

Metabolizm kwasu jabłkowego u drożdży z rodzaju *Schizosaccharomyces* i *Saccharomyces*

Alina Kunicka

Józef Stanisław Szopa

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Politechnika Łódzka

Łódź

1. Wstęp

Obecność trzech kwasów organicznych: kwasu jabłkowego, winowego i cytrynowego, występujących w ilościach zależnych od gatunku owoców, warunków klimatycznych i czynników środowiskowych.

Wysoka kwasowość win owocowych spowodowana jest głównie nadmiarem kwasu jabłkowego w surowcu, a zatem aby poprawić smak oraz trwałość produktu, konieczne jest obniżenie stężenia tego kwasu w moszczach lub gotowych winach. Można to osiągnąć przez rozcieńczanie i kupażowanie moszczów (mieszanie moszczów o różnej kwasowości), na drodze neutralizacji chemicznej lub też wykorzystując fermentację jabłczanowo-mleczanową.

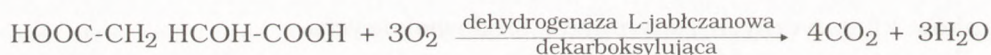
Korekta kwasowości przez rozcieńczanie i kupażowanie moszczów prowadzi do uzyskania win o niepełnym smaku i barwie (1). Metody chemiczne, polegające zwykle na wiązaniu kwasu jabłkowego węglanem wapniowym lub potasowym, powodują straty związków garbnikowych i pogłębienie barwy win (2,3).

Obniżenie zawartości kwasu jabłkowego, przekształcanego do kwasu mlekowego w procesie fermentacji jabłczanowo-mleczanowej prowadzonej przez bakterie *Leuconostoc oenos*, jest utrudnione przy zbyt wysokiej zawartości kwasów i wymaga wstępnej chemicznej korekty pH oraz niskiej zawartości dwutlenku siarki w moszczach (1,2); ponadto otrzymane wina często wykazują zmianę barwy spowodowaną procesami oksydacji.

Prowadzone są również badania nad zastosowaniem drożdży rozszczepkowych *Schizosaccharomyces pombe* do utylizacji kwasu jabłkowego w moszczach i winach gronowych (4-7). Drożdże te prowadzą konwersję kwasu jabłkowego do etanolu równoległe z fermentacją główną, a jednocześnie charakteryzują się dużą tolerancją na wysoką kwasowość i zawartość SO₂ w podłożu fermentacyjnym. Ich wykorzystanie w winiarstwie limituje tworzenie się niepożądanego posmaku i aromatu, spowodowanego przez wytworzony siarkowodor oraz zmienny stopień degradacji kwasu jabłkowego (2,4,5). Wina o prawidłowych właściwościach uzyskuje się, wówczas gdy fermentacja prowadzona przez drożdże winiarskie poprzedzona jest odkwaszaniem przy udziale drożdży *S. pombe* (5,7,8), co wymaga dodatkowych zabiegów technologicznych (1,2,7) i powoduje zwiększenie kosztów procesu. Stosowanie w procesach fermentacyjnych mieszanych populacji drożdży winiarskich i rozszczepkowych nie dawało zadowalających rezultatów ze względu na małą ilość drożdży *Schizosaccharomyces*, spowodowaną znacznie większą szybkością wzrostu drożdży *Saccharomyces* (5,9).

