

Monika Cioch<sup>1\*</sup>, Paweł Satora<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej  
Wydział Technologii Żywności Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wpłynęło w lutym 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Rola kwasu L-jabłkowego w metabolizmie drożdży. 3. Rozkład kwasu jabłkowego przez drożdże. 4. Enzym jabłkowy: struktura, funkcja i regulacja. 5. Genetycznie modyfikowane szczepy *S. cerevisiae* rozkładające kwas L-jabłkowy. 6. Podsumowanie

### Metabolism of L-malic acid by wine yeast

**Abstract:** Biochemical characterization of L-malate degradation pathways indicates that the physiological role and regulation of L-malic acid metabolism differ significantly between the K(–) and K(+) yeasts. In contrast to K(+), K(–) group including *Saccharomyces* strains, *Schizosaccharomyces pombe* and *Zygosaccharomyces bailli* that are capable of utilizing only the TCA cycle intermediates in the presence of glucose or other sources of carbon. Variety of factors that influence the ability of yeast strains to efficiently degrade L-malate is associated with the wine fermentation process, intracellular transport and effective acid metabolism.

The paper presents the essential information regarding the construction and regulation of the gene encoding malic enzyme expression and the role of L-malic acid in the yeast metabolism.

1. Introduction. 2. The role of L-malic acid in the metabolism of yeast. 3. Utilization of L-malic acid by yeast. 4. Malic enzyme: structure, function and regulation. 5. Genetically modified *S. cerevisiae* strains decaying L-malic acid. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** drożdże, enzym jabłkowy, kwas L-jabłkowy, *S. cerevisiae*, *S. pombe*

**Key words:** yeasts, malic enzyme, L-malic acid, *S. cerevisiae*, *S. pombe*

## 1. Wprowadzenie

Produkcja wysokiej jakości wina w znacznym stopniu uzależniona jest od regulacji jego kwasowości. Do tradycyjnych, naturalnych metod odkwaszania należy fermentacja jabłkowo-mlekowa, w wyniku której następuje konwersja kwasu L-jabłkowego do mleczanu i CO<sub>2</sub>, zachodząca głównie przy udziale bakterii *Oenococcus oeni*. Technika alternatywną dla redukcji kwasowości win z udziałem bakterii jest możliwość zastosowania szczepów drożdży, które są w stanie metabolizować nadmiar L-jabłczanu. Zdolność ta została dotychczas stwierdzona tylko u niektórych gatunków, m.in. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida utilis*, w mniejszym stopniu natomiast u *Pichia anomala*, *P. stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailli* i *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*. Kultury drożdży redukujące kwas L-jabłkowy podzielone zostały na dwie grupy K(–) i K(+), w oparciu o wykorzystanie L-jabłczanu i produktów pośrednich cyklu Krebsa jako jedyne źródła węgla i energii. Pierwsza z nich obejmuje drożdże *Candida sphaerica*, *C. utilis*, *Hanseniaspora anomala*, *P. stipitis* i *K. marxianus*, które są w stanie wykorzystywać intermediaty cyklu Krebsa jako jedyne źródło węgla. Grupa K(–) natomiast wymaga do odkwaszania obecności glukozy lub innego asymilowanego węglowodanu.

Zaliczane są do niej *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *S. pombe* var. *malidevorans* i *Z. bailli*. Zazwyczaj szczepy *Saccharomyces* uważane są za nieefektywnie metabolizujące kwas L-jabłkowy, w przeciwieństwie do redukujących jego zawartość drożdży *Schizosaccharomyces* i *Z. bailli*. Genetyczna i biochemiczna charakterystyka dróg rozkładu L-jabłczanu przez *S. pombe*, *C. utilis*, *K. marxianus*, *Z. bailli* i *S. cerevisiae* dowodzi, że fizjologiczna rola i regulacja jego metabolizmu istotnie różnią się pomiędzy grupami K(+) i K(–) [13, 24, 30].

Mimo, że zarówno drożdże *S. cerevisiae*, jak i *S. pombe* klasyfikowane są jako K(–), pierwsze z nich nie są w stanie skutecznie zmniejszyć poziomu kwasu L-jabłkowego. Przyczyną tego zjawiska jest słabo wykształcony system transportu kwasów u drożdży *S. cerevisiae* oraz niewielkie powinowactwo enzymu jabłkowego do substratu (K<sub>m</sub> = 50 mM). Ponadto, niski stopień degradacji kwasu L-jabłkowego przez drożdże związany jest z mitochondrialną lokalizacją enzymu jabłkowego u *S. cerevisiae*. Wiedza ta odgrywa szczególną rolę w winiarstwie, gdzie pożądanym jest rozkład lub biosynteza L-jabłczanu, będącego jednym z dominujących kwasów zawartych w winie. Degradacja jego nadmiaru w moszczu warunkuje otrzymanie równowagi związanej z odpowiednim stosunkiem kwasów do cukrów, przyczyniającej się do powstania wina o właściwych cechach sensorycznych [15, 21].

