

Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa,  
Akademia Rolnicza w Lublinie, ul. Skromna 8. 20-704 Lublin, Poland

Piotr Janas, Eugenia Podgórska, Stanisław Mleko, Jacek Pielecki

Biosynteza enzymów proteolitycznych i ich wpływ na aktywność  
celulaz *Trichoderma reesei*

---

Biosynthesis of proteolytic enzymes and its effect on the activity of cellulases  
of *Trichoderma reesei*

ABSTRACT: Cultivation of three strains of *Trichoderma reesei* was performed in the presence of cellulose and casein. Maximum enzymatic activities of cellulases were estimated during the cultivation of all strains in the presence of cellulose as the source of carbon. The highest secretion of proteases was observed during the cultivation of strains with addition of casein to the medium. The proteases present in the culture fluids of *T. reesei* strongly affected cellulases activities. Current knowledge about the correlation between proteases and other enzymes is presented in the paper. This work is an introduction for future studies on the correlation between proteases and other enzymes in culture filtrates of *Trichoderma reesei*.

KEY WORDS: *Trichoderma reesei*, cellulases, proteases, low-protease strains

Jednymi z najlepszych producentów enzymów o znaczeniu przemysłowym, hydrolizujących ligninocelulozę są grzyby z rodzaju *Trichoderma*, a w szczególności takie gatunki, jak *T. reesei* QM 6a i jego mutanty, *T. harzianum* i *T. viride*. Celulazy nie są jednak jedynymi enzymami obecnymi w filtratach pochodzących tych gatunków. Duże znaczenie w hydrolizie biomasy roślinnej odgrywają ksylanazy, arabanazy i pektynazy, które są często syntetyzowane obok celulaz. Ważną rolę pełnią także enzymy lityczne, tj. proteazy, chitynazy i beta-1,3-glukanazy, oddziałujące na ściany komórkowe grzybów i drożdży. Ich obecność w filtratach pochodzących może wpływać niekorzystnie na wzrost i zdolności produkcyjne komórek. Jednak enzymy te okazują się niezwykle po-

mocne w otrzymywaniu enzymów wewnątrzkomórkowych, protoplastów, badaniach nad strukturą ściany komórkowej, degradacji glonów, klarowaniu piwa i wina. Są one także doskonałym narzędziem do otrzymywania protoplastów, wykorzystywanych następnie do transformacji, a także inżynierii genetycznej. W ostatnich latach uwaga badaczy koncentruje się na proteazach, które powodują posekrecyjne modyfikacje celulaz i wpływają na ich aktywności i stabilność podczas hodowli grzybów. Są one wykorzystywane do wydzielania składnika kompleksu celulolitycznego – beta glukozydazy, związanego ze ścianą komórkową grzyba. Enzymy te mogą również uczestniczyć w degradacji białek heterologicznych. Nie ma jednoznacznej opinii na temat wpływu proteaz zawartych w filtratach pohodowlanych grzybów strzępkowych na potranslacyjne modyfikacje celulaz i innych enzymów zewnątrzkomórkowych. Według hipotezy Dunne [1992] proteazy mogą wpływać na enzymy celulolityczne w trojaki sposób: kontrolować proces sekrecji enzymów zewnątrzkomórkowych, oddziaływać na ich aktywność i stabilność, brać udział w wytwarzaniu w wyniku posekrecyjnych modyfikacji pochodnych form celulaz.

Występowanie lub brak potranslacyjnych modyfikacji celulaz może być związane z warunkami hodowli oraz właściwościami proteaz *Trichoderma reesei*, należącymi do podklasy proteaz aspartylowych przejawiających maksymalną aktywność przy pH poniżej 4. Potwierdzają to wyniki badań nad modyfikacjami proteolitycznymi celulaz podczas hodowli okresowych *Trichoderma reesei* QM 9414, prowadzonych przez Hagspiel i in. [1989]. Badacze ci przy użyciu przeciwciał monoklonalnych stwierdzili obecność w filtratach z końcowych okresów hodowli (niskie pH) grzyba obecność częściowo zmodyfikowanych w wyniku proteolizy pochodnych form celobiohydrolazy I i II. Podobnie odkrycia Dunne [1982], który badał relacje pomiędzy zewnątrzkomórkowymi proteazami a zespołem celulaz *Trichoderma reesei*, sugerują, że kwaśne proteazy mogą być odpowiedzialne za powstawanie pochodnych form celulaz, ale tylko wtedy gdy pH hodowli jest niższe od 4. Pogląd ten kwestionują Labudova i Farkas [1983] oraz i Kamel i Kubicek [1985], którzy stwierdzili obecność licznych pochodnych form celulaz w bardzo wczesnych stadiach hodowli przy wyższych pH i braku proteolitycznej aktywności. Jeszcze inną hipotezę na temat wpływu proteaz na enzymy celulolityczne przedstawili Lovrien i in. [1985]. Oznaczali oni aktywności proteolityczne i celulolityczne w dostępnych na rynku preparatach enzymatycznych. Na podstawie przeprowadzonych badań zasugerowali, że proteazy powodują aktywację enzymów celulolitycznych. Mogą one działać jak modulatory potranslacyjne, przekształcające nieaktywne zymogeny w aktywne enzymy. Trudności w prowadzeniu badań nad korelacjami między celulazami i proteazami *Trichoderma reesei* wynikają z niskich stężeń tych drugich w filtratach pohodowlanych grzyba oraz wzajemnego silnego połączenia tych dwóch grup enzymów.

