

Tvorba extracelulárnych organických kyselín mutantami kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*

EVA KACLÍKOVÁ

SÚHRN. Organické kyseliny, významné potravinárske aditíva, produkujú kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ako intermediáty citrátového cyklu. Štúdium mutantov s defektom v aktivite enzýmov citrátového cyklu prispieva k objasneniu regulácie ich tvorby. Mutant s defektom v aktivite 2-oxoglutarátdehydrogenázového komplexu (*ogd1*, *kgd1*) a mutant s defektom v aktivite fumarázy (*fum1*), ktoré boli biochemicky charakterizované, sa vyznačovali úplnou stratou aktivity príslušného enzýmu a zvýšenou acidifikačnou schopnosťou svojich kolónií. Na sledovanie tvorby organických kyselín bunkami mutantov v porovnaní so štandardnými kmeňmi sa použila metóda HPLC. Analýzou kultivačného média sa zistilo 1,5 až 2,5-násobné zvýšenie tvorby pyruvátu a 6-násobné zvýšenie tvorby fumarátu u mutantu *ogd1* (*kgd1*) a 15 až 25-násobné zvýšenie tvorby fumarátu u mutantu *fum1*, v závislosti od kultivačných podmienok.

Organické kyseliny nesporne patria medzi významné potravinárske aditíva. Kyseliny jablčná, fumarová a jantárová predstavujú esenciálne chuťové zložky alkoholických nápojov, akými sú vína [1]. Približne 70 % organických kyselín v sáke (japonské ryžové víno), vrátane kyseliny jablčnej a jantrovej, produkujú kvasinky počas fermentácie [2]. Kyselina jablčná a vínna sú v hroznovom mušte a víne hlavné organické kyseliny a na mikrobiologickú deacidifikáciu sa využívajú vhodné kmene kvasiniek schopné degradovať kyselinu jablčnú počas fermentácie vína [3].

Kvasinky *S. cerevisiae* syntetizujú organické kyseliny hlavne dráhami citrátového cyklu, ktorý je lokalizovaný v mitochondriách. Mechanizmus produkcie kyseliny jablčnej a ďalších organických kyselín v kvasinkách *S. cerevisiae* nie je ešte celkom objasnený [2]. Selekcia vhodných kmeňov kvasiniek umožňuje modifikovať senzorické vlastnosti vín, a tým je dôležitá pre ich kvalitu [4].

Pre racionálne využitie kvasiniek ako priemyselných mikroorganizmov, produkujúcich cieľene požadované intermediáty svojho metabolizmu, je nevyhnutné štúdium regulácie metabolizmu ich buniek. Biochemické mutanty

S. cerevisiae významne prispievajú k prehĺbovaniu poznatkov o ich štruktúre, funkcii a regulácii ich metabolizmu. Jednu zo skupín mutantov so zmeneným katabolizmom tvoria jadrové mutanty s defektom v aktivite enzýmov citrátového cyklu. Je veľký počet publikovaných prác, ktoré sa zaoberajú mutáciami spôsobujúcimi defekty v aktivitách enzýmov citrátového cyklu s cieľom zvýšiť produkciu, alebo regulovať tvorbu organických kyselín v priebehu fermentácie. S cieľom zlepšiť vlastnosti kmeňa kvasiniek *S. cerevisiae* používaného pri výrobe saké Magarifuchi a kol. [2] pripravili prerušením jadrového génu *FUM1* kódujúceho fumarázu v *S. cerevisiae* mutantu a sledovali vplyv straty aktivity fumarázy na produkciu kyseliny jablčnej, fumarovej a jantárovej. UV mutagenézu a následnú selekciu použili McKay a kol. [5] na zvýšenie produkcie kyseliny citrónovej z glukózy, pričom konkurenčná tvorba kyseliny 2-oxoglutarovej naznačila, že inaktivácia 2-oxoglutarátdehydrogenázy môže mať vplyv na nadprodukciu kyseliny citrónovej kvasinkami. Inaktivácia fumarázy sa uplatňuje pri efektívnejšej produkcii L-alanínu [6]. Aikawa a kol. [7] izolovali mutantu *S. cerevisiae* nadprodukovujúceho kyselinu jablčnú ako kmeň senzitívny na dimetylsukcinát, špecifický inhibítor sukcinátdehydrogenázy. Mutant produkoval 3-krát viac kyseliny jablčnej ako rodičovský kmeň a pri výrobe saké sa získala čerstvá kyslastá chuť. Rodrigues a kol. [8] študovali schopnosť kvasiniek degradovať L-malát v ovocných džúsoch a vínach. Izolovali mutantu kvasiniek *Schizosaccharomyces malidevorans*, ktorý bol závislý od prítomnosti L-malátu a glukózy a utilizoval L-malát rýchlejšie ako štandardný kmeň, pričom utilizácia glukózy bola výrazne znížená.

