

УДК 577.125.8

БИОХИМИЯ

Л. В. МЕТЛИЦКИЙ, О. Л. ОЗЕРЕЦКОВСКАЯ, О. Н. САВЕЛЬЕВА,
В. Д. БАЛИАУРИ, Д. И. СТОМ

УЧАСТИЕ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ И ПРОДУКТОВ ЕЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ В ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЯХ КАРТОФЕЛЯ ПРОТИВ RHIZOCTHORA INFESTANS

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 III 1971)

Защитная роль системы полифенолы — полифенолоксидаза в явлениях фитонимунитета является важной проблемой современной науки. Тем не менее еще мало экспериментальных данных о степени фунгитоксичности отдельных полифенолов в ходе их ферментативного окисления.

Нами изучалась фунгитоксичность продуктов окисления широко распространенной в растениях кофейной кислоты⁽¹⁾, которые образуются в ходе ее ферментативного превращения полифенолоксидазой (ПФО).

Белковый препарат, обладающий ПФО-активностью, получали из клубней картофеля сорта Либидон⁽²⁾. В качестве субстрата использовали кристаллическую кофейную кислоту (Schuchard, Мюнхен). Активность окисления кофейной кислоты полученным белковым препаратом контролировали на 1% (ПФО) по сравнению с контролем при 290 мн. Реакционная смесь содержала 80 мкг кофейной кислоты, 160 мкг белкового препарата в фосфатном буфере 0,05 М, pH 6,8 в общем объеме 4 мл. Белковый препарат в количестве 1 мкг обладал способностью превращать 0,4 мкмоль кофейной кислоты за первые три минуты ферментативной реакции.

Реакционную смесь для определения фунгитоксичности продуктов ферментативного окисления кофейной кислоты содержала 3 мкг кофейной кислоты, 1 мкг препарата белка в фосфатном буфере 0,05 М, pH 6,8 в общем объеме 3 мл. Поинишем реакции считали момент добавления кофейной кислоты в оставшийся реакционный смеси. Процесс ферментативного окисления останавливали через различные интервалы. Прекращение реакции достигалось добавлением двойного объема этилового спирта и последующим быстрым усаждением образовавшегося осадка фермента.

Продукты, образующиеся на различных этапах ферментативного окисления, хроматографировали. Использовали нисходящую хроматографию на бумаге (ленинградская средняя), предварительно промытой этиловым спиртом и растворителем, которым служила смесь: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (40:10:20 по объему). Разделение осуществляли трижды: до $\frac{1}{2}$, до $\frac{2}{3}$ и до конца хроматограммы. Проявителем служила смесь: 1% FeCl₃ и 1% K₃Fe(CN)₆ в отношении 1:1.

Суммарные продукты, возникающие на различных стадиях окисления, испытывали на фунгитоксичность. С этой целью продукты реакции в количестве 0,03 мл наносили на поверхность покровного стекла и высушивали. Затем на предметное стекло помещали водную каплю (объем 0,01 мл), содержащую конидии *Fusarium solani*, которую накрывали покровным стеклом. Таким образом, концентрация в расчете на исходную кофейную кислоту составляла $0,3 \cdot 10^{-5}$ мол/мл. Через 18 час. (при $T = 18^\circ$) конидии прорастали. Число проросших конидий и длину гиф учитывали, просматривая под микроскопом⁽³⁾.

Согласно полученным данным, происходило заметное возрастание фунгитоксичности в первую минуту ферментативного окисления кофейной

УДК 577.125.8

БИОХИМИЯ

Л. В. МЕТЛИЦКИЙ, О. Л. ОЗЕРЕЦКОВСКАЯ, О. Н. САВЕЛЬЕВА,
В. Д. БАЛИЛУРИ, Д. И. СТОМ

УЧАСТИЕ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ И ПРОДУКТОВ ЕЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ В ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЯХ КАРТОФЕЛЯ ПРОТИВ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 III 1971)

Защитная роль системы полифенолов — полифенолоксидаза в явлениях фитоиммунитета является важной проблемой современной науки. Тем не менее еще мало экспериментальных данных о степени фунгитоксичности отдельных полифенолов в ходе их ферментативного окисления.

Нам изучалась фунгитоксичность продуктов окисления широко распространенной в растениях кофейной кислоты⁽¹⁾, которые образуются в ходе ее ферментативного превращения полифенолоксидазой (ПФО).