\* Autor korespondencyjny: Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków; e-mail: m.cioch@ur.krakow.pl

## 2. Rola kwasu L-jabłkowego w metabolizmie drożdży

Kwas jabłkowy zidentyfikowano po raz pierwszy w 1924 roku, jako produkt fermentacji drożdży. Dotychczas intensywniejszą jego biosyntezę uzyskano u szczepów *S. cerevisiae*, poprzez nadekspresję cytozolowego izoenzymu dehydrogenazy jabłczanowej (Mdh2p). Ostatnie badania wskazują jednak, że drożdże *Zygosaccharomyces rouxii* w środowisku o wysokim stężeniu cukrów są w stanie syntetyzować nawet do 75 g/l L-jabłczanu [34].

Kwas L-jabłkowy odgrywa kluczową rolę w metabolizmie związków C3 i C4 w różnych przedziałach subkomórkowych komórki drożdżowej. W zależności od zapotrzebowania komórki, może on ulegać reakcjom oksydacji, odwadniania czy dekarboksylacji. Utlenianie L-jabłczanu do szczawiooctanu wprowadza go do cyklu TCA lub glukoneogenezy przez fosfoenolopirogronian (PEP). Może on również ulegać reakcji dekarboksylacji do pirogronianu, który wykorzystany jest do tworzenia aminokwasów i innych produktów biosyntezy. Reakcje enzymatyczne cyklu TCA obejmują hydratację fumaranu do L-jabłczanu i jego oksydację do szczawiooctanu za pośrednictwem dehydrogenazy jabłczanowej. Odwracalne uwodnienie fumaranu do L-jabłczanu katalizowane jest przez mitochondrialną fumarazę (kodowana przez gen *FUM1* *S. cerevisiae*). Następnie L-jabłczan ulega reakcji oksydacji do szczawiooctanu, indukowanej przez dehydrogenazę jabłczanową (*S. cerevisiae* MDH1), gdzie akceptorem wodorów jest  $\text{NAD}^+$  [4, 9, 18]. Kwas L-jabłkowy może powstawać również w reakcji kondensacji szczawiooctanu i acetylokoenzymu A (acetylo-CoA) w efekcie czego powstaje cytrynian, który ulega utlenieniu do jabłczanu w cyklu TCA. W przypadku, gdy acetylokoenzym A wytwarzany jest przez dehydrogenazę pirogronianową, a szczawiooctan przez karboksylazę pirogronianową, konwersja glukozy do jabłczanu na drodze oksydacji prowadzi do powstania dwóch cząsteczek  $\text{CO}_2$  [21, 34].

U drożdży *S. cerevisiae* wytwarzanie L-jabłczanu związane jest prawdopodobnie z redukcją szczawiooctanu, który syntetyzowany jest przez biotynozależną karboksylazę pirogronianową. Produkcja kwasu L-jabłkowego przez drożdże powiązana jest ściśle z warunkami ich hodowli, dlatego wysokie stężenie cukru (20–30%), pH bliskie 5,0, ograniczony poziom azotu (100–250 mg N/l), jak również obecność  $\text{CO}_2$  sprzyja temu procesowi. Mimo, że część jabłczanu w winie może być syntetyzowana przez drożdże, wysoki poziom aminokwasów i niskie pH zazwyczaj hamują jego powstawanie. Cykl glioksalowy zachodzący w peroksysomach drożdżowych związany jest przede wszystkim z całkowitą degradacją kwasów tłuszczowych poprzez  $\beta$ -oksydację. W przypadku drożdży *S. cerevi-*

*siae*, peroksymalny jabłczan syntetyzowany z glioksalu, katalizowany jest przez syntazę jabłczanową (MLS). Peroksymalna dehydrogenaza jabłczanu (MDH3) katalizuje redukcję szczawiooctanu do jabłczanu z jednoczesnym utlenianiem  $\text{NADH}$  do  $\text{NAD}^+$  [16].

W związku z tym, że błona peroksysomów jest nieprzepuszczalna dla  $\text{NADH}$  *in vivo*, produkowane są one podczas  $\beta$ -utleniania kwasów tłuszczowych, ulegając deoksydacji wewnątrz tych struktur. Dehydrogenaza jabłczanu katalizuje utlenianie  $\text{NADH}$  do  $\text{NAD}^+$ , zapewniając  $\beta$ -oksydację. Peroksysomy są również nieprzepuszczalne dla szczawiooctanu, dlatego ma miejsce jego konwersja do L-jabłczanu. W cytozolu (MDH2) lub mitochondrium (MDH1) następuje reakcja odwrotna. Dehydrogenaza jabłczanu utlenia L-jabłczan do szczawiooctanu wskutek dalszego metabolizmu [30].

## 3. Rozkład kwasu L-jabłkowego przez drożdże

Występujące w winie szczepy *S. pombe* i *Z. bailli* wykazują zdolność redukcji kwasu L-jabłkowego w obecności glukozy lub innego przyswajalnego źródła węgla. *H. anomala*, *C. sphaerica*, *P. stipitis* i *Pachysolen tannophilus* w przeciwieństwie do powyższych, wykorzystują L-jabłczan jako jedyne źródło węgla, jednak zdolność ta ulega zahamowaniu gdy w środowisku występuje cukier [24]. Większość szczepów *S. cerevisiae* może wykorzystywać L-jabłczan w obecności co najmniej jednego źródła węgla, jednak stopień degradacji przez nie kwasu L-jabłkowego w porównaniu do *S. pombe* jest niewielki. Zdolność drożdży do utylizacji zewnątrzkomórkowego jabłczanu zależna jest od efektywnego transportu kwasu dikarboksyłowego przez błonę komórkową oraz od skuteczności działania wewnątrzkomórkowego enzymu jabłkowego [30]. Do czynników wpływających na skuteczność rozkładu kwasu L-jabłkowego zalicza się również obecność glukozy i dostępność tlenu.