Celem pracy było porównanie aktywności enzymów proteolitycznych i celololitycznych, wydzielanych do podłoża podczas hodowli szczepów *Trichoderma reesei* w obecności celulozy i kazeiny. Zbadano również wpływ proteaz na aktywność celulaz tego samego pochodzenia w zależności od stosunku objętości filtratów pochodzących i czasu inkubacji.

#### METODY

W badaniach wykorzystano mutanty *Trichoderma reesei*, pochodzące z różnych źródeł. mutanta MCG 77 – wyselekcjonowanego po mutagenie promieniami UV *T. reesei* QM 9414 w Katedrze Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa Akademii Rolniczej w Lublinie, mutanty o symbolach: VTT-D-78085 i VTT-D-79124 pochodzące z VTT-Collection of Industrial Microorganism, Technical Research Centre of Finland. Mutanty przechowywano na skosach brzeczkowych w temperaturze 2°C, okresowo je przeszczepiając.

Hodowle mutantów prowadzono na zmodyfikowanym podłożu Mandels i Weber [1969] o składzie (w g/dm<sup>3</sup>): dla produkcji enzymów proteolitycznych KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,0), MgSO<sub>4</sub> (0,3), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,4), CaCl<sub>2</sub> (0,3), Tween 80 (1,0), ekstrakt drożdżowy (1,0), sacharoza (9,0), kazeina (3,0) roztwór mikroelementów 0,5 cm<sup>3</sup>/dm<sup>3</sup> zawierający: FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 5 g/dm<sup>3</sup> MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 1,96 g/dm<sup>3</sup>, ZnCl<sub>2</sub> 1,66 g/dm<sup>3</sup>, CoCl<sub>2</sub> 2 g/dm<sup>3</sup>, dla produkcji enzymów celololitycznych: wszystkie składniki pożywki jak wyżej z wyjątkiem sacharozy i kazeiny zamiast których dodawano celulozę (10).

Przygotowanie inokulum do hodowli grzybów. Hodowle poszczególnych mutantów *Trichoderma reesei* prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 500 cm<sup>3</sup>, zawierających 100 cm<sup>3</sup> pożywki wg Mandels i Weber [1969]. pH pożywki ustalano po sterylizacji na poziomie 5. Jako źródło węgla stosowano laktozę w stężeniu 0,5%. Kolby zamykano korkami, będącymi jednocześnie filtrami mikrobiologicznymi, i sterylizowano w autoklawie w temperaturze 110°C przez 30 minut. Po ochłodzeniu kolby szczepiono kawałkami o powierzchni 1 cm<sup>2</sup> ze skosu brzeczkowego z odpowiednim mutantem *Trichoderma reesei*. Umieszczano je następnie w pokoju termostatowym na wytrząsarce rotacyjnej (220 obr/min) i inkubowano w temperaturze 27°C aż do całkowitego wykorzystania źródła węgla (2-6 dób).

Hodowle okresowe szczepów w kolbach Erlenmayera. Kolby Erlenmayera o pojemności 500 cm<sup>3</sup> napełniano 100 cm<sup>3</sup> pożywki wg Mandels i Weber [1969] o pH 5 opisanej powyżej z odpowiednim źródłem węgla i azotu i sterylizowano w autoklawie w 110°C przez 30 minut. Kolby szczepiono 4 cm<sup>3</sup>

wcześniej przygotowanego inokulum z grzybnią odpowiedniego mutantu. Hodowle prowadzono na wytrząsarce rotacyjnej o częstości obrotów 250 obr./min w temperaturze 27° przez 11 dób. Aby uzyskać klarowną ciecz pohodowlaną, próbki wirowano przez 10 minut przy  $14000 \times g$ . W filtratach oznaczano aktywności enzymatyczne proteaz i celulaz.