2. Metabolizm kwasu jabłkowego u drożdży *Schizosaccharomyces pombe*

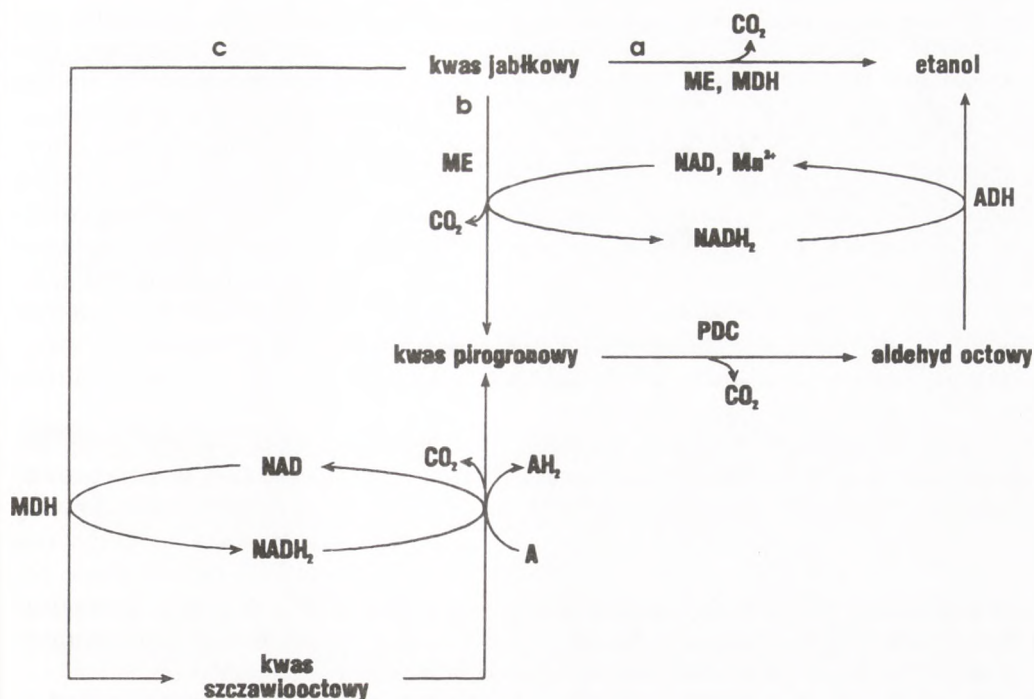
Już w 1963 r. Mayer i Temperli (10) sformułowali hipotezę wyjaśniającą tlenowy i beztlenowy rozkład kwasu jabłkowego prowadzony przez drożdże *S. pombe*. Zakładano, że w warunkach tlenowych L-jabłczan może ulegać całkowitej oksydatywnej dekarboksylacji do CO₂ i H₂O według sumarycznego równania:



Autorzy sugerowali, że w warunkach anaerobowych degradacja kwasu L-jabłkowego prowadzona jest na drodze 1,4-dekarboksylacji do etanolu i CO₂ (rys. 1a).

Dalsze badania Temperli'ego i wsp. (11) doprowadziły do wyizolowania z komórek *S. pombe* dehydrogenazy L-jabłczanowej dekarboksylującej (*malic enzyme*, EC 1.1.1.38), zależnej od NAD i wymagającej Mn²⁺ jako kofaktora. W 1976 r. Heer i wsp. (12) stwierdzili u tych drożdży obecność czterech różnych izoenzymów dehydrogenazy jabłczanowej (EC 1.1.1.37), co dowodzi występowania alternatywnych szlaków degradacji kwasu L-jabłkowego (rys. 1, droga b, c).

Rezultaty badań widm spektroskopowych (NMR) produktów przemian kwasu L-jabłkowego, znakowanego deuterem w komórkach spoczynkowych *S. pombe*, wskazują na degradację tego kwasu do etanolu na drodze dwukrotnej dekarboksylacji, a następnie redukcji aldehydu octowego (13) (rys. 1b lub c).



Rys. 1. Prawdopodobne drogi beztlenowego rozkładu kwasu jabłkowego przez drożdże *S. pombe*. ME — malic enzyme, MDH — dehydrogenaza jabłczanowa, PDC — dekarboksylaza pirogronianowa, ADH — dehydrogenaza alkoholowa, A — akceptor wodoru.

Badania z mutantami drożdży rozszczepkowych defektywnych pod względem utylizacji kwasu jabłkowego (mutanty *mau*) (14) wskazują, że „enzym jabłczanowy” odgrywa główną rolę w metabolizmie zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Mutanty takie utylizowały 10-30% kwasu jabłkowego zawartego w podłożu, jedynie w warunkach tlenowych, nie wykazując uzdolnień do degradacji anaerobowej, co może być związane z zanikiem aktywności dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) w nieobecności tlenu. Nie otrzymano jednak jednoznacznych danych, pozwalających na wykluczenie kwasu szczawiooctowego ze szlaku degradacji jabłczanu (droga c, rys. 1).

