

М. Я. ВИТОЛ, С. Р. ВИЛКС, И. М. ЗАБАРОВСКА, Х. А. МАУРИНЯ

**ТРАНСФОРМАЦИЯ ТИМИНА ДРОЖЖАМИ
RHODOTORULA GLUTINIS (FRES) HARRISON**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 20 XI 1969)

В настоящее время известны только два основных пути катаболизма тимина микроорганизмами: а) путем окисления, через стадию 5-метилорбарбитуровой кислоты; б) гидрированием, через стадию дигидротимина (1, 2).

Есть данные о возможности превращения тимина бесклеточными экстрактами гриба *Neurospora crassa* (3-5) и клетками печени млекопитающих (6) в 5-оксиметилурацил и урацил-5-карбоновую кислоту. Эти превращения в данных работах рассматриваются как промежуточный этап биосинтеза пиримидиновых соединений, входящих в состав нуклеиновых кислот.

Возможность катаболизма тимина через стадию урацила клетками *No-cardia corallina* предполагал Лара (7). Но получить повторно подтверждающие это данные ему не удалось (8).

Данных о химизме превращения тимина развивающимися культурами дрожжей в литературе нам найти не удалось. Известно, что тимин, как единственный источник азота, используется дрожжами хуже других пуриновых и пиримидиновых оснований (9, 10).

Мы поставили цель исследовать превращения тимина дрожжами в условиях использования его в качестве основного источника питания.

Культура дрожжей, способная использовать тимин, выделена из почвы при помощи метода накопительных культур, на среде с тимином как единственным источником азота (состав среды, %: KH_2PO_4 0,05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01, $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01, сахара 10, дрожжевой автолизат 0,01 %). По определителю Лоддер и Кригер ван Рий, данная культура относится к *Rhodotorula glutinis* (Fres) Harrison (11).

Для исследования превращения тимина дрожжи культивировались в среде Ридер (12), в которой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ замещен тимином в концентрации 0,1 %. Для обеспечения роста к среде добавлялась смесь шести витаминов группы В (12). Инкубацию проводили при 27° в условиях принудительной аэрации (колбы емкостью 300 мл, содержащие по 50 мл среды, встряхивались на качалке при 100 об/мин). Пробы отбирались через каждые 12 час. Прирост биомассы определялся нефелометрически. Для исследования химических изменений использовалась культуральная жидкость после удаления дрожжевых клеток центрифугированием. Изменения определялись при помощи методов восходящей хроматографии на бумаге и электрофореза. Применявшиеся хроматографические системы и электролиты указаны в табл. 1.

Пиримидиновые производные обнаруживались на хроматограммах и фореграммах по поглощению у.-ф. лучей. Для определения возможных дигидропиримидинов хроматограммы обрабатывались 0,5 N NaOH и проявлялись *n*-диметиламинобензальдегидом. При количественном анализе культуральной жидкости идентификация отдельных компонентов проводилась путем прямого сравнения их с образцами заведомо известных структур. Установление химической структуры новых у.-ф. поглощающих соединений производилась после их выделения и очистки при помощи препара-

тивной хроматографии на бумаге. Физико-химические константы этих соединений определялись при помощи распределительной хроматографии, электрофореза и у.-ф. спектрофотометрии.

Нами установлено, что во время развития данной культуры дрожжей на среде с тимиамином в культуральной жидкости наблюдается постепенное исчезновение тимина. Это сопровождается значительным накоплением двух новых поглощающих у.-ф. лучи соединений — A_1 и A_2 . Изучение некоторых вышеупомянутых физико-химических свойств позволило иденти-

Таблица 1

Некоторые физико-химические константы исследованных соединений

Соединение	R_f в разных системах*				Э. п. $\times 10^3$ при pH 9,24** см /в-сек	У.-ф. поглощение, мр	
	1	2	3	4		pH 1	pH 11
Тимин	0,79	0,62	0,75	0,76	+0,21***	264—233	291—244
5-оксиметилурацил	0,51	0,45	0,62	0,57	+0,22	262—232	284—246
A_1	0,51	0,45	0,62	0,57	+0,22	262—232	284—246
Урацил-5-карбоновая кислота	0,59	0,45	0,24	0,18	+2,7	273—239	291—256
A_2	0,59	0,45	0,24	0,18	+2,7	273—239	291—256

