

УДК 633.12:[615.356+577.152.141](476)

**$\alpha$ -ТОКОФЕРИЛХИНОН И НАД<sup>+</sup> СОЧЕТАННО  
И РАЗДЕЛЬНО РЕГУЛИРУЮТ СООТНОШЕНИЕ  
L- И D-ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗ У ДРОЖЖЕЙ  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

**В.И. Дудин<sup>1</sup>, А.С. Ушаков<sup>1</sup>, С.В. Грищук<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> – ГНУ ВНИИ физиологии, биохимии и питания  
сельскохозяйственных животных,  
г. Боровск, Калужская область, РФ

<sup>2</sup> – УО «Гродненский государственный аграрный университет»,  
г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 16.07.2014 г.)

**Аннотация.** В опытах с инкубированием используемых в качестве модельной системы жизнеспособных сухих штаммов быстродействующих пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в неполной среде с лактатом лития подтвердилось, что при добавке  $\alpha$ -токоферилхинона происходит синтез только L-лактатдегидрогеназы, тогда как D-лактатдегидрогеназа в этом случае не синтезируется. Показана возможность изменения изомерного состава молочной кислоты за счет отдельных и сочетанных добавок  $\alpha$ -токоферилхинона и НАД в питательную среду. Применение окисленных дрожжей приводит под действием  $\alpha$ -токоферилхинона к ускорению брожения на участке глюкоза-этанол. Этот эффект подтверждается и на более узком участке последовательности (пируват-ацетальдегид), когда в качестве исходного субстрата применяют пируват. Согласно нашим неопубликованным исследованиям местом приложения функции  $\alpha$ -токоферилхинона может являться нерепрессируемая глюкозой алкоголь-дегидрогеназа I из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

**Summary.** Experiences with incubating used as model system of viable dry strains of high-speed baking yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the incomplete environment with lithium lactate confirmed that with addition of  $\alpha$ -tokoferilchinon there is a synthesis only of L-lactatdehydrogenase whereas D-lactatdehydrogenase in this case isn't synthesized. The possibility of variation of isomeric structure of milk acid due to separate and combined additives  $\alpha$ -tokoferilchinon and NAD in a nutrient medium is shown. Under  $\alpha$ -tokoferilchinon influence the application of the oxidized yeast results to the acceleration of fermentation on a site with glucose-ethanol. This effect is also confirmed on a narrower site of a sequence (piruvat-acetaldehyde) when piruvat is used as an initial substratum apply. According to our unpublished researches alcohol-dehydrogenase I of *Saccharomyces cerevisiae* yeast not subjected to repression by glucose can be a place of application of  $\alpha$ -tokoferilchinon function.

**Введение.**  $\alpha$ -Токоферилхинон широко распространен в фотосинтезирующих водорослях и высших растениях [1]. У растений он лока-

лизован в оболочке хлоропластов [2] и, по-видимому, участвует в транспорте электронов при фотосинтезе [3].  $\alpha$ -Токоферилхинон найден также в микроорганизмах [4], хотя долгое время присутствие токоферола и его производных у них отрицалось [5]. В настоящее время  $\alpha$ -токоферилхинон и  $\alpha$ -токоферилгидрохинон обнаружены в 56 из 93 обследованных штаммов микроорганизмов [6]. Известно, что  $\alpha$ -токоферилхинон является продуктом свободнорадикального окисления витамина Е ( $\alpha$ -токоферол) в организме животных и человека.

К настоящему моменту известно, что окисленная D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД, КФ 1.2.1.12) ускоряется [7] в связи с тем, что действует в обход фосфоглицераткиназной реакции, сопровождающейся пониженным выходом АТФ [8]. В наших опытах окисленные дрожжи под влиянием  $\alpha$ -токоферилхинона ускоряют образование пирувата из глюкозы [9]. Одновременно усиливается утилизация пирувата при его включении в смесь в качестве исходного субстрата для брожения. Обнаруженный нами феномен отличается от известного тем, что окисленные дрожжи ускоряют брожение только под влиянием  $\alpha$ -токоферилхинона. При добавлении в среду НАД<sup>+</sup>,  $\alpha$ -токоферилхинон вызывает резкое, статистически значимое уменьшение концентрации уксусного альдегида, сопровождающееся статистически достоверным усилением включения глюкозы в процесс брожения [10].