V tejto práci sme sa venovali biochemickej charakterizácii dvoch rôznych mutantov kvasiniek *S. cerevisiae*, s defektami v aktivite 2-oxoglutarátdehydrogenázového komplexu (*ogd1*, *kgd1*) [9-11], resp. v aktivite fumarázy (*fum1*) [12]. Použitím HPLC sme zistili, že tieto mutanty produkujú zvýšené množstvo organických kyselín do rastového média.

Materiál a metódy

Použité mikroorganizmy

V práci boli použité nasledovné kmene kvasiniek *S. cerevisiae*:

- Mutanty s defektom v aktivite 2-oxoglutarátdehydrogenázového komplexu: JS10-3C (*MAT α ade1 leu2-3 112 ogd1*) pochádzajúci z nášho laboratória [9,10] a W303 Δ KGD1 (*MAT α ade2-1 his3-11 15 leu2-3 112 trp1-1 kgd1::UR43*) získaný od prof. A. Tzagoloffa z Columbia University v New Yorku [11].
- Mutanty s defektom v aktivite fumarázy: haploidný kmeň E2 (*MAT α met2 fum1*) a diploidný kmeň EF2 (*MAT α met2 fum1/MAT α his fum1*) pochádzajúce z Mikrobiologického ústavu Wroclawskej univerzity od prof. T. M. Lachowicza.

Ako štandardné kmene sa použili DTXII, prototrofný diploidný laboratórny kmeň, W303-1A (*MATa ade2-1 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 kgd1::URA3*) a D273-10B/A1 (*MAT α met2*).

Kultivačné médiá a podmienky kultivácie

Bunky boli kultivované v minimálnom kultivačnom médiu obsahujúcom glukózu (20 g.l^{-1}), zmes anorganických solí a zmes vitamínov, podľa auxotrofie prídavok leucínu, adenínu, tryptofánu a histidínu, resp. metionínu (20 mg.l^{-1}). Kultivačné médium v Erlenmeyerových bankách bolo zaočkované na počiatočnú koncentráciu 1.10^5 buniek v 1 ml inokulom vyrasteným za 24 hodín v médiu rovnakého zloženia pri teplote 30°C za aeróbných podmienok.

Tvorba kyselín bunkami mutantov bola pozorovaná na tuhom médiu obsahujúcom glukózu (5 g.l^{-1}), peptón (20 g.l^{-1}), kvasničný extrakt (10 g.l^{-1}), agar (30 g.l^{-1}) a bromkrezolový purpur (3 g.l^{-1}) ako acidobázický indikátor. Konečná hodnota pH bola upravená na 7,0.

Rast buniek bol pozorovaný na tuhých minimálnych médiach s rôznymi substrátmi - glycerol, etanol, laktát, acetát, pyruvát (20 g.l^{-1}).

Analýza organických kyselín metódou HPLC

Príprava vzorky na analýzu HPLC

Vzorky na analýzu HPLC boli odoberané za sterilných podmienok v určitých časových intervaloch v priebehu kultivácie kvasiniek v minimálnom kultivačnom médiu. Bunky sa oddelili filtráciou cez membránové filtre s veľkosťou pórov $0,3 \mu\text{m}$. Po zriedení prefiltrovaného média kyselinou chloristou ($2,5 \text{ g.l}^{-1}$) v pomere 1:1 sa takto získaná vzorka bez ďalšej úpravy použila priamo na analýzu HPLC.