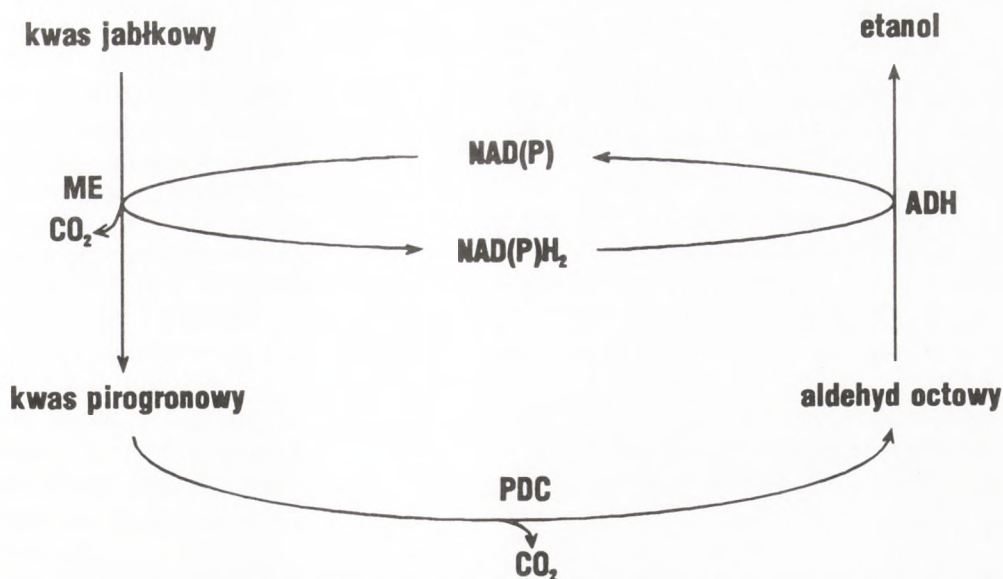
Enzym jabłczanowy (ME) zależny od NAD lub NADP został znaleziony u grzybów z rodzaju *Aspergillus* (15), drożdży *Rhodotorula sp.* (16), *Hansenula anomala* (17,18,19), *Saccharomyces bailii* (20), *Saccharomyces cerevisiae* (21,22) oraz u bakterii *Escherichia coli* (23). Drożdże *S. pombe* są jednakże o tyle unikatowe, że degradację kwasu jabłkowego prowadzą wyłącznie w obecności NAD, i to zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Ponadto kwas jabłkowy nie może być wykorzystywany przez drożdże *S. pombe* jako jedyne źródło węgla, a proces jego rozkładu uwarunkowany jest obecnością glukozy lub innych metabolitów pośrednich (14).

Taillander i wsp. (6) nie znajdują jednak ścisłego związku pomiędzy degradacją jabłczanu oraz wykorzystaniem glukozy i wzrostem komórek. Obserwowano rozkład kwasu jabłkowego przez komórki spoczynkowe *S. pombe* w nieobecności cukru w podłożu hodowlanym, przy zmniejszającej się żywotności komórek drożdży. Badania te wskazują, że kwas jabłkowy jest odpowiedzialny za utratę aktywności komórek. Fakt ten potwierdzają wcześniejsze badania (10,24,25), wykluczające jabłczan jako źródło energii i jedyne źródło węgla. Równocześnie aktywność odkwaszania nie jest bezpośrednio związana z ilością metabolizowanego cukru, lecz z ilością i żywotnością komórek (26). Można zatem przypuszczać, że metabolizm kwasu jabłkowego u *S. pombe* wymaga energii, a w przypadku jej braku w procesie odkwaszania są zużywane jej zapasy, skutkiem czego limitowane są inne procesy życiowe i obniża się żywotność komórek.

Rola kwasu jabłkowego w metabolizmie drożdży rozszczepkowych nie została dotychczas w pełni wyjaśniona. Queiroz i Pareilleux (27) w przeprowadzonych badaniach wskazują, że jabłczan może być aktywniej asymilowany do biomasy w warunkach tlenowych. W obecności tlenu wejście jabłczanu do cyklu Krebsa może przyczynić się zarówno do tworzenia metabolitów pośrednich, jak i katabolicznej produkcji energii, co w rezultacie powoduje wzrost wydajności biomasy. Autorzy wykluczają rolę jabłczanu jako pomocniczego źródła energii w warunkach beztlenowych.