W zależności od gatunku, szczepy *Saccharomyces* są w stanie metabolizować do 3 g/l jabłczanu w procesie winifikacji. Enzym jabłkowy u tych drożdży charakteryzuje się niskim powinowactwem, dlatego większość kwasu jabłkowego rozkładana jest poprzez działalność dehydrogenazy jabłczanowej oraz podczas reakcji utleniania zachodzących w cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA) [22]. Ponadto, niektóre szczepy *Saccharomyces* syntetyzują kwas jabłkowy. Do drożdży skutecznie rozkładających L-jabłczan zalicza się *S. pombe*, *S. malidevorans* i *Z. bailli*. Nie znajdują one jednak zastosowania w redukcji kwasowości win z powodu niepożądanego posmaku, jaki w nim pozostawiają [11].

Drożdże *S. pombe* wykazują wysoką tolerancję wobec znacznych stężeń L-jabłczanu, rozkładając nawet 29 g/l kwasu L-jabłkowego bez negatywnego oddziaływania

na wzrost komórek, metabolizm cukru czy zdolność do produkcji etanolu. Badania wykazały, że jest on całkowicie metabolizowany do alkoholu i  $\text{CO}_2$  w warunkach beztlenowych. Jako drożdże należące do grupy K(-), *S. pombe* rozkładają kwas L-jabłkowy wyłącznie w obecności glukozy lub innego przyswajalnego źródła węgla, zarówno w warunkach aerobowych, jak i anaerobowych. W degradację L-jabłczanu przez *S. pombe* zaangażowane są trzy enzymy – transporter jabłczanu, enzym jabłkowy i mitochondrialna dehydrogenaza jabłczanowa. Pierwszy z nich (*Mae1p*) wykorzystuje system  $\text{H}^+$  do aktywnego transportu L-jabłczanu, podczas gdy NAD – zależny enzym jabłkowy (*Mae2p*) katalizuje oksydacyjną dekarboksylację kwasu L-jabłkowego do pirogronianu i  $\text{CO}_2$ . Mitochondrialna dehydrogenaza jabłczanu (EC 1.1.1.37) utlenia L-jabłczan do szczawiooctanu w cyklu TCA i jest odpowiedzialna w 10% za jego rozkład w warunkach tlenowych [6, 18, 25].

Analiza sekwencji DNA genu jabłkowego *S. pombe* nie wykazała obecności mitochondrialnego sygnału kierowania, co wskazuje na obecność enzymu w cytozolu, gdzie katalizuje on reakcję dekarboksylacji kwasu L-jabłkowego do pirogronianu. Drożdże *S. pombe* nie wykorzystują L-jabłczanu jako jedyne źródła węgla i energii. Oksydacyjna dekarboksylacja kwasu L-jabłkowego oraz redukcja  $\text{NAD}^+$  do NADH dowodzi istotnej roli enzymu jabłkowego w utrzymaniu równowagi redoks w warunkach tlenowych. Ponadto, może on również brać udział w regulacji poziomu wewnątrzkomórkowego jabłczanu oraz zaopatrywać komórkę w NADH lub pirogronian [21, 27].

W toku dalszych badań podjęto próbę skonstruowania rekombinowanego szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zawierającego gen *Schizosaccharomyces pombe* (*Mae1*), mającego charakter przekaźnika przez błonę komórkową kwasów dikarboksylowych oraz enzymu jabłkowego (*Mae2*), występującego na plazmidach drożdży winnych. Otrzymana komórka drożdży *S. cerevisiae* wykazała zdolność degradacji kwasu L-jabłkowego, nie produkując przy tym ubocznych metabolitów, które mogłyby przyczynić się do obniżenia jakości wina [15].

Komórki drożdży *Candida utilis* również skutecznie rozkładają zewnątrzkomórkowy L-jabłczan i fumaran. W przypadku glukozy lub innych przyswajalnych źródeł węgla degradacja tych kwasów zachodzi mniej efektywnie. Analiza molekularna enzymu jabłkowego *C. utilis*, *CME1*, wykazała wysoki stopień homologii genu enzymu jabłkowego *S. pombe* oraz *S. cerevisiae* [18]. Proces dekarboksylacji szczawiooctanu może być prowadzony przez kilka enzymów dekarboksylujących, w tym enzym jabłczanowy zależny od  $\text{NADP}^+$  oraz  $\text{NAD}^+$ . W przypadku dekarboksylacji L-jabłczanu możliwe jest wyłącznie pierwsze z powyższych rozwiązań. W oparciu o specyfikę podłoża oraz

wymagania kofaktorów, enzym jabłczanowy *C. utilis* można sklasyfikować jako oksydoreduktazę L-jabłczanu (EC 1.1.1.38). Analiza sekwencji DNA wykazała brak mitochondrialnego sygnału kierowania, co sugeruje że enzym jabłkowy *C. utilis* jest enzymem cytozolemowym, podobnie jak *S. pombe*. Jednak ekspresja tych dwóch enzymów podlega zupełnie innym sygnałom regulacyjnym [17].

