

Otrzymywanie międzyrodzajowych hybrydów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* na drodze fuzji protoplastów

Alina Kunicka

Józef S. Szopa

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Politechnika Łódzka

Łódź

1. Wprowadzenie

Nadmierna kwasowość moszczów i win owocowych, spowodowana głównie obecnością kwasu jabłkowego, stanowi istotny problem w polskim winiarstwie. W procesie produkcji wina konieczne jest usunięcie od 40 do 60% tego kwasu, w zależności od początkowej kwasowości moszczu. Metody obniżenia kwasowości przez rozcieńczanie i kupażowanie (1) oraz na drodze chemicznej neutralizacji kwasu (2) nie zawsze dają pożądane rezultaty. Biologiczna degradacja kwasu L-jabłkowego może być prowadzona zarówno przez bakterie mlekowe *Leuconostoc oenos* i *Lactobacillus plantarum* (3), jak i drożdże rozszczepkowe *Schizosaccharomyces pombe* (4,5). Również niektóre szczepy drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae* prowadzą beztlenową biodegradację kwasu L-jabłkowego, lecz jego rozkład jest zawsze niecałkowity i zależnie od szczepu waha się od 5 do 40% (6).

Drożdże rozszczepkowe *S. pombe* znalazły zastosowanie w winiarstwie ze względu na utylizację 80-100% kwasu jabłkowego zawartego w podłożu fermentacyjnym (5,6). Jednakże wprowadzenie do procesu fermentacji win innych mikroorganizmów niż drożdże *S. cerevisiae* wiąże się zwykle z występowaniem niekorzystnych interakcji pomiędzy populacjami oraz wytwarzaniem związków powodujących niepożądane zmiany właściwości organoleptycznych końcowego produktu (7,8).

Połączenie cech biochemicznych i technologicznych drożdży winiarskich *S. cerevisiae* i rozszczepkowych *S. pombe* w jednym organizmie umożliwiłoby beztlenową biodegradację znacznych ilości kwasu L-jabłkowego zawartego w środowisku fermentacyjnym, równocześnie z prawidłowo prowadzoną fermentacją główną.

Szerokie możliwości konstrukcji nowych ras drożdży stwarza metoda fuzji protoplastów lub sferoplastów, polegająca na połączeniu dwóch komórek różnych szczepów mikroorganizmów, całkowicie lub częściowo pozbawionych ściany komórkowej. Fuzja protoplastów może być stosowana niezależnie od ploidalności lub typu koniugacyjnego oraz stopnia pokrewieństwa filogenetycznego drożdży (9). Wyjściowe kultury drożdży stosowane w procesie powinny charakteryzować się cechami komplementarnymi, pozwalającymi na łatwe odróżnienie produktów fuzji od komórek szczepów rodzicielskich. W przypadku szczepów laboratoryjnych o wyznaczonych markerach genetycznych (np. określone wymagania pokarmowe — auksotrofia), identyfikacja hybrydów prowadzona jest przy zastosowaniu odpowiednich podłoży, jako selekcja bezpośrednia (10).

Do usuwania ściany komórkowej drożdży używane są kompleksy enzymatyczne pochodzenia naturalnego, a stopień protoplastyzacji zależy od rodzaju szczepów drożdży, wieku kultur i warunków hodowli oraz optymalizacji stężenia i czasu działania enzymu (11). Uniwersalnym fuzogenem jest glikol polietylenowy (PEG) w zakresie stężeń 25-40%, a obecność jonów wapnia w środowisku inicjuje proces fuzji i znacznie zwiększa jej efektywność (10,12). Regeneracja protoplastów prowadzona jest na podłożach stałych w obecności stabilizatora osmotycznego.

Celem prowadzonych badań była próba konstrukcji międzyrodzajowych hybrydów drożdży przez fuzję protoplastów auksotroficznych szczepów *S. cerevisiae* i *S. pombe*, dokonanie charakterystyki cech fizjologicznych i biochemicznych otrzymanych mieszańców, jak również ocena zdolności mieszańców do beztlenowej biodegradacji kwasu L-jabłkowego w podłożu modelowym.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał biologiczny

W badaniach wykorzystano:

1) haploidalny auksotroficzny szczep drożdży *S. cerevisiae* SP20 leu1 ade1 a, pochodzący z kolekcji Instytutu Nauk Rolniczych w Zamościu, wykazujący jedynie tlenowy rozkład kwasu L-jabłkowego,

2) haploidalny auksotroficzny szczep drożdży rozszczepkowych *S. pombe* met3-15 h⁺ otrzymany z kolekcji Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego, wykazujący wysoki stopień rozkładu kwasu L-jabłkowego zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych.