Безводный препарат, обладающий ПФО-активностью, получали из клубней картофеля сорта Любимец⁽²⁾. В качестве субстрата использовали кристаллическую кофейную кислоту (Schubert, Мюнхен). Активность окисления кофейной кислоты полученным белковым препаратом контролировали в 0,05 М фосфатном буфере при 290 мк. Реакционная смесь содержала 80 мкг кофейной кислоты, 160 мкг белкового препарата в фосфатном буфере 0,05 М, pH 6,8 в общем объеме 4 мл. Белковый препарат в количестве 1 мкг обладает способностью превращать 0,4 ммоля кофейной кислоты за первые три минуты ферментативной реакции.

Реакционная смесь для определения фунгитоксичности продуктов ферментативного окисления кофейной кислоты содержала 3 мг кофейной кислоты, 1 мкг препарата белка в фосфатном буфере 0,05 М, pH 6,8 в общем объеме 4 мл. Началом реакции считали момент добавления кофейной кислоты к реакционной смеси. Пресее ферментативного окисления останавливали через различные интервалы. Прекращение реакции достигалось добавлением двойного объема этилового спирта и последующим быстрым укладением образовавшегося осадка фермента.

Продукты, образующиеся на различных этапах ферментативного окисления, хроматографировали. Использовали нисходящую хроматографию на бумаге (целилаградская средняя), предварительно промытой этиловым спиртом и растворителем, которым служила смесь: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (40:40:20 по объему). Разделение осуществляли трижды: до $\frac{1}{2}$, до $\frac{2}{3}$ и до конца хроматограммы. Проявителем служила смесь: 1% FeCl_3 и 1% $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ в отношении 1:1.

Суммарные продукты, возникающие на различных стадиях окисления, испытывали на фунгитоксичность. С этой целью продукты реакции в количестве 0,03 мл наносили на поверхность покровного стекла и высушивали. Затем на предметное стекло помещали водную каплю (объем 0,01 мл), содержащую конидии *Fusarium solani*, которую накрывали покровным стеклом. Таким образом, концентрация в расчете на исходную кофейную кислоту составляла $0,3 \cdot 10^{-5}$ мол/мл. Через 18 час. (при $T = 18^\circ$) конидии проросли. Число проросших конидий и длину гиф учитывали, просматривая под микроскопом⁽³⁾.

Согласно полученным данным, происходило заметное возрастание фунгитоксичности в первую минуту ферментативного окисления кофейной

кислоты препаратом ПФО, выделенным из здоровой ткани (рис. 1). При дальнейшем окислении токсичность образующихся продуктов мало отличалась от исходной кофейной кислоты, а продукты, образующиеся на втором и третьем часу реакции, даже уступали ей по степени фунгитоксичности.

По сравнению с препаратом ПФО, выделенным из здорового клубня, значительно большей активностью обладает препарат, выделенный из прираневой ткани* (1 мг его превращал 0,66 μ моля кофейной кислоты за первые 3 мин. окисления (рис. 1)). Характер кривой испытания фунгитоксичности при использовании обоих препаратов был сходным, однако у препарата из прираневой ткани он был выражен более четко, что, очевидно, связано с его большей активностью. Можно полагать, что ход ферментативного окисления кофейной кислоты в здоровой и механически поврежденной ткани один и тот же, а различие заключается в скорости окисления. Такого рода данные были получены нами для хлорогеновой кислоты (*).

Очень короткий период существования продуктов окисления кофейной кислоты, обладающих сравнительно небольшой фунгитоксичностью, не позволил уловить их на хроматограммах и, тем более, измерить их истинную токсичность описанным выше методом. В связи с этим мы применили новую методику определения фунгитоксичности. Ее отличие состояло в том, что конидии *F. solani* присутствовали в реакционной среде во время ферментативного окисления и, следовательно, все соединения, даже обладающие коротким периодом жизни, должны были в той или иной мере оказать влияние на последующее прорастание спор паразита. После определенной экспозиции конидии осаждали центрифугированием (5 мин. при 3000 g), трижды промывали водой и проращивали в каплях воды. Таким образом, учитывалось последствие непосредственного соприкосновения конидий с образующимися продуктами ферментативного окисления. Контролем к этим определениям служил рост конидий, предварительно выдержанных в присутствии буфера, препарата ПФО, но без кофейной кислоты. Выдерживание конидий в течение 2 час. в присутствии кофейной кислоты без ПФО заметно подавило рост инфекционных гиф** (рис. 2, I). Но более сильное ростингибирующее действие было обнаружено при выдерживании паразита в среде, где происходило ферментативное окисление кофейной кислоты, — после двухчасового пребывания в ней конидии полностью лишились способности прорасти.

