierischen Enzym weitgehend gleicht.

It has been shown previously that the transformation of L-gulonic acid to L-xylulose in the yeast *Schwanniomyces occidentalis*, which is capable of growing on *myo*-inositol as the only carbon source, is catalyzed by a sequence of two enzymic reactions. In complete analogy to the situation in animal tissue, the first enzyme dehydrogenates L-gulonic acid to 3-keto-L-gulonic acid<sup>1</sup>. It has now been possible to establish the existence of the second enzyme which is responsible for the decarboxylation of 3-keto-L-gulonic acid to L-xylulose. This enzyme also is very similar to the corresponding animal enzyme.

Eingehende Untersuchungen des Stoffwechsels von *myo*-Inosit in der Hefe *Schwanniomyces occidentalis*, die, wie wir seinerzeit zeigen konnten<sup>2</sup>,

\* Herrn Prof. Dr. F. Wessely zum 70. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> P. Dworsky und O. Hoffmann-Ostenhof, Acta biochim. polon. **11**, 270 (1964).

<sup>2</sup> R. G. Janke, C. Jungwirth, I. B. Dawid und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **90**, 382 (1959).

auf einem Medium wachsen kann, das *myo*-Inosit als einzige Kohlenstoffquelle enthält, lassen auf einen Abbauweg schließen, der mit demjenigen, welcher in tierischen Geweben für diese Substanz nachgewiesen wurde, weitgehend analog ist<sup>3, 4</sup>. Der Cyclit wird primär mit Hilfe einer *myo*-Inosit-Oxygenase<sup>5</sup> (*myo*-Inosit: Sauerstoff-Oxydoreductase EC 1.13.1.11)<sup>5a</sup> oxydativ zu D-Glucuronsäure aufgespalten, welche dann über L-Gulonsäure, L-Xylulose, D-Xylulose und den Pentosephosphat-Cyclus weiter abgebaut wird. Dieser offenbar den höheren Tieren und der genannten Hefe gemeinsame Abbauweg für *myo*-Inosit unterscheidet sich deutlich von Mechanismen, welche in Bakterienarten für die Degradation von *myo*-Inosit verantwortlich ist<sup>6</sup>.

*Ashwell* und Mitarbeiter<sup>7, 8</sup> untersuchten seinerzeit die Überführung von L-Gulonsäure in L-Xylulose in tierischen Geweben und stellten fest, daß hier eine Reaktionskette aus zwei enzymatisch katalysierten Umsetzungen vorliegt:

- a) L-Gulonsäure + NAD<sup>+</sup> = 3-Keto-L-gulonsäure + NADH + H<sup>+</sup>,
- b) 3-Keto-L-gulonsäure → L-Xylulose + CO<sub>2</sub>.

Den Autoren gelang es, die zwei beteiligten Enzyme teilweise zu reinigen und zu charakterisieren.

Es erschien uns von Interesse zu prüfen, ob auch in der von uns bearbeiteten Hefe derselbe Mechanismus für die genannte Umsetzung verantwortlich ist. In einer früheren Arbeit<sup>1</sup> konnte dies wahrscheinlich gemacht und das die Reaktion a) katalysierende Enzym charakterisiert werden. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über das Enzym, das Reaktion b) bewirkt, die 3-Keto-L-gulonat-Decarboxylase (3-Keto-L-gulonat-Carboxy-lyase, EC 4.1.1.34)<sup>5a</sup>.

### Experimenteller Teil

*Züchtung des Organismus.* Der verwendete Stamm von *Schwanniomyces occidentalis*, der aus der Sammlung des Instituts für Biochemische Technologie und Mikrobiologie der Technischen Hochschule Wien stammte, wurde in gleicher Weise gezüchtet, wie wir es in einer früheren Mitteilung<sup>1</sup> beschrieben haben.

*Herstellung des Enzymextraktes.* 15—20 g der Hefe (Naßgewicht) wurden in zwei Kölbchen mit einer Lösung, die in bezug auf Trispuffer, pH 9,0,

<sup>3</sup> A. Sivak und O. Hoffmann-Ostenhof, Biochem. Z. **336**, 229 (1962).

<sup>4</sup> P. Dworsky und O. Hoffmann-Ostenhof, Biochem. Z. **343**, 394 (1965).

<sup>5</sup> E. Thonet und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **97**, 107 (1966).

<sup>5a</sup> Enzyme Nomenclature. Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry. Elsevier: Amsterdam 1965.

<sup>6</sup> T. Berman und B. Magasanik, J. Biol. Chem. **241**, 800, 807 (1966).

<sup>7</sup> J. D. Smiley und G. Ashwell, J. Biol. Chem. **236**, 357 (1961).

<sup>8</sup> J. Winkelmann und G. Ashwell, Biochim. Biophys. Acta **52**, 170 (1961).

0,02 M, und in bezug auf Cysteinhydrochlorid 0,001 M war, im Apparat nach *Merkenschlager et al.*<sup>9</sup> homogenisiert. Das Homogenat wurde mit Ammoniumsulfat bis zur 40proz. Sättigung versetzt, das ausgefallene Material verworfen und der Überstand auf 60proz. Ammoniumsulfat-Sättigung gebracht. Diese Fällung wurde nunmehr in 0,01 M-Trispuffer, pH 9,0, gelöst und 2 Stdn. lang gegen Trispuffer, pH 9,0, der in bezug auf Cysteinhydrochlorid 0,001 M war, dialysiert.