Transportowi jabłczanu i innych kwasów dwukarboksylowych cyklu Krebsa do komórek organizmów eukariotycznych poświęcono znacznie mniej uwagi w porównaniu z badaniem układów transportujących aminokwasy i węglowodany (28,29). Transport jabłczanu badano u *Candida sphaerica* (30) i *Hansenula anomala* (17), stwierdzając, że w tych organizmach ma on charakter jednokierunkowy, podobnie jak w przypadku fumaranu i bursztynianu. Opisane w literaturze systemy transportujące te kwasy organiczne określono jako indukowane, podlegające represji katabolicznej symportu: proton-kwas dwukarboksylowy. Niedysocjowane kwasy dwukarboksylowe wnikają do komórki na drodze dyfuzji prostej. W badaniach kinetyki transportu L-jabłczanu u *S. pombe* (31) wskazuje się na obecność w transportującym systemie, nośników pośredniczących o naturze białkowej. Hamowanie przenoszenia jabłczanu w obecności inhibitorów akumulacji energii sugeruje, że jest on energetycznie zależny, a zatem jest to transport aktywny, podobnie jak w przypadku transportu innych metabolitów pośrednich cyklu kwasów trójkarboksylowych, np. u bakterii *Rhizobium leguminosarum* (32) i *Salmonella typhimurium* (33). Uwzględniając niezdolność *S. pombe* do wykorzystywania jabłczanu jako jedyne źródła węgla i konieczność obecności innego źródła energii w podłożu, można wnioskować, że glukoza lub inne metabolity pośrednie odgrywają znaczącą rolę w dostarczaniu ATP zużywanego do transportu tego kwasu. Porównanie układów transportujących kwasy cyklu Krebsa różnych organizmów (31-34) prowadzi do wniosku, że istnieją różnice w mechanizmie genetycznej regulacji wykorzystania jabłczanu.

Konstytutywna utylizacja jabłczanu u *S. pombe* może przebiegać poprzez indukcję jego akumulacji wewnątrz komórek, podobnie jak cytrynianu u ba-



Rys. 2. Beztlenowy rozkład kwasu jabłkowego przez drożdże *S. cerevisiae*.

której (35), lub też obecność glukozy w podłożu może wywoływać ekspresję genów transportu jabłczanu.

3. Metabolizm kwasu jabłkowego u drożdży z rodzaju *Saccharomyces*

Ze względu na istotny wpływ kwasu jabłkowego na właściwości organoleptyczne win, szlak jego rozkładu przez fermentujące drożdże winiarskie od dawna wzbudza zainteresowanie. Drożdże *S. cerevisiae* w warunkach beztlenowych rozkładają niewielkie ilości kwasu jabłkowego, obecnego w podłożu fermentacyjnym. Zależnie od szczepu stopień degradacji jabłczanu waha się od 0 do 33% (22,36). W drożdżach winiarskich stwierdzono obecność dehydrogenazy L-jabłczanowej dekarboksylującej (EC 1.1.1.38 lub 40 — *malic enzyme*) oraz dehydrogenazy L-jabłczanowej (EC 1.1.1.37) (22,23). Aktywność pierwszego enzymu zależy od NAD lub NADP oraz jonów Mn^{2+} . W warunkach beztlenowych powoduje on u drożdży *S. cerevisiae* rozkład kwasu jabłkowego do pirogronowego, który jest dalej metabolizowany do etanolu i CO₂ dzięki sukcesywnej działalności dekarboksylazy pirogronianowej i dehydrogenazy alkoholowej (22) (rys. 2). Niewielki stopień rozkładu kwasu L-jabłkowego przez drożdże *S. cerevisiae* może być wynikiem szczególnie niskiego powinowactwa dehydrogenazy L-jabłczanowej dekarboksylującej, do tego substratu, które

jest ok. 15-krotnie niższe niż u drożdży *S. pombe* (20).

W badaniach wskazuje się na różne właściwości enzymu jabłczanowego (*malic enzyme*), zależnie od gatunku drożdży z rodzaju *Saccharomyces*. W odróżnieniu od częściowej degradacji jabłczanu przez drożdże winiarskie *S. cerevisiae*, u drożdży *S. bailii* — znanych jako osmotolerancyjne, izolowane ze skoncentrowanych soków owocowych oraz wysokosłodzonych produktów żywnościowych (37) — może on być całkowicie metabolizowany w warunkach anaerobowych (20,38). „Enzym jabłczanowy” *S. bailii* charakteryzował się ok. 20-krotnie wyższą aktywnością w porównaniu z enzymem drożdży *S. cerevisiae* i zbliżoną do aktywności enzymu *S. pombe*. Enzymy *S. bailii* i *S. cerevisiae* nie są indukowane, mają optymalne pH działania bliskie obojętnemu oraz są bardzo labilne w procesie oczyszczania. Oba enzymy działają przy udziale NAD lub NADP, jednakże koenzymem faworyzowanym jest NAD (20). Istotną różnicę stanowi zapotrzebowanie na jony manganu. *Malic enzyme* *S. cerevisiae* jest uzależniony od Mn^{2+} , podczas gdy enzym ten u *S. bailii* może funkcjonować bez jonów Mn^{2+} , których obecność jedynie zwiększa aktywność w metabolizmie beztlenowym jabłczanu (20,38). Powinowactwo enzymu jabłczanowego *S. bailii* do substratu i koenzymu jest pięciokrotnie większe niż dla enzymu *S. cerevisiae*. Enzym jabłczanowy drożdży winiarskich jest enzymem dwufunkcyjnym, przemieniającym zarówno jabłczan jak i szczawiooctan, podczas gdy enzym *S. bailii* nie dekarboksyluje szczawiooctanu (38).