Сокращение времени инкубирования (наряду с уменьшением концентрации кофейной кислоты до $0,33 \cdot 10^{-5}$ мол/мл) показало, что 5-минутное пребывание конидий в среде, где происходило ферментативное окисление, на 66% прекратило их последующий рост (рис. 2, II). Присутствие конидий в течение получаса подавило длину инфекционных гиф уже на 85%. Однако дальнейшее возрастание времени инкубирования (до 1 ча-

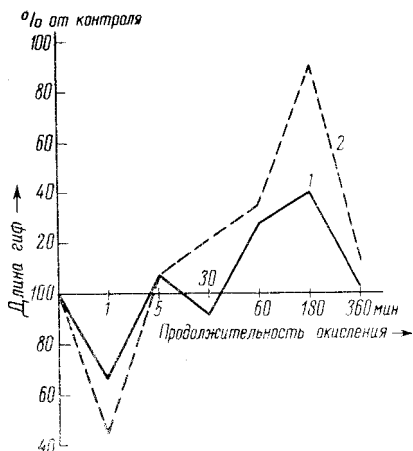


Рис. 1. Фунгитоксичность продуктов ферментативного окисления кофейной кислоты препаратами ПФО из здоровой (1) и прираневой (2) ткани. За 100% принимали рост гиф в присутствии кофейной кислоты без ПФО

* Прираневой мы называем слой ткани в 1 мм, подлежащий раневой перидерме, образующейся на поверхности клубня через 4—5 дней после поранения.

** Следует заметить, что концентрация кофейной кислоты в этом опыте составляла $0,55 \times 10^{-5}$ мол/мл, т. е. несколько больше, чем в предыдущем определении.

са, считая от начала окисления) почти не сказалось на подавлении роста патогена (85% ингибирования при 30 мин. и 90% при часовом инкубировании).

Поскольку в предыдущем определении было обнаружено, что ингибирующее действие продуктов окисления первых этапов сменяется затем

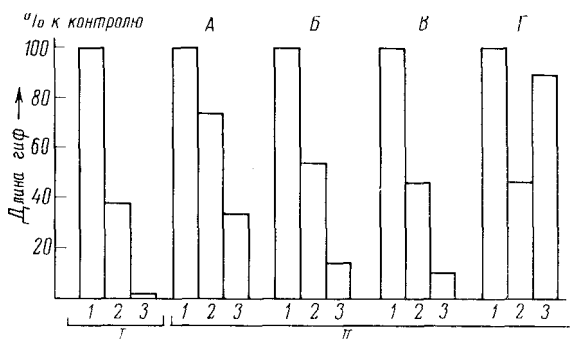


Рис. 2. Рост *F. solani*. I — конидии присутствовали во время ферментативного окисления кофейной кислоты при концентрации $0,55 \times 10^{-5}$ мол/мл в течение 2 час. и II — при концентрации $0,33 \times 10^{-5}$ мол/мл в течение первых 5 мин. от начала окисления (А), 30 мин. (Б), первого часа (В), от первого до второго часа (Г). Состав смеси: 1 — ПФО + буфер, 2 — кофейная кислота + буфер, 3 — кофейная кислота + ПФО + буфер

их стимулирующим действием, в следующем варианте опыта конидии паразита добавляли в реакционную среду в конце первого часа. Оказалось, что пребывание конидий в течение второго часа не только не подавило их активности, а, наоборот, даже стимулировало их рост (по сравнению с конидиями, находящимися на растворе кофейной кислоты без ПФО). Здесь, как и в первом опыте, токсичность настолько ослабевает, что конидии растут почти так же, как и на воде. Таким образом, двумя различными методами были получены доказа-

тельства образования нетоксических продуктов на поздних этапах ферментативного окисления кофейной кислоты.