#### 4. Enzym jabłkowy: struktura, funkcja i regulacja

Enzym jabłkowy katalizuje odwracalną reakcję dekarboksylacji L-jabłczanu do pirogronianu i  $\text{CO}_2$ , z jednoczesną redukcją  $\text{NAD(P)}^+$  do  $\text{NAD(P)H}$ . Oprócz dinukleotydu  $\text{NAD(P)}^+$ , wymaga on obecności dwuwartościowych kationów  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , jako kofaktorów. Wysoki stopień homologii z aminokwasami wykazują trzy izoenzymy EC 1.1.1.38-40, jednak istnieją różnice w ich wewnątrzkomórkowej lokalizacji, powinowactwie do substratu oraz swoistości (L-jabłczan i/lub szczawiooctan), a także poziomu, w jakim reakcja dekarboksylacji jest odwracalna [7, 12, 28, 33].

Zazwyczaj skuteczność enzymu jabłkowego określa się na podstawie powinowactwa do substratu i/lub poziomu ekspresji odpowiedniego genu. Enzym jabłkowy *S. pombe* wykazuje bardzo wysokie powinowactwo do substratu ( $K_m = 3,2 \text{ mM}$ ) w przeciwieństwie do *S. cerevisiae* ( $K_m = 50 \text{ mM}$ ). Cytozolemowy enzym jabłkowy *S. pombe* wymaga dwuwartościowych jonów zarówno  $\text{Mn}^{2+}$ , jak i  $\text{Mg}^{2+}$  do pełnej aktywności, w odróżnieniu do drugiego z mikroorganizmów, który preferuje wyłącznie obecność  $\text{Mn}^{2+}$ . Odgrywa on istotną rolę w efektorowej fazie odpowiedzi. Przykładem może być acetylo-CoA, który inhibituje  $\text{NADP}^+$  – zależny enzym jabłkowy [EC 1.1.1.40] *Escherichia coli*, podczas gdy nie oddziałuje na EC 1.1.1.40 *Mucor circinelloides*. Różnorodność regulacji enzymu jabłkowego u poszczególnych organizmów związana jest z jego odmienną rolą fizjologiczną [10, 28].

Pod względem chemicznym, jest on tetrameryczną białkiem o dimerycznej strukturze, którego monomeryczna podjednostka zbudowana jest z czterech domen. Aktywny ośrodek zlokalizowany jest na powierzchni łączącej domeny B i C. U człowieka mitochondrialny enzym jabłkowy, będący egzonukleotydem wiążącym dla inhibitora ATP i miejscem allosterycznym dla aktywatora fumaranu, znajduje się na interfejsach tetrameru i dimeru. Struktury krystaliczne enzymu wskazują, że może on znajdować się w stanie równowagi w dwóch formach, otwartej i zamkniętej, co związane jest bezpośrednio z przemieszczaniem się czterech strukturalnych domen. Wiązanie substratu w miejscu aktywnym przesuwają pierwszą formę do drugiej, która warunkuje zamknięcie enzymu. Związany w miejscu



allosterycznym fumaran indukuje przemianę pomiędzy formami, które pośrednio odpowiedzialne są za przesuwanie domen A i D [5, 33].

Oprócz tego, że występuje on u ssaków, roślin, czy bakterii, obecność jego stwierdzono również w drożdżach *S. pombe*, *Rhodotorula glutinis*, *Z. bailli*, *S. cerevisiae* i *C. utilis*. Cytosolowy enzym jabłkowy *S. cerevisiae*, *C. utilis* i *S. pombe* wykazuje dwufunkcyjność, reagując zarówno z jabłczanem, jak i szczawiooctanem. Enzym jabłkowy *S. pombe* wykorzystuje wyłącznie  $\text{NAD}^+$  (EC 1.1.1.38) jako kofaktor, *S. cerevisiae* natomiast, zarówno  $\text{NAD}^+$ , jak i  $\text{NADP}^+$ , które są akceptorami elektronów. Enzym jabłkowy *C. utilis* użytkuje  $\text{NAD}^+$  lub  $\text{NADP}^+$  w reakcji dekarboksylacji szczawiooctanu, z kolei  $\text{NADP}^+$  w przypadku L-jabłczanu.  $\text{NADP}^+$  – zależne izoformy enzymu jabłkowego odgrywają rolę w biosyntezie lipidów i desaturacji. Nadmierna ilość ATP przyczynia się do przekształcenia acetylokoenzymu A w kwasy tłuszczowe, jako źródło energii. Jednak warunkiem syntezy kwasu tłuszczowego w cytozolu jest przemiana mitochondrialnego acetylokoenzymu A do cytrynianu. W reakcji katalizowanej przez syntazę cytrynianową, acetylokoenzym A łączy się ze szczawiooctanem, a powstały cytrynian transportowany jest z mitochondriów do cytozolu, gdzie z powrotem przekształca się do szczawiooctanu za pośrednictwem liazy cytrynianowej. Szczawiooctan zredukowany jest do L-jabłczanu przez dehydrogenazę jabłczanu. Może on również ulegać utlenieniu do pirogronianu za pośrednictwem enzymu jabłkowego. Przeprowadzone doświadczenia dowodzą, że aktywność enzymu jabłkowego odgrywa kluczowe znaczenie w zapewnieniu maksymalnej akumulacji lipidów. Dotychczasowa identyfikacja izoform  $\text{NADP}^+$  – zależnego enzymu jabłkowego u grzybów oraz ich rozwój w warunkach zwiększonej lipogenezy, wyjaśnia ich rolę w biosyntezie tłuszczów [19].