Настоящее исследование посвящено поиску связи между активностью  $\alpha$ -токоферилхинона и судьбой дрожжевых лактатдегидрогеназ. Большинство беспозвоночных преимущественно окисляют L-молочную кислоту, несколько видов моллюсков и несколько видов членистоногих, а также многощетинковые черви проявляют исключительно D-лактатдегидрогеназную активность [11]. Кишечная ишемия приводит к увеличению продукции лактата и желудочного внутримукозального парциального давления двуокиси углерода. В процессе развития сепсиса кишечная продукция D-лактата соотносится с желудочным внутримукозальным парциальным давлением углекислого газа. Такой зависимости для значений L-лактата и парциального давления обнаружено не было [12]. Активность L-лактатдегидрогеназы из покоящихся клеток *L. sakei* проявляется на ранних стадиях логарифмической фазы роста, а активность D-лактатдегидрогеназы на ее поздних стадиях [13]. Антимикробное действие против *E.coli* у L-лактата оказывается гораздо большим, чем у D-лактата. Несмотря на это, внутриклеточный pH и мембранные потенциалы L-лактата и D-лактата, обработанные клетки были похожими, и можно предположить, что эти факторы не участвуют в антимикробном действии L-лактата [14]. Было также показано, что присутствовало ин-

гибирование D-лактатом утилизации L-лактата у *S. oneidensis*, в результате чего имело место преимущественное использование D-изомера [15]. Как видно из литературы, стереоизомерия лактата имеет существенное значение для функции молочной кислоты. Поиск связей  $\alpha$ -токоферил-хинона с активностью дрожжевых лактатдегидрогеназ является основным смыслом предлагаемой работы. Стояла задача также изучить заингибированность дрожжевых лактатдегидрогеназ добавками в питательную среду отдельных или сочетанных доз  $\alpha$ -токоферилхинона и НАД. В 30-х гг. прошлого века Нойберг и Кобель [16] описали четвертую форму дрожжевого брожения, характерную для высушенных препаратов или бесклеточных экстрактов дрожжей. В этом случае метаболизм пирувата протекает медленно, а образование этанола и углекислого газа не происходит вовсе. В этом случае накапливается пируват и глицерин. В связи с этим мы запланировали контроль интактности дрожжевых препаратов при их отравлении азидом натрия. В качестве метаболической модели мы использовали «окисленные дрожжи» вместо «окисленного» препарата глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназы [8].

**Цель работы** – поиск связи  $\alpha$ -токоферилхинона с ускорением гликолитической последовательности пекарских дрожжей.

**Материал и методика исследований.** В качестве субстрата для брожения применяли литиевую соль D,L-лактата (Sigma, США) (90 мкмоль лактата лития в 1 см<sup>3</sup> воды).

Кроме того субстратом для брожения служили: D-глюкоза отечественного производства (90 мкмоль D-глюкозы в 1 см<sup>3</sup> воды), пировиноградная кислота (Sigma, США).  $\alpha$ -Токоферилхинон (0,20 мкмоль/см<sup>3</sup>) солибилизировали в воде с помощью детергента твин-20 или твин-80 в количестве 150 мг/образец. НАД в среде добавляли до конечной концентрации 2,74 мкмоль/см<sup>3</sup>. Концентрация азида натрия составляла 10<sup>-3</sup>М.

Через 12 минут от момента введения дрожжей (0,75 г/образец) проводили отбор проб исходных образцов, затем колбы вновь помещали на водяную баню с шейкером для дальнейшего инкубирования и отбора проб, присошедшего через 3.5; 7; 14; 24; 36; 48; 60; и в случае опыта с азидом натрия дополнительно через 72 и 84 часа после начала инкубирования, каждый раз по 5 см<sup>3</sup>. В качестве осадителя белка использовали мета-фосфорную кислоту (5 см<sup>3</sup> пробы + 1,25 см<sup>3</sup> 10% раствора НРО<sup>3</sup>). После этого пробы центрифугировали в рефрижераторной центрифуге К-24 («Janetzki», Германия) при 10000 г и +4°C.

Таблица 1 – Схема опытов

Опыты	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
1	2	3	4	5

Эксп. 1Л	ОС	ОС+αТх(0,2 мкМ)	ОС+НАД (2,74 мкМ)	ОС+НАД (2,74 мкМ)+ αТх(0,2мкМ)
Эксп. 2Л				
Подоп. 1	ОС	ОС+αТх(0,2мкМ)		
Подоп. 2	ОС+Вит. В <sub>2</sub> (0,1 мкМ)	ОС+Вит. В <sub>2</sub> (0,1мкМ)+αТх (0,2мкМ)		
Подоп. 3	ОС+Вит. В <sub>2</sub> (0,1мкМ) +НАД (2,74)	ОС+Вит.В <sub>2</sub> (0,1мкМ)+НАД (2,74мкМ)+ αТх(0,2мкМ)		
Эксп. 3Л	ОС	ОС+ αТх(0,2мкМ)	ОС+ αТх(0,2мкМ)+ Окислен. дрожжи +Твин- 20	ОС+αТх(0,2мкМ) + Окислен. дрож- жи+Твин-80
Эксп. 4Г	ОС	ОС+ αТх(0,2мкМ)	ОС+ Окислен. дрожжи+Твин-80	ОС+ αТх + Окис- лен. дрож- жи+Твин-80
Эксп. 4П	ОС	ОС+ αТх(0,2мкМ)	ОС + Окислен. дрожжи + Твин-80	ОС+ αТх + Окислен.дрож- жи+Твин-80

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Эксп. 5Г	ОС	ОС+ NaN <sub>3</sub> (10 <sup>-3</sup> М)	ОС+NaN <sub>3</sub> (10 <sup>-3</sup> М) + αТх(0,2 мкМ)	

**Примечание:** где ОС – основной состав, НАД – никотинамидадениндинуклеотид, αТх- α-токоферилхинон, вит. В<sub>2</sub>-рибофлавин. Л, Г, П – добавки субстрата в среду соответственно лактата лития (Л), D-глюкозы (Г) и пирувата (П). Во всех случаях концентрация веществ в среде рассчитана на 1 см<sup>3</sup>.