Oznaczanie aktywności proteolitycznej odbyło się w następujący sposób: do próbek wprowadzano po  $2,5 \text{ cm}^3$  roztworu kazeinianu sodu (1 g w  $1 \text{ dm}^3$  buforu Tris-HCL o pH 5,5). Następnie dodawano  $0,5 \text{ cm}^3$  filtratu pohodowlanego i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 50°C. Po upływie tego czasu do próbek wprowadzano  $1 \text{ cm}^3$  17,5% kwasu trójchlorooctowego. Po odwirowaniu białka pobierano  $2 \text{ cm}^3$  cieczy i dodawano  $3 \text{ cm}^3$  1 mol  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i  $1 \text{ cm}^3$  trzykrotnie rozcieńczonego odczynnika fenolowego Folina-Ciocalteu. Po 10 minutach odczytywano ekstynkcję na spektrofotometrze „Spekol” przy długości fali 720 nm wobec próby ślepej. Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w opisywanych warunkach reakcji powodowała wzrost o 0,1 gęstości optycznej.

Ogólną aktywność celulolityczną (FPU) cieczy pohodowlanych oznaczano w następujący sposób: 50 mg ( $1 \times 6 \text{ cm}$ ) paski bibuły filtracyjnej Whatman No. 1 umieszczano w próbkach i dodawano  $1 \text{ cm}^3$  0,1 mol buforu octanowego o pH = 4,8 i  $0,5 \text{ cm}^3$  odpowiednio rozcieńczonego filtratu pohodowlanego. Mieszaninę inkubowano przez godzinę w temperaturze 50°C. Ilość uwolnionych cukrów redukujących oznaczano metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynnika zawierającego kwas 3,5-dwunitrosalicylowy. Aktywność celulaz w filtratach pohodowlanych wyrażano w jednostkach FPU (Filtre Paper Unit) wg IUPAC [Ghose 1987]. Za jednostkę FPU przyjęto ilość enzymu, zawartego w  $1 \text{ cm}^3$  płynu pohodowlanego, która uwalnia 1  $\mu\text{mol}$  (180  $\mu\text{g}$ ) glukozy w ciągu minuty w warunkach reakcji.

W celu zbadania wpływu proteaz na aktywność enzymów celulolitycznych dodawano do cieczy pohodowlanej zawierającej celulazy o określonej aktywności ciecz pohodowlaną z enzymami proteolitycznymi w różnych proporcjach – 1 : 1, 1 : 1,5, 1 : 4. Inkubację tak przygotowanych mieszanin prowadzono w temperaturze 50°C. przez 1 godzinę, 4 i 24 godziny. Następnie oznaczano aktywność celulaz według metody opisanej wcześniej.

#### WYNIKI

Zmiany aktywności enzymów proteolitycznych oznaczonych podczas hodowli trzech szczepów *Trichoderma reesei* w obecności celulozy i kazeiny przedstawiono w tabelach 1 i 2. Maksymalne aktywności proteolityczne stwierdzono w filtratach pochodzących z szóstej doby hodowli *T. reesei* MCG 77 i VTT-D-79127. Filtrat szczepu VTT-D-78085 charakteryzował się maksymalną

aktywnością proteolityczną w siódmej dobie hodowli (6,6 jednostki). W następnych dobach aktywności proteaz wszystkich trzech szczepów malały, osiągając najniższe wartości w ostatnich dniach hodowli grzybów. W następnym eksperymencie zastosowano podłoże z dodatkiem celulozy. Aktywność proteolityczna badanych szczepów wzrastała do szóstej doby hodowli, osiągając maksymalne wartości, które wynosiły dla *T. reesei* MCG 77 – 1,49 jednostki, dla *T. reesei* VTT-D-79127 – 1,68 jednostki i dla *T. reesei* VTT-D-78085 – 1,21 jednostki. Wartości te były około 4,5 razy niższe od uzyskanych podczas hodowli grzybów na podłożu z dodatkiem kazeiny. W następnych dobach aktywność proteaz znacznie spadła, osiągając w jedenastej dobie wartości od 0,41 do 0,49 jednostki. W kolejnym doświadczeniu zbadano wpływ czasu hodowli w obecności kazeiny i celulozy na produkcję celulaz przez szczepy *T. reesei* (tab. 3, 4). Maksymalne aktywności celulolityczne, oznaczone po hodowlach grzybów na podłożach zawierających kazeinę, były około 6-krotnie niższe od stwierdzonych w cieczach po hodowlach z dodatkiem celulozy. Najwyższe aktywności podczas hodowli w obecności tego drugiego substratu oznaczono w siódmej dobie dla *T. reesei* MCG 77 i VTT-D-79127 i w szóstej dobie dla VTT-D-78085.