Enzym jabłkowy charakteryzuje struktura trzeciorzędowa. Występują w nim znaczne różnice związane z własnościami katalitycznymi i mechanizmami regulacyjnymi. Zidentyfikowano w nim osiem wysoce konserwatywnych regionów A-H, pochodzących z organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Regiony te stanowią skupiska reszt oddzielonych od miejsc mniej homologicznych. Cztery z nich wiążą  $\text{NAD(P)}^+$ , jabłczan i dwuwartościowe kationy, podczas gdy znaczenie fizjologiczne pozostałych jest nadal nieznane [25, 26]. Sekwencje aminokwasowe *C. utilis* (*CME1p*), *S. cerevisiae* (*MAE1p*) i *S. pombe* (*Mae2p*) enzymu jabłkowego wykazały różny stopień homologii pomiędzy *CME1p* i *Mae2p* (37%), *CME1p* i *MAE1p* (68%) oraz *MAE1p* i *Mae2p* (47%). Analizy filogenetyczne związków pomiędzy *CME1p* i 44 znanymi enzymami jabłkowymi dowiodły, że enzym jabłkowy *C. utilis* wykazuje zgodność względem *S. pombe* i *S. cerevisiae*. Przeprowa-

dzone doświadczenia potwierdzają fakt, iż homologia sekwencji enzymu jabłkowego z różnych organizmów zależna jest przede wszystkim od związków filogenetycznych pomiędzy nimi, a nie jest wynikiem ograniczeń związanych z właściwościami katalitycznymi i wewnątrzkomórkowej lokalizacji [17].

Enzym jabłkowy indukuje reakcję katalizy przebiegającej w trzech etapach. Pierwszym z nich jest odwodornienie jabłczanu i wytworzenie szczawiooctanu (k1), następnie jego dekarboksylacja do enolopirogronianu (k2) oraz tautomeryzacja enolopirogronianu do pirogronianu (k3). W trakcie oksydacyjnej dekarboksylacji jabłczanu następuje wyodrębnienie protonu z grupy hydroksylowej C2, co w efekcie inicjuje reakcję odwodornienia (k1). Na etapie tautomeryzacji następuje sprotonowanie enolopirogronianu w pozycji C3, celem wyodrębnienia protonu z grupy hydroksylowej C2, który w kompleksie z jabłczanem zostaje skierowany w miejsce C4 pierścienia  $\text{NAD}^+$ . Przemiany te dowodzą stereospecyficzności enzymów jabłkowych dla L-jabłczanu [5].

Na podstawie odmiennej regulacji enzymu jabłkowego w różnych organizmach, tkankach i przedziałach komórkowych, uważa się że pełni on w nich istotne funkcje fizjologiczne. Końcowymi produktami reakcji enzymatycznej są m.in. pirogronian,  $\text{CO}_2$  i  $\text{NAD(P)H}$ , których szlaki biochemiczne określane mogą być jako ścieżki  $\text{NAD}^+$  – zależne enzymy jabłkowe biorące udział w oksydacyjnych procesach metabolicznych czy ścieżki  $\text{NADP}^+$  – zależne enzymy jabłkowe odgrywające rolę w redukcyjnych procesach biosyntezy.  $\text{NAD}^+$  – zależne izoformy enzymu jabłkowego odgrywają zazwyczaj istotną rolę w biosyntezie komórkowej ATP poprzez produkcję  $\text{NADH}$  i pirogronianu.  $\text{NADP}^+$  – zależne izoformy enzymu jabłkowego występującego u bakterii, drożdży, grzybów, biorą udział w reakcjach biosyntezy, szczególnie biosyntezy lipidów i desaturacji [18, 19, 33].

U *S. cerevisiae*  $\text{NADPH}$  tworzony jest w wyniku kilku reakcji – na drodze cyklu pentozofosforanowego (glukoza-6-fosforan i 6-fosfoglukonian dehydrogenazy), poprzez  $\text{NADP}^+$  – zależną izocytrynianową dehydrogenazę, za pomocą  $\text{NADP}^+$  – zależnej dehydrogenazy aldehydowej oraz  $\text{NAD(P)}$  – zależnego enzymu jabłkowego. Mitochondrialny  $\text{NAD(P)}$  – zależny enzym jabłkowy *S. cerevisiae*, *MAE1p*, zlokalizowany jest centralnie w sieci metabolicznej, gdzie zachodzi konwersja jabłczanu (intermediaty cyklu TCA) do pirogronianu z wytworzeniem jednej cząsteczki  $\text{NADPH}$ .  $\text{NAD}^+$  – zależny enzym jabłkowy *S. pombe* odgrywa natomiast istotną rolę w trakcie fermentacji. Wysokie powinowactwo substratu i cytosolowa jego lokalizacja umożliwiają drożdżom skutecznie obniżyć poziom jabłczanu i przekształcić go w etanol [20, 35].