При постановке опыта 4 мы воспользовались стехиометрическим набором реагентов под товарным названием рибофлавинмононуклеотид (Фармстандарт: Рибофлавин мононуклеотид, г. Уфа, Россия), в котором смесь реагентов (рибофлавин, фосфат натрия, полугидрат хлоробутанола, трилон Б) запаяна в ампулы для инъекций.

Количество гидразонов пирувата в пробах определяли после их очистки с помощью тонкослойной хроматографии. Проводили синтез 2,4 динитрофенилгидразонов, их экстракцию толуолом, обратную экстракцию в водный раствор соды [17]. 2,4 динитрофенилгидразоны экстрагировали толуолом после нейтрализации 2 н. раствором соляной кислоты до кислой реакции (рН 4,0). Растворитель упаривали и в тонком слое силикагеля выделяли гидразон пирувата, используя в качестве носителя смесь 10% этанола в бензоле (Rf=0,50).

Уксусный альдегид выделяли в виде 2,4-динитрофенилгидразона

из толуольного раствора, оставшегося после удаления из него кислых 2,4-динитрофенилгидразонов пировиноградной кислоты. Толуол упаривали, 2,4-динитрофенилгидразоны уксусного альдегида выделяли с помощью двукратной хроматографии со свидетелем в тонком закрепленном слое силикагеля L («Lachema», Чешская Республика), используя бензол в качестве носителя. Гидразоны с силикагеля экстрагировали метанолом. Количество альдегида определяли при 340 нм с помощью спектрального колориметра Specol-11 («Carl Zeiss», Германия).

**Результаты исследований и их обсуждение.** На рисунке 1 (опыт 1Л) представлены данные, полученные при выделении 2,4-динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты методом тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках.

Концентрация пирувата в среде существенно зависела от добавок в питательную среду НАД<sup>+</sup> и/или  $\alpha$ -токоферилхинона. На графике пирувата проявился двойной максимум как следствие окисления, находящейся в среде смеси стереоизомеров под действием дрожжей S15C (OXY) (рис. 1a1). При этом добавка  $\alpha$ -токоферилхинона приводила к полной потере позднего максимума (второго от начала процесса), что можно расценивать как результат ингибирования активности одной из лактатдегидрогеназ (рис. 1a2). При включении в среду  $\alpha$ -токоферилхинона в присутствии экзогенного НАД<sup>+</sup> не проявляется первый максимум концентрации пирувата, а при добавке только НАД<sup>+</sup> – второй (рис. 1б). Из этого можно заключить, что НАД<sup>+</sup> и  $\alpha$ -токоферилхинон связаны между собой в регуляции лактатдегидрогеназной активности у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Для идентификации максимумов проявления стереоизомеров молочной кислоты в виде пирувата провели опыт 2Л с дрожжами S18C (01A). Судя по динамике пирувата, существование двух его максимумов, отмеченное, как следствие проявления активности лактатдегидрогеназ для штамма S15C (OXY) (рис. 1a1), подтверждается и для штамма S18C (01A).

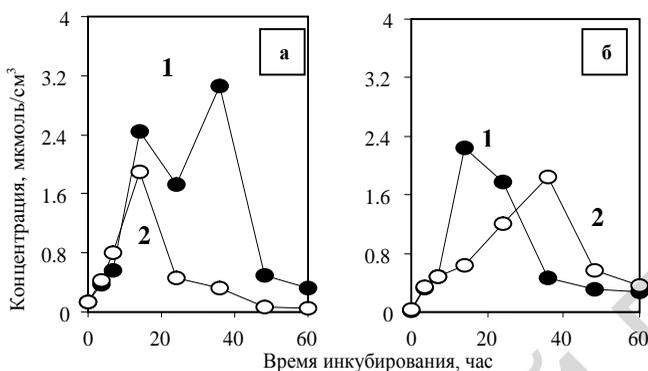


Рисунок 1 – Динамика концентрации пирувата при инкубировании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* S15C (OXY) в среде с лактатом ли-тия; опыт **а** состоял из вариантов ОС (1) (основной состав) и ОС+  $\alpha$ Tx(2) ( $\alpha$ -токоферилхинон); опыт **б** – из вариантов ОС+НАД<sup>+</sup>(1) и ОС+ НАД<sup>+</sup> +  $\alpha$ Tx (2) (опыт 1Л).