Tabela 1. Aktywności enzymów proteolitycznych wydzielanych podczas hodowli okresowych szczepów *Trichoderma reesei* do podłoża z kazeiną

Table 1. Activities of proteolytic enzymes secreted during batch cultivation of *Trichoderma reesei* strains to the medium with casein

Szczep <i>Trichoderma reesei</i> Strain of <i>Trichoderma reesei</i>	Aktywności proteolityczne filtratów po dobie hodowli (U) Proteolytic activities of culture filtrates after the day of cultivation (U)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
MCG 77	1,02	2,41	3,73	4,81	5,7	6,9	6,05	5,1	3,91	3,11	2,42
VTT-D-79127	0,92	2,02	2,93	3,91	5,21	7,6	6,91	6,48	5,15	4,92	2,41
VTT-D-78085	0,75	1,02	2,13	2,67	2,84	5,07	6,6	5,75	5,21	3,52	3,07

Tabela 2. Aktywności enzymów proteolitycznych wydzielanych podczas hodowli okresowych szczepów *Trichoderma reesei* do podłoża z celulozą

Table 2. Activities of proteolytic enzymes secreted during batch cultivation of *Trichoderma reesei* strains to the medium with cellulose

Szczep <i>Trichoderma reesei</i> Strain of <i>Trichoderma reesei</i>	Aktywności proteolityczne filtratów po dobie hodowli (U) Proteolytic activities of culture filtrates after the day of cultivation (U)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
MCG 77	0,21	0,46	0,69	0,92	1,03	1,49	0,91	0,64	0,505	0,55	0,49
VTT-D-79127	0,25	0,51	0,75	0,97	1,49	1,68	1,15	0,96	0,69	0,53	0,41
VTT-D-78085	0,25	0,52	0,74	0,94	0,97	1,21	0,82	0,61	0,52	0,57	0,49

Tabela 3. Niespecyficzne aktywności celulolityczne (FPU) enzymów wydzielanych podczas hodowli szczepów *Trichoderma reesei* do podłoża z kazeinąTable 3. Nonspecific cellulolytic Activities of enzymes secreted during batch cultivation of *Trichoderma reesei* strains to the medium with casein

Szczep <i>Trichoderma reesei</i> Strain of <i>Trichoderma reesei</i>	Niespecyficzne aktywności celulolityczne filtratów po dobie hodowli FPU/cm <sup>3</sup> Nonspecific cellulolytic activities of culture filtrates after the day of cultivation FPU/cm <sup>3</sup>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
MCG 77	0,031	0,061	0,10	0,142	0,175	0,247	0,123	0,098	0,073	0,069	0,057
VTT-D-79127	0,037	0,067	0,11	0,149	0,181	0,274	0,148	0,121	0,11	0,092	0,049
VTT-D-78085	0,051	0,085	0,135	0,167	0,221	0,301	0,227	0,217	0,147	0,093	0,056

Tabela 4. Niespecyficzne aktywności celulolityczne (FPU) enzymów wydzielanych podczas hodowli szczepów *Trichoderma reesei* do podłoża z celuloząTable 4. Nonspecific cellulolytic activities of enzymes secreted during batch cultivation of *Trichoderma reesei* strains to the medium with cellulose

Szczep <i>Trichoderma reesei</i> Strain of <i>Trichoderma reesei</i>	Niespecyficzne aktywności celulolityczne filtratów po dobie hodowli FPU/cm <sup>3</sup> Nonspecific cellulolytic activities of culture filtrates after the day of cultivation FPU/cm <sup>3</sup>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
MCG 77	0,21	0,45	0,69	0,91	1,23	1,4	1,51	1,15	1,07	0,88	0,65
VTT-D-79127	0,22	0,51	0,86	1,02	1,35	1,67	1,82	1,64	1,47	0,105	0,71
VTT-D-78085	0,23	0,45	0,75	0,99	1,29	1,305	1,22	1,12	0,68	0,19	0,17