2.2. Podłoża hodowlane

Przechowywanie i namnażanie biomasy drożdży *S. cerevisiae* prowadzono na standardowym podłożu YPG (13), natomiast drożdże *S. pombe* przechowywano i namnażano na podłożu YEL wg Gutza i wsp. (14).

Do sprawdzenia stopnia protoplastyzacji stosowano podłoże minimalne z dodatkiem stabilizatora osmotycznego (15).

Selekcji produktów fuzji zdolnych do utylizacji kwasu L-jabłkowego w warunkach tlenowych dokonano na podłożu MGIA wg Osothsilp i Subden (16). Kolonie szczepów drożdży metabolizujących kwas L-jabłkowy zabarwiały się na kolor niebieski.

2.3. Otrzymywanie i fuzja protoplastów

Protoplasty drożdży *S. cerevisiae* otrzymano przez enzymatyczną hydrolizę ścian komórkowych, stosując enzym lityczny *Helix pomatia* (15) o stężeniu 10 mg/cm^3 w $0,6 \text{ M KCl}$. Do usunięcia ścian komórkowych drożdży *S. pombe* użyto preparatu Novozym 234 (enzymu litycznego *Trichoderma harzianum*) firmy Sigma w stężeniu 3 mg/cm^3 w $0,9 \text{ M}$ roztworze sorbitolu, wg procedury podanej przez Sipiczki i wsp. (17).

Fuzję przeprowadzono w 35% roztworze glikolu polietylenowego PEG 4000 w 10 mM CaCl_2 , inkubując zawiesinę w temperaturze 37°C w czasie 20 min (18). Zawiesinę protoplastów wysiewano włącznie do podłoża MGIA.

2.4. Badanie aktywności dehydrogenazy L-jabłczanowej

Aktywność dehydrogenazy L-jabłczanowej w warunkach tlenowych badano metodą spektrofotometryczną na podstawie redukcji błękitu tetrazolu (19).

2.5. Badanie cech fizjologicznych i biochemicznych drożdży

Badanie podstawowych cech fizjologicznych i biochemicznych szczepów rodzicielskich oraz wyselekcjonowanych hybrydów przeprowadzono wg metodyki opisanej przez Lodder i wsp. (13). W badaniach uwzględniono asymilację i fermentację cukrów (glukozy, galaktozy, sacharozy, maltozy, laktozy, melibiozy, rafinozy i trehalozy) oraz asymilację glicerolu, etanolu i azotanów oraz zdolność do wytwarzania enzymu ureazy i tworzenia zarodników.

2.6. Badanie zdolności biodegradacji kwasu L-jabłkowego w warunkach beztlenowych

Beztlenowy rozkład kwasu L-jabłkowego badano w podłożu modelowym YG z zawartością 10% glukozy i 0,7% kwasu L-jabłkowego (20) w objętości 110 cm^3 podłoża. Próby inkubowano w ciągu 7 dni w temperaturze 30°C .

2.7. Oznaczanie zawartości kwasu L-jabłkowego

Zawartość kwasu L-jabłkowego w podłożu hodowlanym oraz medium pochodowlanym oznaczano metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC), wykorzystując wysokociśnieniowy chromatograf cieczowy szwedzkiej

firmy LKB. Rozdział prowadzono w temperaturze otoczenia, stosując kolumnę Supercosil LC-18, o wymiarach $250 \times 4,6$ mm i wielkości ziaren wypełnienia $5 \mu\text{m}$. Fazę ruchomą stanowił 1% roztwór KH_2PO_4 o $\text{pH} = 3,5$, przepływający z szybkością $0,8 \text{ cm}^3/\text{min}$ (21).

2.8. Określanie zawartości etanolu

Zawartość alkoholu etylowego oznaczano metodą enzymatyczną za pomocą testów firmy Boehringer Mannheim (22).