Не подтверждается лишь образование 14-часового максимума под влиянием добавок в среду  $\alpha$ -токоферилхинона, как это было в случае дрожжей S15C (OXY) (рис. 1а2). При этом идентификацию пиков стереоизомеров молочной кислоты можно провести по скорости синтеза изомеров (ранний максимум, 14 часов, принадлежит L-изомеру, а более поздний незавершенный – D-изомеру). Этот опыт мы провели для изучения влияния на эти процессы  $\alpha$ -токоферилхинона. На фоне введения в смесь рибофлавинмононуклеотида (РМН) без добавок хинона приводила к синтезу пирувата из лактата (рис. 2 б1). В то же время введение хинона в культуральную смесь с включенным в нее РМН блокировало появление пирувата (рис. 2 б2). Из рисунка 2в вытекает, что включение в среду НАД с добавкой  $\alpha$ -токоферилхинона или без нее приводило к ингибированию синтеза L-лактатдегидрогеназой и к полному блокированию синтеза пирувата D-лактатдегидрогеназой. В связи с этим из литературы известны результаты по ингибированию D-лактатом утилизации L-лактата у *S. oneidensis*, в результате чего усиливается преимущественное использование D-изомера [15]. В свою очередь оксалат и L-лактат относятся к ингибиторам D-лактатдегидрогеназы [18]. Лактатдегидрогеназная активность дрожжей зависит от стереохимии молочной кислоты. При этом создается впечатление, что тот или иной стереоизомер оказывается заблокированным определенной комбинацией НАД и  $\alpha$ -токоферилхинона.

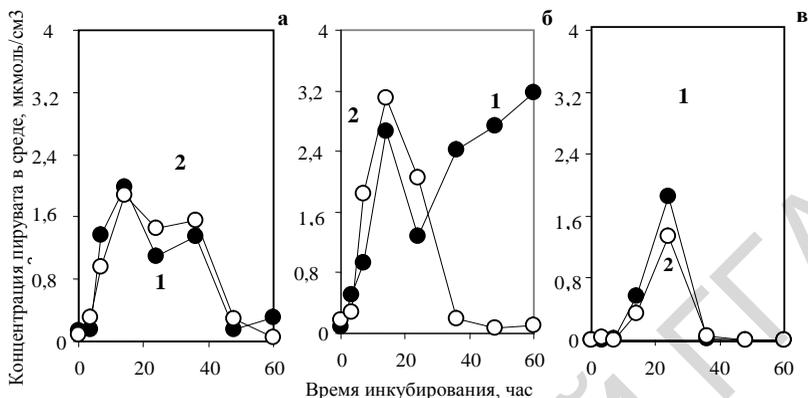


Рисунок 2 – Динамика концентрации пирувата при сбраживании лактата дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* S18C (01A); опыт а состоял из вариантов ОС(1) и ОС+  $\alpha$ Tx(2); опыт б – из ОС+РМН (рибофлавинмононуклеотид)(1) и ОС+РМН+  $\alpha$ Tx(2); опыт в – из ОС+ РМН + НАД (1) и ОС+РМН + НАД+  $\alpha$ Tx (2) (опыт 2Л).

Классические работы по изучению кинетических свойств лактатдегидрогеназ млекопитающих показали, что эти свойства специфичны в отношении L-(+)-лактата (мясомолочная кислота). Дрожжевая лактатдегидрогеназа (L-лактат: феррицитохром С оксидоредуктаза, КФ 1.1.2.3), идентичная цитохрому  $b_2$ , также обнаруживает субстратную стереоспецифичность. При этом фермент, катализирующий окисление D-формы (D-лактат: феррицитохром С оксидоредуктаза, КФ 1.1.2.4), существенно отличается от фермента, использующего L-лактат [19]. Специфическим субстратом для цитохрома  $b_2$  служит L-лактат. Фермент представляет собой бифункциональный тетрамер, каждая субъединица которого с молекулярной массой 55000 Да состоит из двух основных доменов – домена, включающего цитохром b и домена, содержащего флавинонуклеотид (FMN). Принято считать, что фермент переносит электроны от L-лактата к цитохрому С в следующем порядке [20]:

L-лактат ----  $b_2$  (FMN-содержащий домен) ----  $b_2$  (гемсодержащий домен) ---- цитохром С. Из флавоцитохрома  $b_2$  дрожжей *Hansenula anomala* был выделен гемсвязывающий домен, состоящий из 84-х аминокислотных остатков без серосодержащих аминокислот, 49 из них идентичны гемсвязывающему домену из *Saccharomyces cerevisiae*, а 28 – цитохрому  $b_5$  микросом печени крупного рогатого скота [21]. Путь электронов в дыхательную цепь от D-лактата к акцептору протекает поному: D-лактат ---- [ФАД-содержащий домен] ---- цитохром С.

Таким образом мы имеем дело с двумя независимыми источниками электронов: один от L-лактата переносит электроны на цитохром С, другой от D-лактата тоже переносит электроны на цитохром С. Мы изучили выделение пирувата из различных изомеров лактата в среду реакции в зависимости от времени инкубации (рис. 2, опыт 2Л).