Podmienky analýzy HPLC

prístroj:	PU 4100 HPLC s UV-VIS detektorom
vlnová dĺžka:	210 nm
stacionárna fáza:	reverzná nepolárna kolóna Partisil 10 ODS, (Philips) alebo SGX C18 (Tessek) veľkosť častíc nosiča $10 \mu\text{m}$ dĺžka kolóny 30 cm
mobilná fáza:	polárna kyselina chloristá ($2,5 \text{ g.l}^{-1}$), pH 2,5
prietok:	1 ml.min^{-1}
dávkovanie:	$20 \mu\text{l}$
doba merania:	10 min

Kvantifikácia analyzovaných látok sa uskutočnila pomocou integračného programu a zostrojených kalibračných čiar štandardov.

Podmienky analýzy sú prevzaté z firemnej literatúry „Pye Unicam HPLC Applications“.

Stanovenie aktivít enzýmov citrátového cyklu

Mitochondrie na stanovenie aktivít enzýmov citrátového cyklu sa izolovali z protoplastov, ktoré boli pripravené z buniek kvasiniek kultivovaných v semi-syntetickom médiu s glukózou (5 g.l^{-1}) podľa Kováča a kol. [13]. Aktivita 2-oxoglutarátdehydrogenázového komplexu bola stanovená spektrofotometricky, meraním redukcie NAD^+ v prítomnosti 2-oxoglutarátu ako substrátu pri vlnovej dĺžke 340 nm [14]. Aktivita fumarázy bola stanovená tiež spektrofotometricky sledovaním akumulácie fumarátu v prítomnosti L-malátu ako substrátu pri vlnovej dĺžke 240 nm na spektrofotometri Hitachi Perkin-Elmer Model 557 [15]. Stanovenie mitochondriálnych proteínov sa uskutočnilo Lowryho metódou [16].

Výsledky a diskusia

Mutanty kvasiniek *S. cerevisiae* s defektom v aktivite 2-oxoglutarátdehydrogenázového komplexu JS10-3C a W303 Δ KGD1 ako aj mutant s defektom v aktivite fumarázy E2, resp. EF2 sa vyznačovali zníženými rastovými výťažkami v semisyntetickom médiu s glukózou v porovnaní so štandardnými kmeňmi. Bunky mutantu JS10-3C a W303 Δ KGD1 neboli schopné rásť na glycerole, laktáte, acetáte, pyruváte a slabo rástli na etanole. Bunky mutantu E2, resp. EF2 nerástli na etanole, acetáte, pyruváte a slabo rástli na glycerole a laktáte (tab. 1.).

Spektrofotometrické merania aktivít enzýmov citrátového cyklu v izolovaných mitochondriách mutantov potvrdili v porovnaní so štandardným kmeňom W303-1A, resp. D273-10B/A1 úplnú stratu aktivity 2-oxoglutarátdehydrogenázového komplexu u mutantu *ogd1* JS10-3C a *kgd1* mutantu W303 Δ KGD1, resp. fumarázy u mutantu *fum1* EF2 (tab. 2.).

Počas rastu na tuhom glukózovom médiu, obsahujúcom bromkrezolový purpur ako indikátor pH, bunky mutantných kmeňov vytvárali okolo svojich kolónií žlté zóny, ktoré boli najvýraznejšie u mutantu *fum1*. S cieľom zistiť, aké látky znižujú pH média, analyzovali sme kvapalné kultivačné médium po oddelení buniek metódou HPLC.

V chromatografickom zázname nezaočkovaného kultivačného média (obr. 1.), obsahujúceho glukózu, zmes anorganických solí, zmes vitamínov, adenín, uracil, tryptofán, histidín a leucín, sa objavili štyri výrazné píky; s čelom vzorky pík obsahujúci soli, a príslušný pík obsahujúci histidín a tryptofán (histidín absorbuje 200-krát výraznejšie ako tryptofán). Ďalšie dva výrazné píky odpovedajú uracilu a adenínu. Vitamíny predstavujú pozadie niekoľkých veľmi nevýrazných pík, glukóza pri vlnovej dĺžke 210 nm neabsorbuje.

TABUĽKA 1. Rast buniek v syntetickom médiu obsahujúcom rôzne zdroje uhlíka.
TABLE 1. Growth of cells in the synthetic medium containing different carbon sources.