Zarówno dla drożdży *S. cerevisiae*, jak i *S. bailii* kwas jabłkowy nie może stanowić jedyne źródła węgla w warunkach tlenowych i beztlenowych, a jego rozkład warunkowany jest obecnością glukozy, podobnie jak u *S. pombe*. Komórki *S. bailii* najaktywniej metabolizują ten kwas w czasie logarytmicznej fazy wzrostu (38).

Transport jabłczanu do komórek *S. cerevisiae* odbywa się na drodze dyfuzji (39), natomiast u *S. bailii* stwierdzono obecność glukozezależnych białkowych nośników jabłczanu. Połączone działanie nośników białkowych, odpowiedzialnych za wysokie stężenie wewnątrzkomórkowe jabłczanu i enzymu jabłczanowego o relatywnie wysokim powinowactwie substratowym, promuje metabolizm L-jabłczanu u *S. bailii* w porównaniu z drożdżami winiarskimi (20).

W przemyśle fermentacyjnym drożdże *S. bailii* znane są jako organizmy zakażające, o słabej aktywności fermentacyjnej, których rozwój w winach powoduje powstawanie niepożądanych związków. Nie jest zatem możliwe użycie drożdży *S. bailii* do fermentacji win.

Wykazano również, że ponad 50 szczepów z rodzaju *Saccharomyces*, *Saccharomycodes* i *Schizosaccharomyces* przy wzroście w podłożu syntetycznym wytwarza kwas L-jabłkowy, uwalniając go w fazie logarytmicznej (40). Ten niekorzystny proces jest hamowany w winiarstwie przez niski odczyn pH środowiska (3.00), wysokie (do 55 g/dm³) początkowe stężenie glukozy oraz limitację biotyny w podłożu hodowlanym na poziomie 0,5-1,0 µg/dm³ (41).

4. Konstrukcja szczepów drożdży winiarskich użytkujących kwas jabłkowy

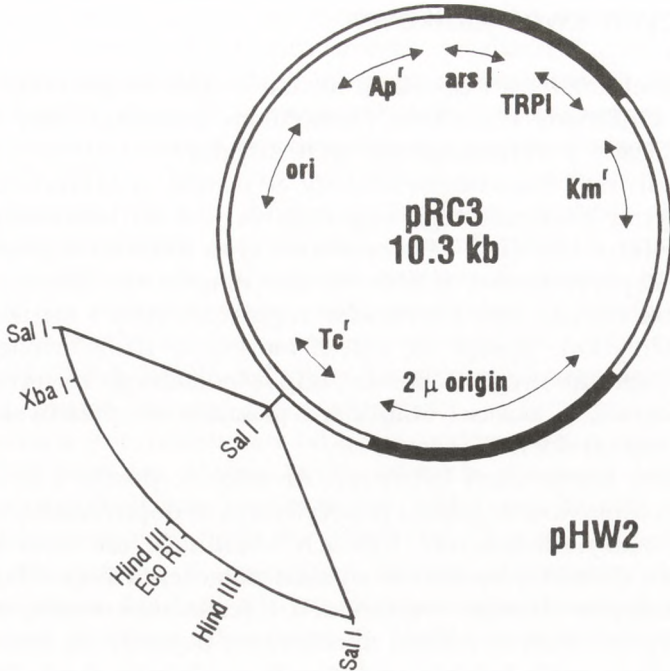
Poznanie mechanizmów degradacji kwasu L-jabłkowego przez drożdże rozszczepkowe i winiarskie umożliwia konstrukcję szczepu, który będzie łączył cechy biochemiczne i technologiczne tych drożdży.