Первичный поток электронов от L-лактат  $-2e =$  пируват + FMN(2e) + ГЕМ(2e) + Цит.С(2e) (дых. цепь).

Первичный поток электронов от D-лактат  $- 2e =$  пируват + FAD(2e) + Цит.С(2e) (дых. цепь).

Таким образом потоки электронов от L- и D- изомеров молочных кислот входят в дыхательную цепь через цитохром С. Вследствие этого можно исследовать в практической работе степень согласованности потоков электронов в дыхательную цепь с концентрацией FMN и FAD с концентрацией пирувата, выделяющегося из реакции в инкубационную среду (рис. 2, опыт 2Л).

Результаты опыта 1Л позволяют провести оценку ингибирования стереоизомеров молочной кислоты добавками НАД и  $\alpha$ -токоферилхинона отдельно и в сочетании.  $\alpha$ -Токоферилхинон и НАД сочетанно блокируют L-лактатдегидрогеназу, тогда как отдельно они блокируют D-лактатдегидрогеназу. Следует заметить, что описанные результаты в полной мере соответствуют только штамму S15C (OXY).

НАД-независимая D-лактатдегидрогеназа специфична в отношении D-лактата, но одновременно она способна восстанавливать хиноны с различными редокспотенциалами. Митохондриальная L-лактатдегидрогеназа также катализирует восстановление хинонов, но эта способность инактивируется в процессе экстракции с помощью детергентов, применяемых при выделении этих ферментов из растворов. Оба митохондриальных фермента ингибируются специфическим ингибитором-дифинилениодонидом [18]. Эти данные могут способствовать более осмысленной интерпретации результатов исследований, полученных при изучении дрожжевых лактатдегидрогеназ при введении в питательную среду  $\alpha$ -токоферилхинона.

На рисунке 3 (опыт 3Л), мы сравнили два родственных по структуре солибилизатора  $\alpha$ -токоферилхинона: твин-20 и твин-80. Постаревшие дрожжи отличались от контрольных тем, что старение приводит к замедлению скорости лактатдегидрогеназных реакций и к существенному увеличению количества и однородности (афинности) кинетических фракций молочных кислот. В опыте, когда  $\alpha$ -токоферилхинон солибилизировали за счет твина-80, полученный график заметно отличается от графика, полученного при солибилизации за счет твина-20. Без дополнительных исследований эти различия

интерпретировать пока не представляется возможным. Ясно одно, что старение дрожжей для солиubilизации  $\alpha$ -токоферилхинона является фактором, чрезвычайно изменяющим брожение молочных кислот.

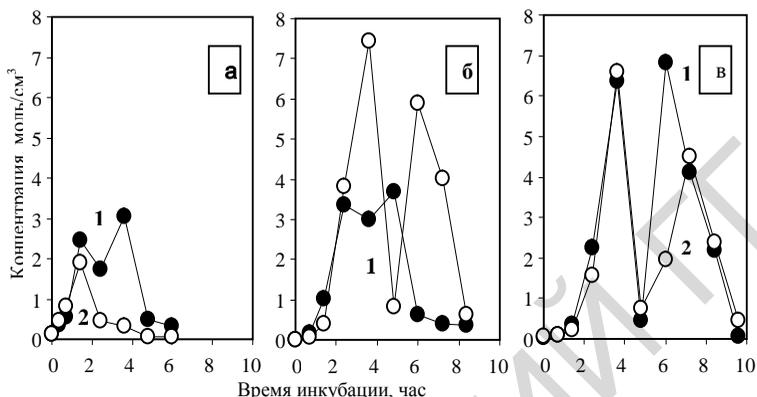


Рисунок 3 – Динамика концентрации пирувата при инкубации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* S15C(OXY) в среде с лактатом лития в опыте, проведенном на свежих дрожжах (OC(1) и OC+ $\alpha$ Tx(2) (график а) в сравнении с дрожжами, хранившимися в течение 3-х лет сверх срока гарантийного срока хранения препарата.  $\alpha$ -Tx солиubilизировали с помощью твина-20 (график б), или с помощью твина-80 (график в), такое же количество солиubilизатора вводили в контрольный вариант (твин-80) (опыт 3Л).

В свое время выдающийся биохимик Эфраим Рэкер, много сделавший в области субстратного фосфорилирования, пришел к выводу, что глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназа катализирует НАД-зависимую реакцию, которая в обычных условиях протекает медленно. Фермент ускоряется в «постаревших» препаратах, которые являются по сути своей «окисленными». Надо заметить, что Рэкер работал с очищенной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой [8], в то время как мы имели дело со всей гликолитической последовательностью дрожжей. Активность дегидрогеназы в процессе опыта мы не определяли, а ускорение гликолитической последовательности констатировали по скорости выделения в среду пирувата (рис. 4, опыт 4Г).