Kmeň ¹	Rast buniek ²					
	glukóza ³ [10 ⁶ buniek.ml ⁻¹]	glycerol ⁴	etanol ⁵	laktát ⁶	acetát ⁷	pyruvát ⁸
DTXII	142	+	+	+	+	+
W303-1A	45	+	+	+	+	+
D273-10B/A1	106	+	+	+	+	+
JS10-3C	37	-	sl	-	-	-
W303ΔKGD1	35	-	sl	-	-	-
E2	76	sl	-	sl	-	-
EF2	70	sl	-	sl	-	-

Rastový výťažok v stacionárnej fáze v médiu s glukózou (20 g.l⁻¹) bol stanovený po 48-hodinovej kultivácii. Rast buniek na tuhých médiách s inými zdrojmi uhlíka bol hodnotený po 5 dňoch.
+ - rast, - - nerast, sl - slabý rast.

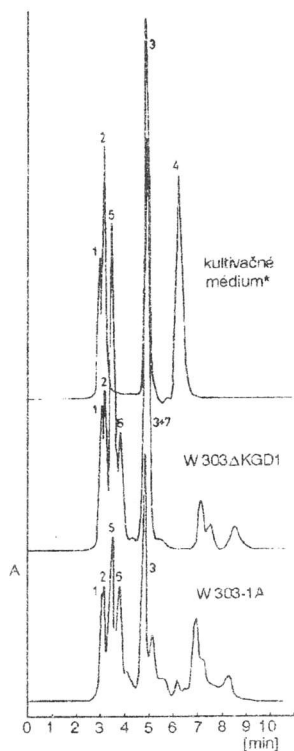
The growth yield of the cells in the stationary phase in a medium with glucose (20 g.l⁻¹) was estimated after 48-h cultivation. Growth of cells on solid media with other carbon sources was scored after 5 days.

+ - growth, - - no growth, sl - slow growth, 1 - strain, 2 - growth of cells, 3 - glucose, 4 - glycerol, 5 - ethanol, 6 - lactate, 7 - acetate, 8 - pyruvate.

TABUĽKA 2. Aktivita 2-oxoglutarátdehydrogenázového komplexu (OGDC) a fumarázy (FUM) stanovená spektrofotometricky v izolovaných mitochondriách.
TABLE 2. Activity of 2-oxoglutaratedehydrogenase complex (OGDC) and fumarase (FUM) measured spectrophotomerically in isolated mitochondria.

Kmeň ¹	Aktivita [nmol substrátu.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteínu] ²	
	OGDC	FUM
DTXII	58	1710
W303-1A	23	1960
D273-10B/A1	52	1010
JS10-3C	0	490
W303ΔKGD1	0	340
EF2	5	0

1 - strain, 2 - activity [nmol substrate.min⁻¹.mg⁻¹ protein].



OBR. 1. Chromatogramy HPLC analýz kultivačných médií po kultivácii mutantu *kgd1* W303ΔKGD1 a štandardného kmeňa W303-1A na kolóne Partisil 10 ODS.

1 - soli, 2 - histidín, 3 - uracil, 4 - adenín, 5 - pyruvát, 6 - neidentifikovaný, 7 - fumarát.

FIG. 1. HPLC analysis chromatograms of culture media after cultivation of *kgd1* mutant W303ΔKGD1 and wild type strain W303-1A on the Partisil 10 ODS column.

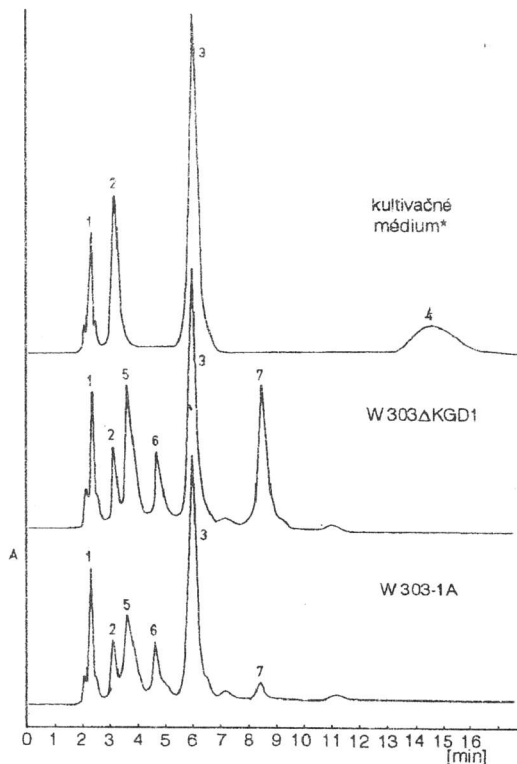
1 - salts, 2 - histidine, 3 - uracil, 4 - adenine, 5 - pyruvate, 6 - unidentified, 7 - fumarate, * - culture medium.