В следующем опыте конидии *F. solani* инкубировали в течение 10 мин., но в различные интервалы с начала ферментативного окисления: от 0 до 10 мин., от 30 до 40 мин., от 60 до 70 мин. и, наконец, от 120 до 130 мин. (рис. 3). Как и следовало ожидать, 10-минутное пребывание конидий гриба в реакционной среде оказалось достаточным для того, чтобы заметно подавить их последующую способность к прорастанию, но чем ближе к началу реакции было время инкубирования, тем в большей степени обнаруживалось подавление роста патогена. Наибольшее ингибирование оказывали продукты, образующиеся в интервале от 0 до 10 мин. и наименьшее от 120 до 130 мин.

Представляется вполне возможным, что начальными продуктами ферментативного окисления кофейной кислоты, обладающими наиболее высокой фунгитоксичностью, являются хиноны или близкие к ним соединения.

В связи с этим при помощи модифицированного метода Пьерпоинта⁽³⁾ нами было получено устойчивое производное бензосульфоновой кислоты. О возникновении этого соединения свидетельствует его R_f в БУВ, свечение в у.-ф. свете, и.-к. спектр, молекулярный вес и точка плавления*.

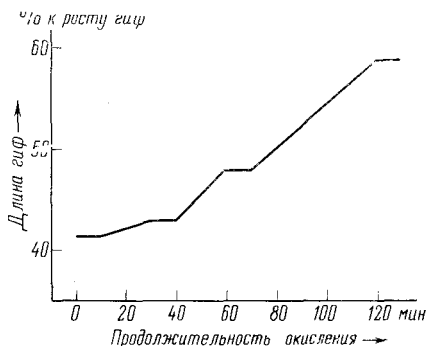


Рис. 3. Рост *F. solani*, конидии которого присутствовали в течение 10 мин. на разных этапах окисления кофейной кислоты

* Л. В. Метлицкий, О. Н. Савельева, О. Л. Озерецковская, В. Д. Балиаури, Д. И. Стом, С. С. Тимофеева, Сборн. Иммуитет и покой растений, «Наука» (в печати).

Антимикробная активность хинонов может быть объяснена их взаимодействием с клеточными белками и аминокислотами, кофакторами ферментов, изменением потенциала клетки, а также целым рядом иных нарушений, которые вызывают в организации клетки эти крайне реакционноспособные соединения (⁶, ⁷). Хиноны, образующиеся в процессе ферментативного окисления, могут реагировать с концевыми первичными аминогруппами, вторичными аминами и тиоловыми группами (⁸). Всего этого, по-видимому, достаточно, чтобы ингибировать рост *F. solani*, находящегося даже в покоем состоянии и окруженного плотной оболочкой*. Возможно, что при этом происходит и нарушение проницаемости оболочки по аналогии с мембранами эритроцитов. Так, было показано, что фенолаза катализирует окисление остатков тирозина на мембранах эритроцитов, вызывая тем самым нарушения в их проницаемости и лизис эритроцитов (⁹).

Поскольку все приведенные данные получены в опытах *in vitro*, возникает необходимость в детальном изучении тех продуктов окисления кофейной кислоты, которые возникают непосредственно в поврежденной клетке растения-хозяина в ответ на проникновение паразита. К изучению этого вопроса и привлечено сейчас наше внимание.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
26 III 1971

Иркутский государственный университет

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Tomaszewski, Bull. Acad. Polon. Sci., 8, № 2, 61 (1960). ² А. П. Николаева, О. Н. Савельева и др., Сборн. Биохимия иммунитета и покоя растений, «Наука», 1969. ³ О. Л. Озерецковская, Н. И. Васюкова, М. А. Давыдова, Прикл. биохим. и микробиол., 4, 6 (1968). ⁴ О. Н. Савельева, В. Д. Баляури, О. Л. Озерецковская, Прикл. биохим. и микробиол., 8, № 2 (1972). ⁵ W. S. Pierpoint, Biochem. J., 98, 567 (1966). ⁶ O. Hoffman-Ostenhof, In: Metabolic Inhibitors II, Ch. 22, N. Y., 1963, p. 145. ⁷ J. L. Webb, Guinones, Enzymes and Metabolic Inhibitors, 3, N. Y., 1966, p. 421. ⁸ H. S. Mason, E. W. Peterson, Biochem. et biophys. acta, 111, 134 (1965). ⁹ Y. G. Cory, J. Biol. Chem., 242, 218 (1967).

* Не приходится сомневаться, что воздействие хинона на *Phytophthora infestans* будет более сильным, поскольку зооспоры этого патогена на первых этапах развития представляют собой голые протопласты.