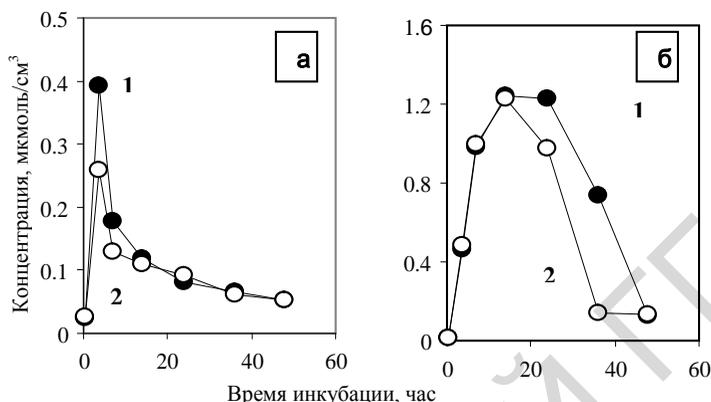


Рисунок 4 – Образование пирувата в процессе ферментации D-глюкозы за счет свежих (график а) или подвергнутых хранению в течение 1 года (график б) пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в связи со временем инкубирования (1 – без добавок; 2 – с введением в среду  $\alpha$ -токоферилхинона) (опыт 4Г).

Ускорение каталитического процесса происходило и тогда, когда в качестве исходного субстрата применяли пировиноградную кислоту (рис. 5, опыт 4П). Таким образом, зависящее от  $\alpha$ -токоферилхинона ускорение утилизации пирувата протекает на участке между пируватом и ацетальдегидом. При этом метаболизм пирувата при его использовании в качестве начального субстрата происходит с образованием ацетальдегида, но при этом вместо этанола образуется ацетон [19]. Мы точно не знаем, за счет чего происходит ускорение брожения под действием  $\alpha$ -токоферилхинона. Можно лишь предположить, что это ускорение проходило на финальном участке гликолитической последовательности, вследствие участия  $\alpha$ -токоферилхинона в качестве фактора активности НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы. Существует три НАД-зависимых алкогольдегидрогеназы у *Saccharomyces cerevisiae*. Они разделяются по термической чувствительности, по специфичности и по электрофоретической подвижности. Термическая чувствительность повышается в следующем порядке: алкоголь дегидрогеназа I, алкогольдегидрогеназа II и алкогольдегидрогеназа III [20].

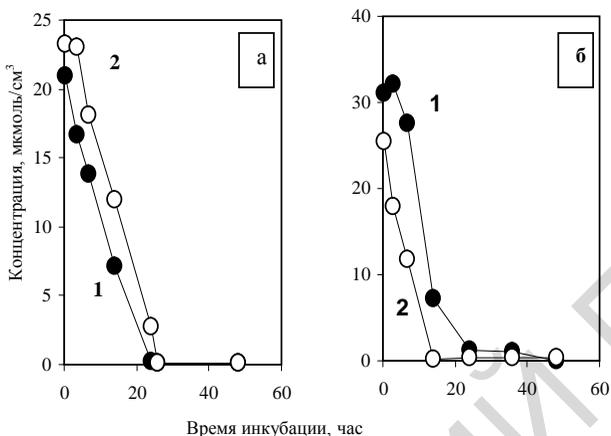


Рисунок 5 – Утилизация пирувата при его использовании в качестве субстрата для свежих сухих (график а) или подвергнутого хранению в течение 1 года (график б) пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в связи со временем инкубирования (1 – без добавок; 2 – с введением в среду  $\alpha$ -токоферилхинона) (опыт 4П).

*Saccharomyces cerevisiae* имеет три генетических локуса, кодирующих различные изоэнзимы АДГ: АДС1, которая кодирует классический изоэнзим АДН1; АДР2, который кодирует репресслируемый глюкозой изоэнзим АДГ II; и АДМ, который кодирует изоэнзим АДГ III, ассоциированный с митохондриями. Если дрожжи растут на глюкозе, экспрессируется ген АДС1 и соответственно репресслируется ген АДР2. И наоборот, выращивание дрожжей на источнике неферментируемого углерода, такого как этанол или глицерол, приводит к депрессии гена АДР2 и репрессии гена АДС1[21]. Наш дальнейший исследовательский интерес был связан с изучением характеристик брожения без добавок и с добавками ингибитора дыхания – азида натрия.

В варианте без добавок азида натрия (рис. 6) из глюкозы последовательно синтезируются продукты: глюкоза–пируват–ацетальдегид–этанол (опыт 5Г). В это время между вариантами 2 и 3 мы существенной разницы не заметили. В них мы отмечали очень низкие количества пирувата, тогда как его накопление в среде не происходит. При этом к 3,5 часам инкубации глюкоза была дрожжами практически полностью использована.