Pirogronian jest kluczowym związkiem pośredniczącym w dysymilacji cukrów oraz prekursorem dla

syntezy aminokwasów, w tym alaniny, L-leucyny, L-izoleucyny oraz waliny [14]. W środowisku o wysokim stężeniu cukrów, pirogronian może być dostarczany przez kinazę pirogronianową (EC 2.7.1.40), enzym katalizujący ostatni etap reakcji glikolizy. U drożdży *S. cerevisiae* zidentyfikowano dwa geny strukturalne (*PYK1* i *PYK2*), kodujące aktywne izoenzymy kinazy pirogronianowej [3]. Obecność cukru warunkuje wzrost aktywności pierwszego z nich oraz możliwość zajścia reakcji transkrypcji *PYK1*. Uaktywniany jest on przez fruktozo-1,6-bisfosforan, w przeciwieństwie do *PYK2*. Transkrypcja drugiego genu podlega represji glukozy. W przypadku wzrostu drożdży *S. cerevisiae* w obecności etanolu lub octanów, kinaza pirogronianu nie odgrywa żadnej roli w dysymilacji. Niemniej jednak, pirogronian nadal musi być wytwarzany (biosynteza aminokwasów), a jego produkcja zachodzić może dwoma drogami. Pierwsza z nich obejmuje syntezę fosfoenolopirogronianu z acetylokoenzymu w cyklu glioksalowym i karboksykinazy fosfoenolopirogronianu. Druga natomiast związana jest z dekarboksylacją jabłczanu do pirogronianu z udziałem enzymu jabłkowego (EC 1.1.1.40) [2].

Dla regulacji poziomu aktywności enzymu jabłkowego zostały opisane różnorakie mechanizmy. Post-transkrypcyjna obróbka mRNA zachodzi w komórkach eukariotycznych, natomiast enzym jabłkowy u grzybów i bakterii jest zwykle regulowany poprzez konkurencję i aktywację innych kwasów dikarboksylowych. Analiza transkrypcji enzymu jabłkowego *S. pombe* wykazała trzy sekwencje dla promotora genu *Mae2*, *UAS1*, *UAS2* i *UAS3* [27]. Transkrypcja *Mae2* u *S. pombe* wywołana została po wzroście stężenia glukozy lub soli. Istnieją dwa poziomy regulacji pracy genu *Mae2* w zależności od stężenia glukozy. Pierwszy poziom obejmuje łagodniejsze regulowanie oddziaływania w odniesieniu do podwyższonego stężenia glukozy (np. 8%). W przypadku wyższych stężeń tego związku (np. 30%) następuje gwałtowniejsza reakcja na pojawiające się warunki stresu osmotycznego (poziom drugi). Obydwa warunki mogą przyczynić się do zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej, czemu można zapobiec poprzez produkcję gliceryny i równoczesne utlenianie NADH do NAD<sup>+</sup>. W celu utrzymania równowagi redoks NAD<sup>+</sup>/NADH w komórce, musi ona zredukować dodatkowe NAD<sup>+</sup> do NADH poprzez działanie enzymu jabłkowego [1, 15, 18].

Degradacja zewnątrzkomórkowego L-jabłczanu podczas fermentacji alkoholowej różni się znacznie pomiędzy poszczególnymi rodzajami *Saccharomyces*. *S. paradoxus* rozkłada od 28% do 38% L-jabłczanu, natomiast *S. cerevisiae* i *S. bayanus* utylizują jedynie 8–17% kwasu L-jabłkowego. Analiza transkrypcyjna wykazała, że ekspresja genu enzymu jabłkowego

*S. paradoxus* i *S. cerevisiae* wzrosła pod koniec procesu fermentacji. W odpowiedzi na zwiększenie ekspresji enzymu jabłkowego, wyłącznie *S. paradoxus* redukuje L-jabłczan w wyższym stężeniu. Biorąc pod uwagę trzy gatunki *Saccharomyces*, prawdopodobne jest, że *S. paradoxus* cechuje się odmiennymi mechanizmami regulacji transkrypcji [15].

Drożdże *C. utilis* wykazały 10-krotny wzrost transkrypcji genu *CME1* w hodowli zawierającej 0,5% jabłczanu jako źródła węgla. Jako kontrolą pozytywną zastosowano pożywkę z glukozą (2%). Aktywność enzymu jabłkowego wzrosła 35-krotnie (w stosunku do glukozy) w obecności L-jabłczanu jako jedyne źródła węgla, co potwierdziło przypuszczenie, że możliwy jest rozkład kwasu L-jabłkowego (mechanizmy indukcji/represji), a jednocześnie transport jabłczanu w *C. utilis* reguluje jego zewnątrzkomórkową degradację [17].