Wyniki badań nad mutantami drożdży *S. pombe*, u których nie wykazano obecności enzymu jabłczanowego sugerują, że jest on kodowany przez pojedynczy gen strukturalny (14). Występowanie tych mutantów pozwala na przeprowadzenie eksperymentów, w których gen mógłby być sklonowany, co pozwoliłoby na określenie jego elementów regulatorowych i strukturalnych na poziomie nukleotydów. Rysuje się zatem możliwość transformacji i ekspresji genu enzymu jabłczanowego *S. pombe*, odpowiedzialnego za fermentację jabłczanowo-etanolową, w postaci stabilnego plazmidu w przemysłowych szczepach drożdży winiarskich *S. cerevisiae*.

Podjęte próby konstrukcji hybrydów drożdży *S. pombe* i *S. cerevisiae* na drodze fuzji protoplastów w glikolu polietylenowym doprowadziły do uzyskania mieszańców międzyrodzajowych, lecz ich stabilność nie była zadowalająca (42,43). W toku dalszych badań, w wyniku połączenia haploidalnych aukso-troficznych szczepów drożdży winiarskich i rozszczepkowych, na podłożach selekcyjnych oprócz dużych kolonii mieszańców pojawiły się znacznie liczniejsze auksotroficzne małe kolonie ubocznych produktów fuzji. Po przeprowadzeniu dokładnej analizy tych produktów wykazano, że ich genom składa się z kompletu chromosomów *S. cerevisiae* oraz chromosomu II *S. pombe* (44). Szczepy drożdży przydatne do produkcji win oraz degradujące kwas L-jabłkowy otrzymano przez fuzję protoplastów produktów fuzji powstałych z połączenia sferoplastów *S. pombe*, kodujących w pojedynczym genomie cechę rozkładu L-jabłczanu, oraz drożdży *S. cerevisiae*. Trzy nowe hybrydy drożdży zostały wykorzystane w procesie produkcji win do usunięcia nadmiaru kwasu L-jabłkowego (45).

Międzyrodzajowe hybrydy otrzymane w wyniku krzyżowania komórek auksotroficznych diploidów *S. cerevisiae* oraz haploidów *S. pombe* wykazywały cechy morfologiczne i niektóre fizjologiczne obu szczepów rodzicielskich, jednakże w czasie 14 miesięcy przechowywania obserwowano rozdział mieszańców i pojawienie się komórek form wyjściowych (46). Niestabilność szczepów mogła być spowodowana wystąpieniem jedynie plazmogamii w czasie łączenia się komórek, bez zaistnienia kariogamii koniecznej do uzyskania szczepów stabilnych pod względem morfologicznym i fizjologicznym.

Z punktu widzenia konstrukcji szczepów drożdży winiarskich zdolnych do metabolizowania kwasu L-jabłkowego, jak się wydaje, korzystne jest przeniesienie tej cechy z bakterii prowadzących fermentację jabłczanowo-mleczanową. Bakterie mlekowe z rodzaju *Lactobacillus*, *Lactococcus* lub *Pediococcus* prowadzą dekarboksylację L-jabłczanu do L-mleczanu w obecności jednego enzymu (*malolactic enzyme*) zależnego od NAD i jonów Mn^{2+} (47). Wykorzystanie tej właściwości bakterii w winiarstwie jest ograniczone występowaniem



Rys. 3. Plazmid pHW2 powstały przez włączenie do plazmidu pRC3 5 kb fragmentu klonowanego z *L. delbrueckii* w miejsce Sal I i genu oporności na tetracyklinę (ciemne linie wskazują sekwencje DNA drożdży).

interakcji synergistycznych i inhibitorowych pomiędzy drożdżami *S. cerevisiae* i bakteriami fermentacji mlekowej (48-50).

Gen kodujący beztlenową konwersję L-jabłczanu do L-mleczanu, pochodzący z bakterii *Lactobacillus delbrueckii* (51) i *Lactococcus lactis* (52) był klonowany i sekwencjonowany. Odpowiednia sekwencja kodująca DNA bakteryjny, stanowiąca 5 kb segment, była klonowana u *Escherichia coli* w plazmidzie pBR322. Wyizolowane klony *E. coli*, zawierające gen fermentacji jabłczanowo-mleczanowej, były zdolne do beztlenowego metabolizowania 10% L-jabłczanu, zawartego w podłożu. Ekspresja w *S. cerevisiae* została osiągnięta przez transfer genu do plazmidu wahadłowego pHW2 (*E. coli* — yeast shuttle vector), zawierającego zarówno chromosomalny drożdżowy replikator *ars1*, jak i 2- μ m plazmidowy *ori* replikacji DNA umożliwiającą replikację w transformowanych komórkach drożdży (51). Mapę plazmidu pHW2 przedstawiono na rys. 3.