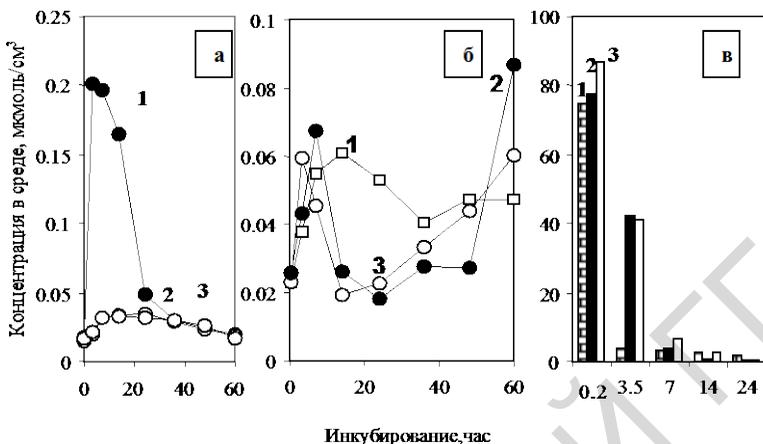


Рисунок 6 – Сбраживание глюкозы дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* S18C (01A); вариант а – динамика концентрации в среде пивоварата; вариант б – динамика концентрации в среде ацетальдегида; вариант в – динамика концентрации в среде глюкозы: группы 1 – ОС+глюкоза, 2 – ОС+глюкоза+азид натрия, 3 – ОС+глюкоза+азид натрия+αТх (опыт 5Г)

Обнаруженный 80 лет назад в тканевых автолизатах метилглиоксаль является токсическим побочным продуктом гликолиза. Глиоксалазная система включает металлоэнзимы глиоксалазу I и II, а также восстановленный глутатион в качестве кофактора. Считается, что ингибиторы глиоксалазы обладают противовоспалительными и антираковыми свойствами (рак молочной железы, рак простаты, астроцитоз мозга). Полифенол куркумин из куркумы снижает освобождение D-лактата из раковых клеток. В то же время куркумин ингибирует внутриклеточную глиоксалазу I, что может привести к недопустимым уровням метилглиоксала и глутатиона, которые в свою очередь могут модулировать метаболические пути, включающие истощение уровней АТФ и восстановленного глутатиона. Несмотря на это, куркумин рассматривается в качестве противоопухолевого и противовоспалительного терапевтического агента [22]. Функция метилглиоксалазной системы из *Trypanosoma cruzi* при экспрессии в *Trypanosoma brucei* проявляется в повышенной устойчивости к метилглиоксалу и в усиленном превращении метилглиоксала в D-лактат. Проциклические формы *Trypanosoma brucei* обладают НАДН-зависимой редуктазой метилглиоксала и НАД<sup>+</sup>-зависимой лактальдегид-дегидрогеназой. Авторы заключили, что господствующий путь детоксикации метилглиоксала у африканских трипаносом лежит через метилглиоксалазную ре-

дуктазу к образованию L-лактата [23]. Из этого вытекает, что метилглиоксалазный путь, несмотря на то, какой стереоизомер молочной кислоты в нем фигурирует, работает удовлетворительно.

Таким образом, возникает окольный путь, минующий и идущий с уменьшенным выходом АТФ, стадии гликолиза. Этот окольный путь служит для освобождения неорганического фосфора при его дефиците, который может возникать вследствие накопления больших количеств фруктозодифосфата.

**Заключение.** 1. Выделение пирувата в среду в процессе ферментации лактата в присутствии рибофлавинмононуклеотида (РМН) не приводил к заметным изменениям под влиянием  $\alpha$ -токоферилхинона концентрации пирувата. Добавка НАД к нуклеотиду (РМН) под влиянием включения в смесь  $\alpha$ -токоферилхинона приводило к блокированию второго, более позднего максимума (соответствующего D-изомеру).

2. Показана принципиальная возможность регулирования изомерного состава молочной кислоты за счет отдельных и сочетанных добавок  $\alpha$ -токоферилхинона и НАД в питательную среду для дрожжей.

3. Окисленные дрожжи под действием  $\alpha$ -токоферилхинона приводят к ускорению брожения на участке глюкоза-этанол. Этот эффект подтверждается на более узком участке последовательности пируват-ацетальдегид, если в качестве исходного субстрата применяют пируват.

4. Отмечается кратковременное торможение брожения за счет дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, отравленных азидом натрия. Оно характеризуется медленным протеканием метаболизма пирувата, но его накопления в среде не происходит, и во всех вариантах после 3,5-часовой инкубации процесс утилизации глюкозы практически полностью завершается. При этом  $\alpha$ -токоферилхинон на процессы, протекающие в дрожжах, практически не влияет.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bucke, C. The taxonomic distribution of plastoquinone and tocopherolquinone and their intracellular distribution in leaves of *Vicia faba* / C. Bucke, R.M. Leech, M. Halloway // Biochim. Biophys. Acta. – 1966. – Vol.112. – 19-34 p.
2. Lichtenthaler, H.K. Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts / H.K. Lichtenthaler, U. Prenzei, R. Douce e.a. // Biochim. Biophys. Acta – 1981. – Vol.641. – 99-105 p.
3. Kruk, J. Occurrence and function of  $\alpha$ -tocopherol quinone in plants / J. Kruk, K. Strzalka // J. Plant. Physiol. – 1995. – Vol.145. – N4. – 405-409 p.
4. Rousseau, B. Biotransformations of tocopherols by *Streptomyces catenulae* / B. Rousseau, L. Dostal, J.P.N. Rosazza // Lipids. – 1997. – Vol.32. – N1. – 79-84 p.
5. Whistance, G.R. The nature, intergeneric description and biosynthesis of isoprenoid quinones and phenols in gramnegative bacteria / G.R. Whistance, J.F. Dillon, D.R. Threlfall // J. Biochem. – 1969. – Vol.111. – 461-72 p.
6. Hughes, P.E. Occurrence of alpha-tocopherolquinone and alpha-tocopherolquinol in microorganisms / P.E. Hughes, S.B. Tove // Bacteriol. – 1982. – Sep. – Vol.151. – N3. – 397-402 p.