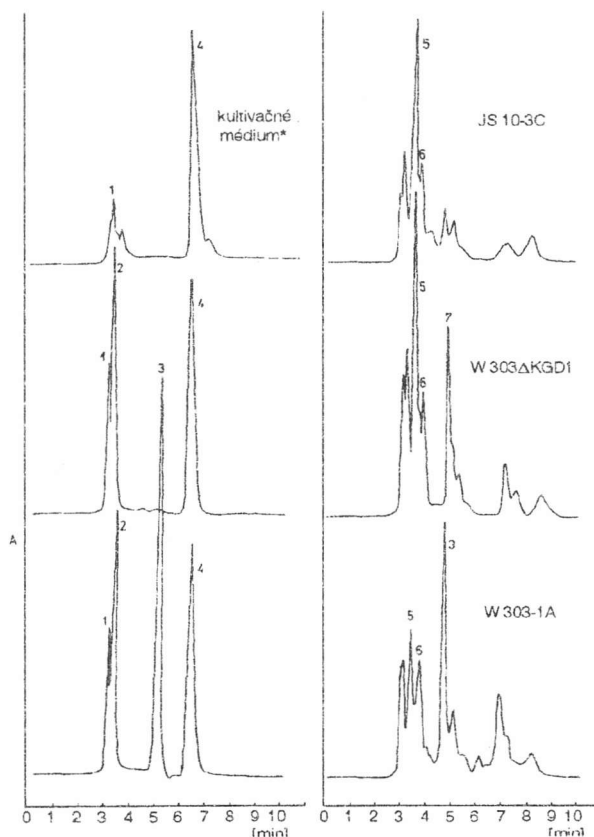
OBR. 2. Chromatogramy HPLC analýz kultivačných médií po kultivácii mutantu *kgd1* W303ΔKGD1 a štandardného kmeňa W303-1A na kolóne SGX C18.

Číslovanie píkovo ako v Obr. 1.

FIG. 2. HPLC analysis chromatograms of culture media after cultivation of *kgd1* mutant W303ΔKGD1 and wild type strain W303-1A on the SGX C18 column.

Peak numbers as in Fig. 1., * - culture medium.





OBR. 3. Chromatogramy HPLC analýz kultivačných médií po kultivácii mutantov *ogd1* JS10-3C a *kgd1* W303ΔKGD1 a štandardného kmeňa W303-1A na kolóne Partisil 10 ODS.

Číslovanie píkovo ako v Obr. 1.

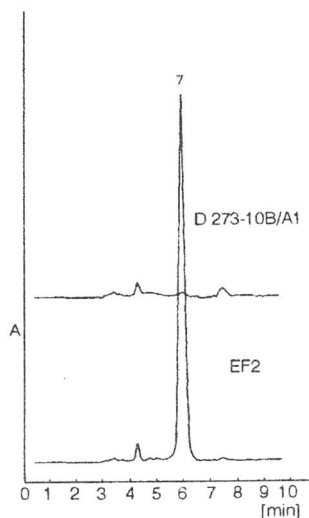
FIG. 3. HPLC analysis chromatograms of culture media after cultivation of *ogd1* and *kgd1* mutants and wild type strain W303-1A on the Partisil 10 ODS column.

Peak numbers as in Fig. 1.,

* - culture medium.

Z porovnania analýz kultivačných médií mutantu *kgd1* (W303ΔKGD1), resp. *ogd1* (JS-103C) a štandardného kmeňa W303-1A (obr. 1. a obr. 3.) vyplýva, že výraznejšia odlišnosť sa prejavila vo veľkosti píku 5, ktorý odpovedá pyruvátu.