Transformanty drożdży w warunkach beztlenowych utyliowały jedynie niewielką ilość L-jabłczanu zawartego w podłożu, podczas gdy szczep kontrolny *L. delbrueckii* w tych samych warunkach rozkładał 16-krotnie więcej tego kwasu. Do konstrukcji rekombinanta o praktycznym znaczeniu w przemyśle winiarskim, konieczne jest zwiększenie ekspresji klonowanego genu w komór-

kach drożdży, co wymaga dokładnego poznania czynników regulujących jego ekspresję.

Ansanay i wsp. (52) stwierdzili, że gen enzymu jabłczanowo-mleczanowego, pochodzący z *L. lactis* zawiera jedną otwartą ramkę odczytu, kodującą białko o masie cząsteczkowej 59 kDa o sekwencji aminokwasów zawartej również w enzymach jabłczanowych, pochodzących z różnych organizmów. Komórki bakterii *E. coli* i drożdży *S. cerevisiae* zawierające ten gen wykazywały zdolność do konwersji L-jabłczanu do L-mleczanu w warunkach beztlenowych.

W wyniku przeprowadzonych wielokierunkowych prac zmierzających do konstrukcji szczepu drożdży winiarskich fermentujących kwas L-jabłkowy umożliwione zostało zarówno poznanie metabolizmu L-jabłczanu, jak również mechanizmów regulujących ten proces. Prowadzone eksperymenty dostarczają informacji użytecznych w inżynierii genetycznej drożdży winiarskich, a także mogą być przydatne w procesach doskonalenia innych organizmów stosowanych w procesach biotechnologicznych.

Wyjaśnienie mechanizmów biodegradacji kwasu L-jabłkowego u *S. pombe* i *S. cerevisiae* umożliwi konstrukcję szczepu mieszańcowego tych drożdży, który łączyć będzie cechy biochemiczne i technologiczne.

Literatura

1. Czyżycki A., Pogorzelski E., Łukawska-Pietrzak Z., Włodarczyk M., Wieczorek A., (1991), *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 2, 15-16.
2. Munyon J. R., Nagel C. W., (1977), *Am. J. Enol. Vitic.*, 28, 79-87.
3. Czyżycki A., Pogorzelski E., Łukawska-Pietrzak Z., (1989), *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 2, 19.
4. Gallander J. F., (1977), *Am. J. Enol. Vitic.*, 28, 65-68.
5. Snow P. G., Gallander J. F., (1979), *Am. J. Enol. Vitic.*, 30, 45-48.
6. Taillandier P., Riba J. P., Strehaiano P., (1988), *Biotechnol. Lett.*, 10, 469-472.
7. Rodopulo A. K., Jegorow I. A., (1987), *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 23, 833-836.
8. Kiszowska S. A., Burian N. J., Rewa A.G., (1984), *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 20, 410-415.
9. Kiszowska S. A., Winogradow B. A., (1985), *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 21, 843-847.
10. Mayer K., Temperli A., (1963), *Arch. Microbiol.*, 46, 321-328.
11. Temperli A., Künsch U., Mayer K., Busch I., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, 110, 630-632.
12. Heer B., Brändi E., Fiechter A., (1976), *Proc. Int. Ferment. Symp.* 5th, 167.
13. Maconi E., Manachini P. L., Aragozzini F., Gennari C., Ricca G. S., (1983), *J. Biochem.* 217, 585-588.
14. Osothsilp C., Subden R. E., (1986), *Can. J. Microbiol.*, 32, 481-486.
15. McCollough W., Roberts C. F., (1974), *FEBS Lett.*, 41, 238-242.
16. Fernandez M. J., Medrano L., Ruiz-Amil M., Losaola M., (1967), *Eur. J. Biochem.*, 3, 11-18.
17. Côte-Real M., Leao C., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1109-1113.
18. Côte-Real M., Leao C., van Uden N., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3402-3404.
19. Côte-Real M., Leao C., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 663-666.
20. Kuczyński J. T., Radler F., (1982), *Arch. Microbiol.*, 131, 266-270.
21. Fuck E., Radler F., (1972), *Arch. Microbiol.*, 87, 149-164.
22. Fuck E., Stärk G., Radler F., (1973), *Arch. Microbiol.*, 89, 223-231.