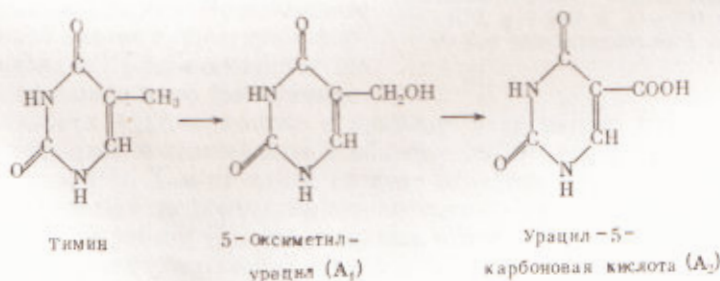
* 1 — этилацетат—уксусная кислота—вода (3:1:1); 2 — *n*-бутанол—уксусная кислота — вода (2:1:1); 3 — изопропанол — вода (7:3); 4 — изопропанол — 25% аммиак—вода (14:1:5).

** 0,05M Боратный буфер.

*** Знак + указывает на миграцию вещества к аноду.

фицировать соединение A_1 как 5-оксиметилурацил, а соединение A_2 — как урацил-5-карбоновую кислоту (см. табл. 1). Накопление последней во время развития дрожжей наблюдается также при замене в среде тимина 5-оксиметилурацилом. Накопление в культуральной жидкости тимина и 5-метилбарбитуровой кислоты во время опытов не обнаружено. Не обнаружено также появление указанных у.-ф. поглощающих соединений (A_1 и A_2) во время роста дрожжей *Rhodotorula glutinis* на среде, в которой тимин заменен неорганическим источником азота.

Таким образом, установлено, что появление новых у.-ф. поглощающих соединений (A_1 и A_2) в культуральной жидкости при развитии дрожжей *Rh. glutinis* на среде с тимиамином происходит в результате непосредственной трансформации тимина. По нашему мнению, трансформация осуществляется по следующему пути:



Указанная трансформация, очевидно, связана с катаболизмом тимина. Это подтверждают данные, полученные в эксперименте с меченым тимиамином-2- C^{14} . Трансформированные соединения A_1 и A_2 обладают одинаковой молярной удельной радиоактивностью по сравнению с тимиамином-2- C^{14} .

Хотя в нашем эксперименте накопление урацила установить не удалось, не исключено, что у данной культуры дрожжей дальнейшее расщепление урацил-5-карбоновой кислоты протекает путем декарбоксилирования че-

рез стадию урацила, подобно тому как это имеет место в случае декарбонирования урацил-4-карбоновой (оротовой) кислоты микроорганизмами родов *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Saccharomyces* и др. (¹³, ¹⁴).

Поиски в этом направлении нами продолжаются.

Латвийский государственный университет
им. П. Стучки
Рига

Поступило
4 XI 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. С. Звягинцева, М. Я. Витол и др., *Микробиологический синтез*, 4, 8 (1968). ² M. Luckner, C. Wasternack, *Die Pharmazie*, 22, 4 (1967). ³ M. T. Abbott, R. M. Fink, *Federat. Proc.*, 21, 377 (1962). ⁴ R. M. Fink, K. Fink, *Federat. Proc.*, 21, 377 (1962). ⁵ M. T. Abbott, R. J. Kadner, R. M. Fink, *J. Biol. Chem.*, 239, 156 (1964). ⁶ K. Fink, R. E. Cline et al., *J. Biol. Chem.*, 221, 425 (1956). ⁷ F. J. S. Lara, *J. Bacteriol.*, 64, 271 (1952). ⁸ F. J. S. Lara, *J. Bacteriol.*, 64, 279 (1952). ⁹ F. J. DiCarlo, A. S. Schultz, A. M. Kent, *J. Biol. Chem.*, 199, 333 (1952). ¹⁰ T. A. LaRue, J. F. T. Spencer, *Canad. J. Microbiol.*, 14, 79 (1968). ¹¹ J. Lodder, N. J. F. Kregger-van Rij, *The Yeasts*, Amsterdam, 1952. ¹² Е. Н. Одинцова, *Микробиологические методы определения витаминов*, М., 1959. ¹³ M. Kulhanek, E. Svatek, M. Tadra, *Folia Microbiol.*, 10, 442 (1965). ¹⁴ М. Я. Витол, В. Н. Шапошников, Ю. П. Швачкин, *ДАН*, 174, № 5, 1202 (1967).