3. Omówienie wyników

Podjęto próbę hybrydyzacji somatycznej auksotroficznych haploidalnych szczepów drożdży *S. cerevisiae* SP20 *adel leu1 a* i *S. pombe* *met3-15 h⁺*. Wybór szczepu *S. cerevisiae* SP20 nie degradującego kwasu L-jabłkowego w anaerobiozie pozwala stwierdzić, że zdolność fermentacji tego kwasu wykazywana przez skonstruowane hybrydy międzyrodzajowe pochodziła jedynie od rodzicielskiego szczepu drożdży rozszczepkowych.

Z powodu trudności w usunięciu ścian komórkowych drożdży *S. pombe* za pomocą enzymu litycznego *Helix pomatia*, zastosowano roztwór preparatu Novozym 234, co pozwoliło na osiągnięcie wysokiego stopnia protoplastyzacji, wynoszącego 99,3%. W przypadku drożdży *S. cerevisiae* osiągnięto 100% stopień protoplastyzacji. Stwierdzono, że stopień regeneracji protoplastów drożdży rozszczepkowych był nieznacznie wyższy (34,6%) w porównaniu ze szczepem *S. cerevisiae* (32,2%). Częstość fuzji wynosiła $5,2 \times 10^{-4}$.

Zastosowano trójstopniowy system selekcji hybrydów:

- podłoże regeneracyjno-selekcyjne MGIA do regeneracji produktów fuzji,
- selekcję hybrydów na podstawie obserwacji cech morfologicznych i sposobu rozmnażania wegetatywnego,
- badanie aktywności dehydrogenazy L-jabłczanowej w warunkach tlenowych.

Po fuzji wyizolowano 250 szczepów zdolnych do aerobowego rozkładu kwasu L-jabłkowego, tworzących granatowe kolonie na podłożu minimalnym MGIA zawierającym kwas L-jabłkowy i zielen bromokrezolową.

Na podstawie obserwacji cech morfologicznych oraz sposobu rozmnażania wegetatywnego do dalszej analizy wybrano 67 hybrydów, spośród których jedynie 14 szczepów wykazywało w warunkach tlenowych zwiększenie aktywności dehydrogenazy L-jabłczanowej o 1,1-39,1% w porównaniu z aktywnością haploidalnego szczepu SP20 i o 3,6-86,5% w odniesieniu do drożdży rozszczepkowych.

Wyselekcjonowane mieszańce międzyrodzajowe znacznie różniły się morfologicznie od form rodzicielskich, tworząc wydłużone komórki o kształcie zbliżonym do komórek drożdży rozszczepkowych *S. pombe*. U wszystkich hybrydów obserwowano rozmnażanie przez rozszczepianie, typowe dla *S. pombe*; z równoczesnym tworzeniem paczków, charakterystycznym dla drożdży



Fot. 1. Mieszanec międzyrodzajowy 31MS (*S. cerevisiae* SP20 leu1 ade1 a × *S. pombe* met3-15 h+); A — rozmnażanie przez rozsiewanie, B — rozmnażanie przez pączkowanie.



Fot. 2. Szczep haploidalny *S. cerevisiae* SP20 leu1 ade1 a.



Fot. 3. Szczep haploidalny *S. pombe* met3-15 h⁺.

S. cerevisiae. W jednej komórce obserwowano obydwa sposoby rozmnażania, przy czym przegrody występowały zarówno w miejscu tworzenia pączka, jak i w środkowej części komórki. U niektórych mieszańców odnotowano boczne pączkowanie komórek, przypominające mycelialny typ podziału. Sposób rozmnażania wegetatywnego hybryda 31 MS przedstawiono na fotografii 1. Dla porównania na fotografiach 2 i 3 zobrazowano morfologię komórek szczepów rodzicielskich.

Na podstawie przeprowadzonych badań cech fizjologicznych otrzymanych hybrydów stwierdzono, że podobnie jak szczepy rodzicielskie, wykazywały one uzdolnienia do fermentacji glukozy, sacharozy i rafinozy w 1/3. Mieszańce, w odróżnieniu od szczepu SP20 nie fermentowały galaktozy, a niektóre z nich prowadziły jej asymilację. Podobnie jak u drożdży *S. cerevisiae*, obserwowano asymilację melibiozy prowadzoną przez hybrydy, pomimo braku tej cechy u *S. pombe*. 9 szczepów zachowało uzdolnienia do asymilacji etanolu i glicerolu, analogicznie jak haploid SP20.