23. Katsuki H., Takeo K., Kameda K., Tanaka S., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 331-336.
24. Kunkee R. E., (1967), *Adv. Appl. Microbiol.*, 9, 235-300.
25. Magyar I., Panyik I., (1989), *Am. J. Enol. Vitic.*, 40, 233-240.
26. Taillandier P., Strehaiano P., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 541-543.
27. De Querios H., Pareilleux A., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 578-581.
28. Cooper T. G., (1982), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression*, Eds. J. N. Sutherland, E. W. Jones, J. R. Broach, Cold Spring Harbor, New York, 399-462.
29. Kocková-Kratochvilová A., (1990), *Yeasts and yeast-like organisms*, Weinheim, New York, Cambridge, Basel, VCH, 304-387.
30. Côte-Real M., Leao C., van Uden N., (1989), *Appl. Environ. Biotechnol.*, 31, 551-555.
31. Osothsilp C., Subden R. E., (1986), *J. Bacteriol.*, 168, 1439-1443.
32. Finan T. M., Wood J. M., Jordan D. C., (1981), *J. Bacteriol.*, 148, 193-202.
33. Parada J. L., Ortega N. V., Carrillo-Casteneda G., (1973), *Arch. Microbiol.*, 94, 65-76.
34. Ghei O. M., Kay W. W., (1973), *J. Bacteriol.*, 114, 65-79.
35. Willecke K., Pardee A. B., (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, 1032-1040.
36. Radler F., (1986), *Experientia*, 42, 857-966.
37. Warth A. D., (1977), *J. Appl. Bacteriol.*, 43, 215-230.
38. Radler F., Baranowski K., Kuczyński J. T., (1976), *Report of Fifth International Fermentation Symposium*, Ed. H. Dellweg, Berlin, 500.
39. Baranowski K., Radler F., (1984), *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.*, 50, 329-340.
40. Schwartz H., Radler F., (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 553-560.
41. Salmon J. M., Vezinhet F., Barre P., (1987), *FEMS Microbiol. Lett.*, 42, 213-220.
42. Provolst A., Bourguignon C., Fournier P., Ribet A. M., Heslot H., (1978), *FEMS Microbiol. Lett.*, 3, 309-312.
43. Svoboda A., (1980), *Intergeneric fusion of yeast protoplasts: S. cerevisiae + S. pombe*, Pergamon Press, Oxford, 119-124.
44. Tamaki H., (1982), *Mol. Gen. Genet.*, 187, 177-179.
45. Patent, (1990), WO90/08820A1, Brazil.
46. Kosikow K. W., Miedwiediewa A. A., (1979), *Mikrobiologija*, 5, 887-893.
47. Caspritz G., Radler F., (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 4709-4910.
48. Markides A., (1993), *Austr. Grapegr. Win.*, 352, 110-111.
49. Edwards C. G., Beelman R. B., Bartley C. E., McConnell A. L., (1990), *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 46-56.
50. Dick K. J., Molan P. C., Eschenbruch R., (1992), *Vitis*, 31, 105-116.
51. Williams S. A., Hodges R. A., Strike T. L., Snow R., Kunkee R. E., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 288-293.
52. Ansanay V., Dequin S., Blondin B., Barre P., (1993), *FEBS Lett.*, 332, 74-80.

Malic acid metabolism by yeasts *Schizosaccharomyces* and *Saccharomyces*

Summary

The importance of malic acid degradation by yeasts during winemaking is pointed and metabolic pathways for maloalcoholic fermentation by *Schizosaccharomyces* and *Saccharomyces* and malate transport systems are summarized. Due to methods both of classical genetics and genetic engineering new strains for industrial fermentation, which may utilize L-malic acid, can be developed. Yeasts cells are also considered good hosts for cloning the bacterial gene responsible for malolactic fermentation originated from *Lactobacillus* and *Lactococcus*.

Key words:

Saccharomyces cerevisiae, *Schizosaccharomyces pombe*, malic acid degradation, winemaking.

Adres do korespondencji:

Alina Kunicka, Józef Stanisław Szopa, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.