## 5. Genetycznie modyfikowane szczepy *S. cerevisiae* rozkładające kwas L-jabłkowy

Biologiczne odkwaszanie wina z udziałem bakterii kwasu mlekowego postrzegane jest przez winiarzy jako naturalny, spontaniczny proces. Ze względu na nieodłączne problemy towarzyszące wadliwej fermentacji, badane były alternatywne techniki redukcji kwasowości win, w tym heterologiczna koekspresja transportera jabłczanu *S. pombe* (*Mae1*) i genu enzymu jabłkowego (*Mae2*) oraz *Mae1* z genem *Oenococcus oeni* (*MleA*) [31, 32]. Geny kodujące permeazę jabłczanową *S. pombe* (*Mae1*) i gen jabłkowo-mlekowy *O. oeni* (*MleA*) zostały sklonowane i w ostatnich latach poprzez integrację wprowadzone do genomu *S. cerevisiae* S92. Rekombinowany szczep zachował wszystkie cechy i właściwości S92, a także zdolność zakończenia wadliwej fermentacji w początkowym etapie procesu głównego [8]. Nieskuteczna degradacja zewnątrzkomórkowego jabłczanu przez *S. cerevisiae* związana jest z brakiem aktywnego systemu transportu wychwytu L-jabłczanu oraz niskim powinowactwem wewnątrzkomórkowego enzymu jabłkowego. Wewnątrzkomórkowy rozkład kwasu L-jabłkowego przez drożdże *Saccharomyces bayanus* EC1118 uległ poprawie poprzez integrację z genami *S. pombe* *Mae1* i *Mae2* kodującymi transporter L-jabłczanu oraz enzym jabłkowy. Podobnie sklonowano gen enzymu jabłkowego *C. utilis* (*CME1*) i wprowadzono do szczepu drożdży winiarskich wraz z genem transportera jabłczanu *S. pombe* (*Mae1*). Rekombinowany enzym jabłkowy wykazywał aktywność w komórce *S. cerevisiae* i zdolność degradacji szczepu porównywalną do wyników uzyskanych dla koekspresji genów *S. pombe* *Mae1* i *Mae2* w komórce drożdży szlachetnych [8, 17, 18].

## 6. Podsumowanie

Kwasy L-jabłkowy oraz winowy odgrywają istotną rolę w procesie produkcji wina, oddziałując na jego jakość organoleptyczną, a także stabilność fizyczną, biochemiczną oraz mikrobiologiczną. Wiedza na temat charakteru i regulacji jabłkowo-etanolowych dróg rozkładu L-jabłczanu przez drożdże może przyczynić się do poznania bardziej efektywnej metody odkwaszania wina, stając się alternatywą dla fermentacji jabłkowo-mlekowej. Wybór odpowiednich szczepów drożdży, modyfikacja warunków fermentacji, czy nawet wprowadzenie heterologicznego genu do szczepów drożdży winiarskich może skutkować redukcją kwasowości oraz otrzymaniem owocowo-kwiatowych bukietów win, jakimi charakteryzują się m.in. Gewürztraminer czy Riesling. Ponadto, zastąpienie bakterii mlekowych drożdżami wyeliminuje ryzyko produkcji niepożądanych związków, takich jak aminy biogenne czy karbaminian etylu. Dodatkowo, jednoczesne zakończenie procesu fermentacji oraz odkwaszania zmniejszy ryzyko zepsucia wina poprzez jego utlenianie oraz namnażanie się mikroorganizmów. Kolejną korzyścią, jaką niesie za sobą fermentacja jabłkowo-etanolowa jest uzyskanie wyższych poziomów alkoholu etylowego w przypadku produkcji napojów destylowanych.

Odkwaszanie win gronowych z udziałem drożdży stwarza więc możliwość nie tylko obniżenia ich kwasowości, ale również uzyskania pożądaných komponentów smaku i aromatu, kształtując jakość sensoryczną finalnego produktu.

