

УДК 576.858.77

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ю. Н. КАРАСЕВИЧ, В. С. ИВОЙЛОВ, А. Е. ОРЕШКИН, Э. Г. СУРОВЦЕВА

**ОКСИГИДРОХИНОН — ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ
ПОДГОТОВИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПАРАОКСИБЕНЗОЙНОЙ
КИСЛОТЫ У ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA TROPICALIS***

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 13 IV 1976)

В 1975 г. было показано, что бесклеточные экстракты дрожжей *Candida tropicalis*, штамм СД5, адаптированных к параоксисбензойной кислоте (ПОВК) как единственную источнику углерода и энергии в среде Ридер, катализируют реакцию превращения протокатеховой кислоты (ПКК) только в присутствии НАД-Н или НАДФ-Н. Был сделан вывод, что наиболее вероятным продуктом этой реакции является пирокатехин ⁽¹⁾. Это допущение сделали на основании публикаций о метаболизме ПОВК *Aerobacter aerogenes* и некоторыми дрожжами рода *Debaryomyces* ^(2, 3), а также заметной активностью пирокатехаза (КФ 1.13.11.1) в исследованных экстрактах. Не исключалось, однако, что продуктом реакции может быть оксигидрохинон ⁽⁴⁾.

Сомнения в том, что продуктом реакции является пирокатехин, появились у нас после того, как было установлено, что описанный фермент ведет себя как гидроксилаза (монооксигеназа). В частности, установили, что скорость реакции заметно возрастает при добавлении ФАД или при аэрации и что ФАД предохраняет фермент от инактивации при его очистке. Эти наблюдения объясняют потребность в НАД-Н или НАДФ-Н.

При гидроксилировании ПКК могут образоваться либо оксигидрохинон, либо одна из триоксикислот (галловая, пирогаллолкарбоновая, оксигидрохинонкарбоновая) в зависимости от участка окисления в молекуле ПКК.

В данном сообщении приведены доказательства, что основным продуктом реакции гидроксилирования ПКК является оксигидрохинон.

Дрожжи выращивали в среде Ридер, содержащей 0,2% ПОВК. Клетки центрифугировали, промывали 0,05 М калий-фосфатным буфером pH 7,1, замораживали и разрушали с помощью гидравлического пресса. Экстракт центрифугировали при 27 000 g 15 мин. К надосадочной жидкости добавляли 0,2 объема 4% раствора протаминсульфата и после выпадения осадка повторно центрифугировали (метод № 1).

По методу № 2 клеточную пасту наносили слоем в 2–3 мм на стеклянную пластинку и высушивали 3 суток при 28°. Сухие клетки переносили в 0,05 М буфер, pH 7,15, и оставляли на 18 час. при температуре 18–20°. Отношение буфер : сухие клетки — 4 : 1 по весу. Дальнейшая обработка экстракта аналогична описанной для метода № 1.

Опыты по накоплению продукта реакции проводили в следующей системе (в мкмольях на 1 мл): калий-фосфатный буфер, pH 7,18, 50; НАДФ-Н или НАД-Н 3,5; ПКК 3,2; ФАД 0,07. Экстракт 0,1–0,15 мм. Иногда в систему вносили 3,5 мкмол/мл глюкозо-6-фосфата для регенерации НАДФ-Н. В этом случае содержание НАДФ-Н в системе снижали до 0,15 мкмол/мл.

Через определенные промежутки времени отбирали пробы и обрабатывали равным объемом 0,33 N хлорной кислоты. Денатурированный бе-

Таблица 1

Идентификация продукта превращения протокатеховой кислоты методами спектрометрии

Исследуемое соединение	У.-ф. спектрофотометрия (λ_{max} , нм)		Флуоресцентная спектрофотометрия (λ , нм)	
	в эфире	в воде	возбуждение	флуоресценция
Пирокатехин	279	276	282	314
Оксигидрохинон	295	290	290	340
Продукт реакции	295	290	290	340

Примечание. Спектр флуоресценции определяли при pH 2,2 (°).