Hybrydy wykazywały zdolność tworzenia 2-4 zarodników w worku. Obecność enzymu ureazy, charakterystyczną dla drożdży rozszczepkowych, stwierdzono u wszystkich mieszańców. Cechy fizjologiczne międzyrodzajowych hybrydów drożdży oraz organizmów rodzicielskich podano w tabeli 1.

Aktywność fizjologiczną 14 wybranych hybrydów międzyrodzajowych w procesie beztlenowego rozkładu kwasu L-jabłkowego badano w podłożu modelowym, zawierającym 0,7% kwasu L-jabłkowego i 10% dodatek glukozy. Szczepy mieszańców fermentowały od 84,31 do 97,77% L-jabłczanu, równocześnie wytwarzając od 3,8 do 5,5% objętościowych etanolu, o 0,4-2,1%

TABELA 1
CECHY FIZJOLOGICZNE MIĘDZYRODZAJOWYCH HYBRYDÓW DROŻDŻY WINIARSKICH W ODNIESIENIU DO SZCZEPÓW RODZIELSKICH

Nazwa szczepu	Glukoza	Galaktoza	Maltoza	Laktoza	Sacharoza	Melibioza	Rafinoza 1/3	Trehaloza	Etanol	Glicerol	Azotany	Tworzenie zarodników	Tworzenie ureazy
SP20	F+A	F+A	A	NA	F+A	NA	F+A	A	A	A	NA	—	—
met3-15	F+A	NA	A	A	F+A	A	F+A	NA	NA	NA	NA	—	+
3MS	F+A	A	A	NA	F+A	A	F+A	A	NA	NA	NA	2-4	+
4MS	F+A	A	A	NA	F+A	A	F+A	A	A	A	NA	2-4	+
6MS	F+A	NA	A	NA	F+A	A	F+A	A	A	A	NA	2-4	+
8MS	F+A	A	A	NA	F+A	A	F+A	NA	A	A	NA	2-4	+
12MS	F+A	A	A	NA	F+A	A	F+A	NA	NA	NA	NA	2-4	+
27MS	F+A	NA	A	NA	F+A	A	F+A	NA	A	A	NA	2-4	+
31MS	F+A	A	A	NA	F+A	A	F+A	A	NA	NA	NA	2-4	+
34MS	F+A	A	A	A	F+A	A	F+A	A	A	A	NA	2-4	+
38MS	F+A	A	A	A	F+A	A	F+A	A	NA	NA	NA	2-4	+
40MS	F+A	NA	A	A	F+A	A	F+A	NA	A	A	NA	2-4	+
45MS	F+A	NA	A	NA	F+A	A	F+A	NA	A	A	NA	2-4	+
72MS	F+A	A	A	NA	F+A	A	F+A	NA	NA	NA	NA	2-4	+
80MS	F+A	A	A	NA	F+A	A	F+A	NA	A	A	NA	2-4	+
217MS	F+A	A	A	A	F+A	A	F+A	A	A	A	NA	2-4	+

Oznaczenia: F+A — fermentacja, A — asymilacja, NA — brak asymilacji i fermentacji.

objętościowych mniej niż organizmy rodzicielskie. Jedynie 3 szczepy: 27MS, 31MS i 217MS charakteryzowały się zwiększonym stopniem rozkładu kwasu L-jabłkowego w odniesieniu do drożdży *S. pombe*. Drożdże 27MS utylizowały 97,67% tego kwasu, równocześnie produkując 4,4% objętości etanolu. W porównaniu z drożdżami *S. pombe* met3-15 h⁺, obserwowano zwiększenie wykorzystania kwasu o 4,34%. Wydajność hybryda w produkcji etanolu wynosiła 26,04 i była podobna jak dla szczepów wyjściowych.