## Piśmiennictwo

- Bakker B.M., Overkamp K.M., Van Maris A.J.A., Kötter P., Luttik M.A.H., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T.: Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 15–37 (2001)
- Boles E., Jong-Gubbels P., Pronk J.T.: Identification and Characterisation of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme. *J. Bacteriol.* **11**, 2875–2882 (1998)
- Bornaes C., Ignjatovic M.W., Schjerling P., Kielland-Brandt M.C., Holmberg S.A.: A regulatory element in the *CHA1* promoter which confers inducibility by serine and threonine on *Saccharomyces cerevisiae* genes. *MCB*, **13**, 7604–7611 (1993)
- Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. 1996. Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York, 1996.
- Chang G-G., Tong L.: Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochem.* **42**, 12721–12733 (2003)
- Grobler J., Bauer F., Subden R.E., Vuuren H.J.J.: The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids. *Yeast*, **11**, 1485–1491 (1995)
- Hsieh J.Y., Chen M.C., Hung H.C.: Determinants of Nucleotide-Binding Selectivity of Malic Enzyme. *Plos One*, **6**, 1–9 (2011)
- Husnik J.I., Volschenk H., Bauer J., Colavizz D., Luo Z., van Vuuren H.J.J.: Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metab. Eng.* **8**, 315–23 (2006)
- Jackson R.S. Wine Science. Principles and Applications. Academic Press, 2008.
- Kendrick A., Ratledge C.: Desaturation of polyunsaturated fatty acids in *Mucor circinelloides* and the involvement of a novel membrane-bound malic enzyme. *J. Biochem.* **209**, 667–673 (1992)
- Kim D-H., Hong Y-A.: Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotech. Lett.* **30**, 1633–1638 (2008)
- Maurino V.G., Wheeler M.C.G., Andreo C.S., Drincovich M.F.: Redundancy is sometimes seen only by the uncritical: does *Arabidopsis* need six malic enzyme isoforms? *Plant Sci.* **176**, 715–721 (2009)
- Queiros O., Casal M., Althoff S., Morades-Ferreira P., Leão C.: Isolation and characterization of *Kluyveromyces marxianus* mutants deficient in malate transport. *Yeast*, **14**, 401–407 (1998)
- Pronk J.T., Steensma H.Y., Dijken J.P.: Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 1607–1633 (1996)
- Redzepovic S., Orlic S., Majdak A., Kozina B., Volschenk H., Viljoen-Bloom M.: Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microb.* **83**, 49–61 (2003)
- Roermund C.W.T., Elgersma Y., Singh N., Wanders R.J.A., Tabak H.F.: The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under *in vivo* conditions. *EMBO J.* **14**, 3480–3486 (1995)
- Saayman M., Viljoen-Bloom M.: The Biochemistry of Malic Acid Metabolism by Wine Yeasts – A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **27**, 2, 113–122 (2006)
- Saayman M., Van Zyl W.H., Viljoen-Bloom M.: Cloning, characterization and heterologous expression of the *Candida utilis* malic enzyme gene. *Curr. Genet.* **49**, 248–258 (2006)
- Song Y., Wynn J.P., Li Y., Grantham D., Ratledge C.: A pre-genetic study of the isoforms of malic enzyme associated with lipid accumulation in *Mucor circinelloides*. *Microbiol.* **147**, 1507–1515 (2001)
- Sousa M.J., Mota M., Leão C.: Transport of malic acid in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for a proton-dicarboxylate symport. *Yeast*, **8**, 1025–1031 (1992)
- Su J., Wang T., Wang Y., Li Y.Y., Li H.: The use of lactic acid-producing, malic acid-producing, or malic acid-degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 2395–2413 (2014)
- Subden R.E., Krizus A., Osothsilp C., Viljoen M., Vuuren H.J.J.: Mutational analysis of malate pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *Food Res. Int.* **31**, 37–42 (1998)
- Thornton R.J., Rodriguez S.B.: Deacidification of red and white wines by a mutant of *Schizosaccharomyces malidevorans* under commercial winemaking conditions. *Food Microbiol.* **13**, 475–482 (1996)
- Van Zyl W.H., Viljoen-Bloom M.: Cloning, characterization and heterologous expression of the *Candida utilis* malic enzyme gene. *Curr. Genet.* **49**, 248–258 (2006)
- Viljoen M., Subden R.E., Krizus A., Vuuren H.J.J.: Molecular analysis of the malic enzyme gene (*mae2*) of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **10**, 613–624 (1994)
- Viljoen M., Merwe M., Subden R.E., Vuuren H.J.J.: Mutation of Gly-444 inactivates the *S.pombe* malic enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**, 157–162 (1998)
- Viljoen M., Volschenk H., Young R.A., Vuuren, H.J.J.: Transcriptional regulation of the *Schizosaccharomyces pombe* malic enzyme gene, *mae2*. *J. Biol. Chem.* **274**, 9969–9975 (1999)

28. Voegelé R.T., Mitsch M.J., Finan T.M.: Characterization of two members of a novel malic enzyme class. *Biochem. Biophys. Acta*, **1432**, 275–285 (1999)
29. Volschenk H., Viljoen M., Grobler J., Petzold B., Bauer F., Subden R.E., Young R.A., Lonvaud A., Denayrolles M., Vuuren H.J.J.: Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotech.* **15**, 253–257 (1997)
30. Volschenk H., van Vuuren H.J.J., Viljoen-Bloom M.: Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Curr. Genet.* **43**, 379–391 (2003)
31. Volschenk H., Viljoen-Bloom M., Van Staden J., Husnik J., Vuuren H.J.J.: Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharomyces bayanus* for malic acid degradation via an efficient malo-ethanolic pathway. *S. Afr. J. Enol. Vinic.* **25**, 63–73 (2004)
32. Volschenk H., Vuuren H.J.J., Viljoen-Bloom M.: Malic acid in wine: Origin, function and metabolism during vinification. *S. Afr. J. Enol. Vinic.* **27**, 123–136 (2006)
33. Xu Y., Bhargava G., Wu H., Loeber G., Tong L.: Crystal structure of human mitochondrial NAD(P)<sup>+</sup>-dependent malic enzyme: a new class of oxidative decarboxylases. *Structure*, **7**, 877–889 (1999)
34. Zelle R.M., Hulster E., Winden W.A., Waard P., Dijkema C., Winkler A., Geertman J.M.A., Dijken J.P., Pronk J.T., Maris A.J.A.: Malic Acid Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Engineering of Pyruvate Carboxylation, Oxaloacetate Reduction and Malate Export. *Appl. Environ. Microbiol.* **9**, 2766–2777 (2008)
35. Zelle R.M., Harrison J.C., Pronk J.T., Maris A.J.A.: Anaplerotic Role for Cytosolic Malic Enzyme in Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 732–738 (2011)