Таблица 2

Идентификация продукта превращения протокатеховой кислоты методом хроматографии

Исследуемое соединение	R_f в системах растворителей		Поглощение в У.-ф.	Окраска пятна после проявления		
	кислая	нейтральная		диазотированным п-нитроанилином	хлорным железом	фосфорномолибденовой кислотой
Пирокатехин	0,66	0,92	Сильное	Кирпичный	Темно-синий	Оливковый
Оксигидрохинон	0,30	0,79	Слабое	Светло-коричневый	Коричневый	Серо-синий
Продукт реакции	0,30	0,79	Слабое	Светло-коричневый	Коричневый	Серо-синий

лок удаляли центрифугированием и доводили pH до 2,3, внося углекислый калий. Часть образца брали для теста Ротера (4), а остаток экстрагировали два раза тремя объемами эфира для исследования у.-ф. спектров и хроматографии. В некоторых опытах экстракцию эфиром проводили непосредственно из реакционной смеси без внесения хлорной кислоты. Эфир высушивали Na_2SO_4 , упаривали и исследовали образовавшиеся продукты. У.-ф. спектры снимали на приборе «Specord UV—VIS». Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Силуфол» UV-254 в двух системах: кислой (бензол : метанол : уксусная кислота, 45:8:4) и нейтральной (петролейный эфир т. кип. 70°: этилацетат, 3:1).

Хроматограммы проявляли диазотированным п-нитроанилином, 1-процентным раствором FeCl_3 в этаноле и 2-процентным раствором фосфорномолибденовой кислоты в воде (5). Максимумы спектров флуоресценции определяли в спектрофлуорометре Хитачи, модель MPF-2A по Гранту и Петелю (6).

При внесении в реакционную смесь, содержащую НАДФ-Н, экстракта клеток, приготовленного по методу № 1, промежуточные продукты реакции в заметном количестве не накапливались, но быстро появлялось соединение, дающее положительный тест Ротера, что говорит о накоплении β -кетокислоты (7).

Если в этой реакции вместо НАДФ-Н берется НАД-Н, то накапливается оксигидрохинон. При работе с экстрактом, полученным по методу № 2, в присутствии обоих кофакторов ПКК быстро превращается в оксигидрохинон. Ни разу не удалось обнаружить даже следов пирокатехина (табл. 1 и 2). Не удалось также установить наличие триоксикислот. Следовательно, основным продуктом превращения ПКК экстрактами дрож-

жей *S. tropicalis*, адаптированных к ПОБК, является оксигидрохинон. Можно считать установленным, что ПКК является промежуточным продуктом подготовительного метаболизма ПОБК у этих дрожжей. Во-первых, они имеют активную гидроксилазу ПОБК (КФ 1.14.13.2) ⁽¹⁾; во-вторых, после адаптации к ПОБК эти дрожжи начинают утилизировать ПКК как единственный источник углерода и энергии.

Оксигидрохинон также является промежуточным продуктом подготовительного метаболизма ПОБК. Во-первых,— это единственный легко идентифицируемый продукт гидроксирования ПКК у *S. tropicalis*. Во-вторых, в определенных условиях оксигидрохинон в ходе опыта исчезает, а накапливается продукт, дающий положительный тест Ротера. В-третьих, эти дрожжи способны утилизировать гидрохинон и резорцин в качестве единственных источников углерода и энергии. Считается, что эти два фенола при гидроксировании также переходят в оксигидрохинон ⁽⁸⁾.

Следовательно наличие ферментов дальнейшего метаболизма оксигидрохинона у этих дрожжей не вызывает сомнения.

Подготовительный метаболизм ПОБК через оксигидрохинон у микроорганизмов до настоящего времени, насколько нам известно, не описан. Не была описана также гидроксилаза, катализирующая окислительное декарбоксилирование протокатеховой кислоты в оксигидрохинон, хотя гидроксилазы подобного типа известны. В частности, сходную реакцию катализирует гидроксилаза салициловой кислоты (КФ 1.14.13.1) с образованием пирокатехина ⁽⁹⁾.

Описанная нами гидроксилаза не катализирует окисление салициловой кислоты в пирокатехин.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
12 IV 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ю. Н. Карасевич, ДАН, т. 222, № 3, 723 (1975). ² J. C. Patel, D. J. W. Grant. Aut. van Leeuw., v. 35, № 1, 53 (1969). ³ R. B. Cain, R. F. Bilton, J. A. Darrah, Biochem. J., v. 108, № 57, 797 (1968). ⁴ Data for Biochem. Research, R. M. C. Dawson, D. C. Elliott et al. (Ed.), 1962, p. 287. ⁵ А. А. Ахрем, А. И. Кузнецова, Тонкослойная хроматография, М., «Наука», 1965. ⁶ D. J. W. Grant, J. C. Patel, Anal. Biochem., v. 28, № 1—3, 139 (1969). ⁷ R. Y. Stanier, N. S. Palleroni, M. Doudoroff, J. Gen. Microbiol., v. 43, № 1, 159 (1966). ⁸ H. Y. Neujahr, J. M. Varga, Europ. J. Biochem., v. 13, № 1, 37 (1970). ⁹ M. Katagiri, H. Maeno et al., J. Biol. Chem., v. 240, № 8, 3414 (1965).