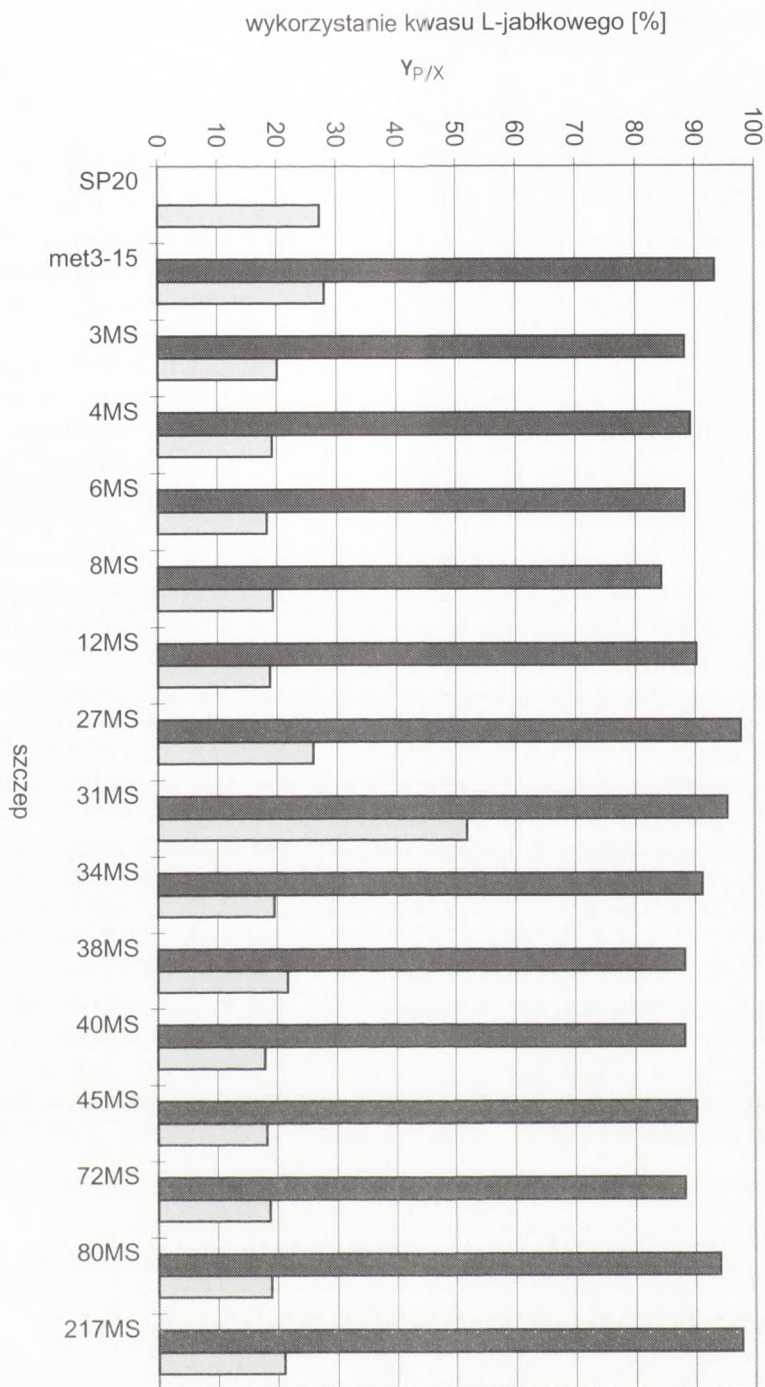
Hybryd 31MS degradował 95,45% kwasu L-jabłkowego, a jego aktywność biosyntetyczna $Y_{P/X}$ była dwukrotnie wyższa niż dla szczepów rodzicielskich i wynosiła 51,82.

Największą spośród hybrydów ilość kwasu metabolizował mieszaniec 217MS. Przy biodegradacji 97,77% kwasu L-jabłkowego ilość etanolu zawartego w podłożu była równa 5,5% objętości. Nieznacznie niższa wartość współczynnika $Y_{P/X}$ hybryda (21,05) związana była z przyrostem biomasy o 24,7% wyższym niż odnotowany dla szczepów rodzicielskich. Aktywność hybrydów w procesie fermentacji kwasu L-jabłkowego przedstawiono w tabeli 2 i na rysunku 1.