W celu zbadania wpływu proteaz na aktywność celulaz przeprowadzono doświadczenia, do których wybrano ciecze pohodowlane o najwyższych aktywnościach proteolitycznych i celulolitycznych. W przypadku *T. reesei* MCG 77 były to ciecze z siódmej doby hodowli w obecności celulozy (maksymalna aktywność celulolityczna) i szóstej doby hodowli w obecności kazeiny (maksymalna aktywność proteolityczna). Podobnie w przypadku *T. reesei* VTT-D-79127 filtry pochodziły z szóstej doby hodowli w obecności kazeiny i siódmej doby hodowli w obecności celulozy. W przypadku szczepu VTT-D-78085 filtry pochodziły z sześciu dób hodowli w obecności kazeiny i celulozy. Na filtry uzyskane po hodowlach w obecności celulozy o najwyższej aktywności celulolitycznej oddziaływano filtratami wykazującymi maksymalne aktywności proteolityczne. Stosowano następujące proporcje filtratów pohodowlanych z celulazami i proteazami: 1:1, 1:1,5, 1:4. Inkubację prowadzono przez 1 godzinę, 4 i 24 godziny. Następnie oznaczano aktywność celulolityczną w badanych filtratach. Wyniki przedstawiono w tabeli 5. Analizując wyniki, stwierdzono, że dodanie cieczy pohodowlanych zawierających proteazy o najwyższych aktywnościach do cieczy

o maksymalnych aktywnościach celulolitycznych spowodowało obniżenie aktywności tych ostatnich enzymów średnio o około 62% w przypadku *T. reesei* MCG 77, 63% w przypadku *T. reesei* VTT-D-79127 i 58% w przypadku *T. reesei* VTT-D-78085. Najwyższe aktywności FPU oznaczono, kiedy objętości cieczy z proteazami i celulazami były jednakowe. W miarę zwiększania objętości cieczy zawierającej enzymy proteolityczne 1,5- i 4-krotnie w stosunku do objętości cieczy z celulazami aktywność FPU zmalała o około 62% i około 76% w stosunku do aktywności wyjściowej filtratów. Badając zależność aktywności celulolitycznej badanych filtratów od czasu inkubacji, stwierdzono, że w miarę wydłużania czasu oddziaływania proteaz na celulazy aktywność FPU spadała średnio o około 62% w przypadku 4 godzin i około 70% w przypadku wydłużenia czasu inkubacji do 24 godzin. Wartości te obliczono w stosunku do aktywności uzyskanej po godzinie inkubacji.

Tabela 5. Wpływ enzymów proteolitycznych na aktywność celulaz tego samego pochodzenia  
Table 5. Effect of proteolytic enzymes on the activity of cellulases of the same descent

Szczep Strain	Czas inkubacji (h) Time of incubation	Aktywność celulolityczna $\mu\text{mol}$ glukozy/min $\times$ $\text{cm}^3$ Cellulolytic activity $\mu\text{mol}$ glucose/min $\times$ $\text{cm}^3$		
		Stosunek obj. cieczy pochodowl. z celulazami do objętości cieczy pochodowl. z proteazami Ratio of culture filtrate volume of cellulases to culture filtrate volume of proteases		
		1 : 1	1 : 1,5	1 : 4
<i>Trichoderma reesei</i>	1	1,05	0,83	0,48
	4	0,90	0,62	0,33
MCG 77	24	0,38	0,25	0,24
<i>Trichoderma reesei</i>	1	1,26	0,98	0,64
	4	0,81	0,57	0,30
VTT-D-79127	24	0,45	0,32	0,28
<i>Trichoderma reesei</i>	1	1,04	0,79	0,49
	4	0,76	0,50	0,26
VTT-D-78085	24	0,35	0,27	0,20