Pomocou integračného programu a zostrojenej kalibračnej čiary sa zistilo, že produkcia pyruvátu po kultivácii v minimálnom médiu s glukózou 20 g.l⁻¹ predstavuje 0,27 g.l⁻¹ u kmeňa W303ΔKGD1, resp. 0,45 g.l⁻¹ u kmeňa JS10-3C, t.j. 1,5 až 2,5-násobné zvýšenie tvorby oproti štandardnému kmeňu W303-1A (0,18 g.l⁻¹). U mutantu W303ΔKGD1 došlo k výraznému nárastu píku 3, ktorý predstavuje v nezaočkovanom kultivačnom médiu uracil (obr. 1.). Po kultivácii mutantu W303ΔKGD1 v kultivačnom médiu bez uracilu (obr. 3.) sa na chromatografickom zázname objavil v tomto mieste nový pík. Analýza tej istej vzorky na kolóne SGX C18 za rovnakých podmienok (obr. 2.) ukázala, že zväčšenie píku 3 pri analýze na kolóne Partisil 10 ODS spôsobil fumarát, ktorý sa na tejto kolóne eluoval v rovnakom čase ako uracil. Vzhľadom na veľkú absorbčnú schopnosť fumarátu je však jeho zvýšená produkcia u mutantu *kgd1* v porovnaní so štandardným kmeňom zanedbateľná.



OBR. 4. Chromatogramy HPLC analýz kultivačných médií po kultivácii mutanta *fum1* EF2 a štandardného kmeňa D273-10B/A1 na kolóne Partisil 10 ODS. Číslovanie píkovo ako v Obr. 1.

FIG. 4. HPLC analysis chromatograms of culture media after cultivation of *fum1* mutant EF2 and wild type strain D273-10B/A1 on the Partisil 10 ODS column. Peak number as in Fig. 1.

U mutanta EF2 sa analýzou HPLC (obr. 4.) zistilo v súlade s defektom v aktivite fumarázy 15-násobné zvýšenie tvorby fumarátu ($0,32 \text{ g.l}^{-1}$) v porovnaní so štandardným kmeňom D273-10B/A1 ($0,021 \text{ g.l}^{-1}$) v minimálnom médiu s glukózou 20 g.l^{-1} . Najvyššia koncentrácia fumarátu ($0,53 \text{ g.l}^{-1}$) bola stanovená po kultivácii v minimálnom kultivačnom médiu s glukózou 200 g.l^{-1} nastavenom na pH 5,5. HPLC analýzou kultivačného média v určitých časových intervaloch počas kultivácie mutanta EF2 v minimálnom médiu s glukózou sa zistilo, že k akumulácii fumarátu dochádzalo iba v rastúcich kultúrach, pričom výťažok fumarátu bol úmerný koncentrácii buniek v rastovom médiu.

Z výsledkov práce vyplýva, že HPLC je vhodnou metódou analýzy zložiek kultivačného média, nakoľko je relatívne jednoduchá, časovo nenáročná (10 až 30 minút) a dokáže rozlíšiť rôzne produkty mikrobálneho metabolizmu. Úspešne sa použila na efektívnu kontrolu mikrobálnych fermentácií [17], alebo na analýzu organických kyselín v plodniciach jedlej huby *Tricholoma giganteum* [18]. Spektrum a koncentrácia organických kyselín významne ovplyvňujú senzorické vlastnosti fermentovaných potravín. Mutanty kvasiniek *S. cerevisiae* s defektom v špecifických reakciách citrátového cyklu, použité aj v tejto práci, sú ideálnym modelom pre štúdium dynamiky fermentácie a senzorických vlastností potravín.