TABELA 2
AKTYWNOŚĆ FIZJOLOGICZNA MIĘDZYRODZAJOWYCH HYBRYDÓW DROŹDZY *S. cerevisiae* I *S. pombe*
W WARUNKACH BEZTLENOWYCH

Nazwa szczepu	Wykorzystanie kwasu L-jabłkowego (%)	Poziom etanolu (% obj.)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$
SP20	0	5,7	0,142	27,22
met3-15	93,33	5,9	0,0150	28,00
3MS	88,23	4,5	0,0199	20,04
4MS	89,21	4,6	0,0217	19,15
6MS	88,23	4,2	0,0216	18,28
8MS	84,31	4,4	0,0205	19,32
12MS	90,19	4,2	0,0198	18,82
27MS	97,67	4,4	0,0140	26,04
31MS	95,45	5,0	0,0076	51,82
34MS	91,17	4,6	0,0208	19,52
38MS	88,23	4,8	0,0200	21,70
40MS	88,23	4,2	0,0207	17,87
45MS	90,19	3,8	0,0193	18,20
72MS	88,23	4,6	0,0222	18,64
80MS	88,88	4,0	0,0207	18,87
217MS	97,77	5,5	0,0194	21,05

Podłoże z dodatkiem 10% glukozy i 0,7% kwasu L-jabłkowego (7 dni, 30°C)

Rys. 1. Beztlenowa biodegradacja kwasu L-jabłkowego przez międzyrodzajowe hybrydy drożdży *S. cerevisiae* i *S. pombe*.

4. Podsumowanie

W wyniku hybrydyzacji somatycznej przy zastosowaniu metody fuzji protoplastów auktotroficznych haploidalnych szczepów drożdży *S. cerevisiae* i *S. pombe* otrzymano 14 międzyrodzajowych hybrydów, wykazujących zdolność do beztlenowego rozkładu kwasu L-jabłkowego. Dzięki zbliżonej wartości stopnia protoplastyzacji obu szczepów rodzicielskich, w procesie fuzji stosunek komórek obu partnerów wynosił 1:1. Stopień regeneracji drożdży rozszczepkowych był podobny jak w przedstawionych danych literaturowych, natomiast drożdże *S. cerevisiae* charakteryzowały się wyższą zdolnością regeneracji ściany komórkowej (18).

Ze względu na znacznie różniące się cechy morfologiczne komórek drożdży rodzicielskich oraz odmienny sposób rozmnażania wegetatywnego, właściwości te przyjęto jako jedno z kryteriów selekcji stabilnych produktów fuzji. W danych literaturowych (18,23) wskazuje się, że hybrydy międzyrodzajowe drożdży zróżnicowanych morfologicznie mogą przyjmować kształt tylko jednego z organizmów wyjściowych, przy czym autorzy nie znaleźli przekonujących dowodów genetycznych potwierdzających istnienie tych mieszańców.

Hybrydy międzyrodzajowe łączyły dwa sposoby rozmnażania wegetatywnego, tworząc komórki rozmnażające się zarówno przez pączkowanie (typowe dla *S. cerevisiae*), jak i rozszczepianie (charakterystyczne dla *S. pombe*). Odnotowano zdolność wszystkich hybrydów do tworzenia spor. Podobny obraz morfologii komórek i sposobu rozmnażania mieszańców otrzymanych w wyniku krzyżowania szczepów auktotroficznych diploidalnych drożdży *S. cerevisiae* i haploidalnego szczepu *S. pombe* podaje Kosikov i Medvedeva (24).

Spośród 14 wyselekcjonowanych hybrydów międzyrodzajowych, charakteryzujących się beztlenową biodegradacją kwasu L-jabłkowego od 84,31 do 97,77%, trzy szczepy wykazywały nieznaczny wzrost aktywności rozkładu w porównaniu z *S. pombe*.

Na podstawie badań cech fizjologicznych stwierdzono, że mieszańce wykazywały nie tylko zdolność anaerobowego metabolizowania kwasu L-jabłkowego i obecność enzymu ureazy, charakterystyczne jedynie dla drożdży rozszczepkowych, ale również zdolność do asymilacji melibiozy pochodząca od szczepu *S. cerevisiae*. Konstrukcja somatycznych hybrydów międzyrodzajowych (25) prowadzi do połączenia w jednym organizmie cech obu szczepów rodzicielskich, co stanowi potwierdzenie dokonania się procesu fuzji komórek.