7. Данышина, П.В. Ускорение гликолиза нефосфорилирующей и окисленной фосфорилирующей глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназами / П.В. Данышина, Е.В. Шмальгаузен, Д.Ю. Арутюнов, А.П. Плетень, В.И. Муронца // Биохимия. – 2003. – Т.68 – №5. – 725-733 с.
8. Рэкер, Э. Биоэнергетические механизмы. / Э. Рекер. – М.: 1967. – 296 с.
9. Дудин, В.И. Об участии  $\alpha$ -токоферилхинона в процессах сбраживания глюкозы дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* / В.И. Дудин // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – №2. – 34-39 с.
10. Дудин, В.И. Сбраживание глюкозы дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* при введении в среду экзогенного НАД<sup>+</sup> и  $\alpha$ -токоферилхинона / В.И. Дудин // Сельскохозяйственная биология. – 2011. №6. – 41-46 с.
11. Christescu, M.E. D-and L-lactate dehydrogenases during invertebrate evolution / M.E. Christescu, D.J. Innes, J.H. Stillman, T.J. Crease // BMC Evol. Biol. – 2008. – N8. – 268-269 p.
12. Poeze, M. Gastric PgCO<sub>2</sub> and Pg-aCO<sub>2</sub> gap are, related to D-lactate and not to L-lactate levels in patients with septic shock / M. Poeze, B.C. Solberg, J.W. Greve, G. Ramsey // Intensive Care Med. – 2003. – Vol.29. – N11. – 2081-5 p.
13. Iino, T. The effect of sodium acetate on the activity of L- and D-lactate dehydrogenases in *Lactobacillus sakei* NRIC 1071(T) and other lactic acid bacteria / T. Iino, T. Uchimura, K. Komagata // Gen. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol.49. – N1. – 51-8 p.
14. Mc William Leitch, E.C. Escherichia coli O157 and non-O157 isolates are more susceptible to L-lactate than to D-lactate / E.C. Mc William Leitch, C.S. Stewart // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – Vol.68. – N9. – 4676-8 p.
15. Brutinel, E.D. Preferential utilization of D-lactate by *Shewanella oneidensis* / E.D. Brutinel, J.A. Grainick // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol.78. – N23. – 8474-6 p.
16. Вуд, У. Брожение углеводов и родственных соединений / У. Вуд // Метаболизм бактерий: сб. науч. тр. – М.: -изд. иностранной литературы – 1963. – 9-62 с.
17. Петрунькина, А.М. Практическая биохимия / А.М. Петрунькина. – Л.: Наука, 1961. – 384-390 с.
18. Jasso-Chavez, R. The bacterial-like lactate shuttle components from heterotrophic *Euglena gracilis* / R. Jasso-Chavez, I. Garsia-Cano, A. Martin-Hernandez, D. Mendoza-Cozatl, J.L. Rendon, R. Moreno-Sanchez // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – Vol.1709. – N2. – 181-90 p.
19. Самнер, Д.Б. Химия ферментов и методы их исследования / Д.Б. Самнер, Г.Ф. Сомерс. // Гл.17 Гидратазы и мутазы – 423-430 с.
20. Wiesenfeld, M. Multiple forms of mitochondrial alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* / M. Wiesenfeld, L. Schimpffessel, R. Crokaert // Biochem. Biophys. Acta. – 1975. – Vol.405. – 500-12 p.
21. Russell, D.W. DNA sequences of two yeast promoter-up mutants / D.W. Russell, M. Smith, D. Cox, V.M. Williamson, E.T. Young / Nature. – 1983. – Vol.304. – N5927. – 652-4 p.
22. Santel, T. Curcumin inhibit glyoxalase 1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity / T. Santel, G. Pflug, N.J. Hemdan, A. Schafer, M. Hollenbach, M. Buchold, A. Hintersdorf // PLoS One. – 2008. – Vol.3. – N10. – 3508 p.
23. Greig, N. A comparative study of methylglyoxal metabolism in trypanosomatids / N. Greig, S. Wyllie, S. Patterson, A.H. Fairlamb // FEBS. – 2009. – Vol.276. – N2. – 376-86 p.