Literatúra

1. WHITING, G. C.: Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages - a review. *J. Inst. Brew.*, 82, 1976, s. 84-92.
2. MAGARIFUCHI, T. - GOTO, K. - IIMURA, Y. - TADENUMA, M. - TAMURA, G.: Effect of fumarase gene (FUM1) disruption on production of malic, fumaric and succinic acids in sake mash. *J. Ferment. Bioengng.*, 80, 1995, s. 355-361.
3. CORTE-REAL, M. - LEAO, C.: Transport of malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Hansenula anomala*. *Appl. envir. Microbiol.*, 56(4), 1990, s. 1109-1113.
4. TORTIA, C. - GERBI, V. - GANDINI, A.: Use of maloalcoholic *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. *Vignevini*, 20, 1993, s. 15-20.
5. McKAY, I. A. - MADDOX, I. S. - BROOKS, J. B.: Citrate production by yeast. *Ferment. Technol. Ind. Appl.*, 1990, s. 285-91.
6. Pat. JAP J02207794. Mitsubishi-Petrochem. Removal of fumarase activity. 1990.
7. AIKAWA, M. - SUIZU, T. - ICHIKAWA, E. - KAWATO, A. - ABE, Y. - IMAYASU, S.: Breeding of higher malic acid-producing mutants from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No.7 (K-7). *Hakkokogaku-Kaishi*, 70(6), 1992, s. 473-477.
8. RODRIGUES, S. B. - THORNTON, R. J.: A malic acid dependent mutant of *Schizosaccharomyces malidevorans*. *Arch. Microbiol.*, 15(6), 1989, s. 564-566.
9. ŠUBÍK, J. - KOLAROV, J. - LACHOWICZ, T. M.: A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking α -ketoglutarate dehydrogenase activity. *FEBS Letters*, 27, 1972, s. 81-84.
10. MOCKOVČIAKOVÁ, D. - JANITOROVÁ, V. - ZIGOVÁ, M. - KACLÍKOVÁ, E. - ZAGULSKI, M. - ŠUBÍK, J.: The *ogd1* and *kgd1* mutants lacking 2-oxoglutarate dehydrogenase activity in yeast are alleli and can be differentiated by the cloned amber suppressor. *Curr. Genet.*, 24, 1993, s. 377-381.
11. REPETTO, B. - TZAGOLOFF, A.: Structure and regulation of *KGD1*, the structural gene for yeast α -ketoglutarate dehydrogenase. *Molec. cell. Biol.*, 9, 1989, s. 2695-2705.
12. KACLÍKOVÁ, E. - LACHOWICZ, T. M. - GBELSKÁ, Y. - ŠUBÍK, J.: Fumaric acid overproduction in yeast mutants deficient in fumarase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 91, 1992, s. 101-106.
13. KOVÁČ, L. - GROOT, G. S. P. - RACKER, E.: Translocation of protons and potassium ions across the mitochondrial membrane of respiring and respiration-deficient yeast. *Biochim. biophys. Acta*, 256, 1972, s. 55-56.
14. SANADI, D. R.: *Meth. Enzymol.*, 13, 1969, s. 52-55.
15. BERGMAYER, H. W.: Fumarase. *Method of Enzymatic Analysis*. IV. Enzymes 2. Weinheim, Verlag Chemie 1984, s. 359.
16. LOWRY, O. H. - ROSEBROUGH, N. J. - FARR, A. L. - RANDALL, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193, 1951, s. 265-275.
17. KOLIANDER, W. - ARNEZEDER, C. - HAMPEL, W. A.: A Simple and Versatile System for Fermentation Control by On-Line HPLC Analysis of Medium Components. *Acta biotechnol.*, 10, 1990, s. 387-394.
18. FUJITA, T. - KOMEMUSHI, S. - YAMAGATA, K.: Analysis of organic acids in fruit-bodies of *Tricholoma giganteum* by high performance liquid chromatography. *Lett. appl. Microbiol.*, 11, 1990, s. 27-29.

Do redakcie došlo 13.6.1996.

**Production of extracellular organic acids
by yeast mutants of *Saccharomyces cerevisiae***

EVA KACLÍKOVÁ

SUMMARY. Organic acids, distinguished food additives, are being produced by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as intermediates of the citric acid cycle. Studies on the mutants with defects in citric acid cycle enzyme activities contribute to elucidate regulation of organic acids production. Both, the mutant of *S. cerevisiae* with defect in 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (*ogd1*, *kgd1*) and the one deficient in fumarase (*fum1*), which have been biochemically characterized, were completely deficient in corresponding enzyme activities and showed an increased acidification ability of their colonies. The HPLC method was used to observe production of organic acids by mutant cells in comparison with wild type strains. By means of analyzing the culture media, 1.5-2-fold increase of the pyruvate production and 6-fold increase of fumarate production by *ogd1* (*kgd1*) mutant and 15-25-fold increase of fumarate production by *fum1* mutant depend on growth conditions, was found.