*Herstellung des Substrats.* Das Substrat wurde im wesentlichen nach der Vorschrift von *Winkelman* und *Ashwell*<sup>8</sup> auf enzymatischem Weg hergestellt, wobei allerdings anstelle des von diesen Autoren verwendeten Enzyms (3-L-Hydroxysäure-Dehydrogenase aus Schweinenieren) die von uns beschriebene 3-L-Aldonsäure-Dehydrogenase aus *S. occidentalis*<sup>1</sup> zur Anwendung kam. Die beiden Enzyme unterscheiden sich nur wenig in der Spezifität und werden beide der offiziellen Enzymnomenklatur<sup>5a</sup> entsprechend als L-Gulonat:NAD-Oxydoreductase (EC 1. 1. 1. 45) klassifiziert. Der Gehalt der Präparation an 3-Keto-L-gulonsäure wurde nach Zersetzung durch Kochen mit der Cystein—Carbazol-Methode nach *Dische* und *Borenfreund*<sup>10</sup> bestimmt (vgl. dazu *Winkelman* und *Ashwell*<sup>8</sup>). Dies ist deshalb erforderlich, weil sich das Substrat bei Lagerung sehr leicht zersetzt, wobei L-Xylulose entsteht.

*Bestimmung der Enzymaktivität.* Zur Messung der Enzymwirkung bedienten wir uns der Methode von *Winkelman* und *Ashwell*<sup>8</sup>. Es erwies sich als notwendig, bei jeder Bestimmung eine Messung eines Blindwertes mit gekochtem Enzymextrakt vorzunehmen.

*Bestimmung und Identifizierung des Reaktionsproduktes.* Die entstandene L-Xylulose wurde mit Hilfe der Carbazol-Methode von *Dische* und *Borenfreund*<sup>10</sup> bestimmt; sie wurde auf papierchromatographischem Weg nach von uns bereits beschriebenen Methoden identifiziert<sup>1</sup>.

## Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, daß das Enzym pro Mol verbrauchter 3-Keto-L-gulonsäure 1 Mol L-Xylulose produziert. Bei genügend langer Inkubation wird die Ketosäure vollständig decarboxyliert. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bis zu einer Substratkonzentration von 1,3 mMol/l linear von der Enzymmenge abhängig.

Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei etwa 5,8; ein zweites pH-Optimum wurde nicht gefunden.

Das Enzym ist in Abwesenheit von Cystein sehr instabil, kann aber noch nach 2 Tagen durch Zusatz von Cystein regeneriert werden. Eine nach der oben angegebenen Vorschrift hergestellte Enzympräparation ist etwa 1 Woche ohne Aktivitätsverlust haltbar.

Die Aktivität des Enzyms wird durch Zusatz von Äthylendiamintetraessigsäure, Nitrilotriessigsäure, Mn<sup>++</sup> und Mg<sup>++</sup> bis zu Konzentra-

<sup>9</sup> *E. Merckenschlager, K. Schloßmann und W. Kurz, Biochem. Z.* **329**, 332 (1957).

<sup>10</sup> *Z. Dische und E. Borenfreund, J. Biol. Chem.* **192**, 583 (1951).

tionen von 1 mMol/l nicht beeinflußt. Ebenso ist Cystein gegenüber voll-aktiven Präparationen ohne Wirksamkeit. Hingegen ist das Enzym gegen  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$  und p-Chlormercuribenzoat empfindlich.

### Diskussion

Der von uns in der Hefe *Schwanniomyces occidentalis* untersuchte Abbauweg für *myo*-Inosit und D-Glucuronsäure zeigt, wie schon mehrfach festgestellt wurde, sehr weitgehende Übereinstimmungen mit den gleichartigen Reaktionswegen in höheren Tieren. Auch das hier beschriebene Enzym macht davon keine Ausnahme; seine Eigenschaften stimmen, wenn wir davon absehen, daß *Winkelman* und *Ashwell*<sup>8</sup> bei ihrem Enzym aus Meerschweinchen-Leber zwei pH-Optima finden (5,8 und 7,6), während unser Enzym nur eines bei pH 5,8 aufweist, mit denjenigen des tierischen Enzyms weitgehend überein.

Zahlreiche in der Literatur beschriebene Decarboxylasen sind in ihrer Wirkung von der Anwesenheit von zweiwertigen Kationen ( $\text{Mn}^{++}$  oder  $\text{Mg}^{++}$ ) abhängig. Die Tatsache, daß unser Enzym durch Komplexe nicht gehemmt wird, könnte darauf hinweisen, daß bei der katalysierten Reaktion solche anorganischen Effektoren keine Rolle spielen. Dem muß allerdings entgegengehalten werden, daß vor kurzem *Scrutton et al.*<sup>11</sup> über die Pyruvatcarboxylase (EC 6.4.1.1.) aus Leber berichteten, daß dieses Enzym fest gebundenes nicht austauschbares Mangan enthält, welches für die  $\text{CO}_2$ -Übertragung erforderlich ist. Die Reaktion wird durch „mehrzählige“ Komplexbildner wie Äthylendiamintetraessigsäure nicht gehemmt.

Die vorliegende Arbeit wurde durch Förderungsbeiträge der Ludwig Boltzmann-Gesellschaft, Wien, in großzügiger Weise unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen. Einer von uns (*P. D.*) dankt dem Theodor Körner-Stiftungsfonds für einen Förderungspreis.

<sup>11</sup> *M. C. Scrutton, M. F. Utter und A. S. Mildvan, J. Biol. Chem. 241, 3680 (1966).*