Literatura

1. Czyżycki A., Pogorzelski E., Łukawska-Pietrzak Z., Włodarczyk M., Wieczorek A., (1991), Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., 35, 15-16.
2. Munyon J. R., Nagel C. W., (1977), Am. J. Enol. Vitic., 28, 79-87.
3. Pulver D., Hoffman P., Gafner J., (1992), Schw. Z. Obst-u. Weinbau, 128, 650-655.
4. Taillandier P., Riba J. P., Strehaiano P., (1988), Biotechnol. Lett., 10, 459-472.
5. Taillandier P., Gilis M., Strehaiano P., (1995), J. Biotechnol., 40, 199-205.
6. Fuck E., Radler F., (1972), Arch. Mikrobiol., 87, 149-164.

7. Czyżycki A., Łukawska-Pietrzak Z., Pogorzelski E., Włodarczyk M., (1989), *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 33, 13-16.
8. Rodopulo A. K., Egorov I. A., (1987), *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 23, 833-836.
9. Stewart G. G., (1981), *Can. J. Microbiol.*, 27, 973-990.
10. Peberdy J. F., (1980), *Enzyme Microb. Biotechnol.*, 2, 23-29.
11. Kumari J. A., Panda T., (1992), *Bioprocess Eng.*, 7, 349-355.
12. Stewart G. G., Russel I., (1985), *The Biology of Saccharomyces*, in: *Biology of Industrial Microorganisms*, Eds. Demain A. L., Solomon N. A., The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc., London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sydney, Tokyo, 511-536.
13. Lodder J., Kreger van Rij N. J. W., (1971), *The Yeasts. A Taxonomic Study*, ed. 2, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London.
14. Gutz H., Heslot H., Leupold U., Loperino N., (1974), *Schizosaccharomyces pombe*, in: *Handbook of Genetics*, vol. 1, Ed. King R. C., Plenum Press, New York, London, 395-446.
15. Szopa J. S., Kowal K., Zwoliński G., Sikorski L., Mosiński F., Gańczyk B., (1990), *Acta Alim. Polon.*, 1-2, 39-44.
16. Osothsilp C., Subden R. E., (1986), *Can. J. Microbiol.*, 32, 481-486.
17. Sipiczki M., Heyer W. D., Kohli J., (1985), *Curr. Microbiol.*, 12, 169-174.
18. Svoboda A., (1980), *Intergeneric Fusion of Yeast Protoplasts: Saccharomyces cerevisiae + Schizosaccharomyces pombe*, in: *Advances in Protoplast Research*, Eds. Ferenczy L., Farkas G. L., Pergamon Press, Oxford, 119-124.
19. Kusewicz D., Piątkiewicz A., (1970), *Postępy Mikrobiologii*, 9, 563-567.
20. Taillandier P., Riba J. P., Strehaiano P., (1988), *Biotechnol. Lett.*, 10, 459-472.
21. Coppola E. D., Starr M. S., (1986), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 594-597.
22. Bentler H. O., (1984), *Enzymatic Determination of Ethanol*, in: *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. VI, Ed. Bergmeyer H. U., Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel, 598-606.
23. Provost A., Bourguignon C., Fournier P., Ribet A. M., Heslot H., (1978), *FEMS Microbiol. Lett.*, 3, 309-312.
24. Kosikov K. V., Medvedeva A. A., (1979), *Mikrobiol.*, 48, 887-893.
25. Halmane H., Spencer J. F. T., Spencer D., DeFigueroa L., Callieri D. A. S., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 98-100.

Intergeneric yeasts hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* obtained by protoplasts fusion

Summary

The intergeneric hybrids between *S. cerevisiae* and *S. pombe* auxotrophic mutants strains using the method of protoplasts fusion were obtained. Typical biochemical and physiological properties of both parental strains during hybrids examinations were observed, although the cell shapes were similar to fission yeasts. Simultaneous budding and dividing abilities during vegetative hybrids reproduction were noted. A good ability of L-malate biodegradation in fermentation process that reached 88.23-97.67% was claimed. All features expressed by intergeneric hybrids served convincing evidence of hybridization process.

Key words:

Saccharomyces cerevisiae, *Schizosaccharomyces pombe*, intergeneric hybrids, L-malic acid.

Adres do korespondencji:

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