Badania nad zależnościami między proteazami i różnymi enzymami z filtratów pochodowlanych były prowadzone u innych mikroorganizmów (grzybów strzępkowych i bakterii). Fiedurek i in. [1985] otrzymał po mutagenizacji przy użyciu promieniowania UV i działania NTG szczepu rodzicielskiego *Aspergillus niger* C sześć mutantów. Pięć z nich charakteryzowało się obniżeniem lub całkowitym brakiem aktywności proteolitycznej. Aktywność enzymu glukoamylazy i sekrecja białka u badanych mutantów były proporcjonalne do ich aktywności proteolitycznych. Na podstawie analizy elektroforetycznej białek u nisko-

proteazowych mutantów stwierdzono obecność dwóch frakcji glukoamylazy spośród czterech rozdzielonych u szczepu rodzicielskiego. Sugeruje to, że proteazy mogą być odpowiedzialne za powstawanie pochodnych izoenzymatycznych form glukoamylazy. Proteazy mogą również wpływać na produkcję białek homologicznych i heterologicznych przez grzyby strzępkowe i bakterie. Stosuje się różne sposoby w celu przezwyciężenia tych problemów. Papagianni i Moo-Young [2002] badali wpływ morfologii grzybni na sekrecję proteaz przez dziki szczep *Aspergillus niger* – producenta homologicznej glukoamylazy. Zmiany poziomu i jakości inokulum miały wpływ na morfologię grzyba. Wzrost mycelium w postaci dużych skupisk (pellets – ang) był związany z obniżeniem aktywności proteaz i jednoczesnym podwyższeniem glukoamylazy. Zmniejszenie sekrecji proteaz obserwowano podczas immobilizowanej hodowli *Aspergillus niger* [Liu i in. 1998]. Lehmebeck [J. Lehmebeck, 1997. Filamentous fungus with reduced or lacking endogenous recombinant alkaline protease activity. Patent No. 97-13450.] inaktywował przez delecję, insercję i substytucję geny kodujące alkaliczne proteazy u licznych grzybów, jak: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *Humicola insolens*, *Candida sp*, *Fusarium solani*. Grzyby te były wykorzystywane do sekrecji wielu rekombinowanych białek, m.in.: beta amylazy, celulaz, endo-1,4-beta-ksylanaz, alfa-galaktozydazy. *Escherichia coli* jest również dobrym gospodarzem do ekspresji białek rekombinowanych. Liczne proteazy są obecne w różnych kompartmentach komórkowych bakterii (cytoplazmie, przestrzeni periplazmatycznej, wewnętrznej i zewnętrznej błonie cytoplazmatycznej). Endoproteazy te mogą spełniać wiele ważnych funkcji. Dla przykładu są one odpowiedzialne za degradację nieprawidłowo sfalowanych białek w przestrzeni periplazmatycznej. Enzymy te są także zaangażowane w degradację wielu rekombinowanych białek syntetyzowanych w *Escherichia coli* (proteaza OmT). Jiang i in. [2002] zamienił gen kodujący OmT genem oporności na chloramfenikol. Otrzymane w ten sposób rekombinanty charakteryzowały się zwiększoną stabilnością biosyntezy białka fosfolipazy D. Janas i in [2003] po mutagenizacji promieniowaniem uv i NTG szczepu *Trichoderma reesei* M-7 i selekcji na podłożu z dodatkiem żelatyny wyizolował około 960 niskoproteazowych mutantów. Testowany podczas hodowli ciągłej niskoproteazowy mutant o symbolu Mp5 charakteryzował się dużą opornością na zmiany temperatury [Janas 2003]. Aktywności FPU filtratów pochodzących były stabilne w szerokim zakresie temperatury hodowli (26–34°C).



## WNIOSKI

1. Praca potwierdziła indukcyjny wpływ celulozy na produkcję celulaz przez *Trichoderma reesei*.
2. Najwyższe aktywności proteaz oznaczono w szóstej dobie hodowli *Trichoderma reesei* VTT-D-79127 w obecności kazeiny.
3. Po inkubacji cieczy pohodowlanych grzybów o najwyższych aktywnościach proteolitycznych i celulolitycznych stwierdzono obniżenie aktywności celulaz o od 58% do 76% (w zależności od szczepu, stosunku objętości filtratów pohodowlanych i czasu inkubacji).

## PIŚMIENICTWO

- Dunne C.P. 1992. Relationship between extracellular proteases and the cellulase complex of *Trichoderma reesei*. In: Chibata J., Fukui S. and Wingard L.B. Jr., (Eds), Enzyme Engineering. Vol. 6 Plenum. Press. New York, 355–396.
- Fiedurek J., Paszczyński A., Ilczuk Z. 1985. The effect of proteases on the synthesis of glucoamylase by mutants of *Aspergillus niger*. Acta Microbiol. Pol. 34, 1, 25–32.
- Ghose T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure Appl. Chem. 55, 257–262.
- Hagspiel K., Haab D., Kubicek C.P. 1989. Protease activity and proteolytic modification of cellulases from a *Trichoderma reesei* QM 9414 selectant. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 61–67.
- Janas P. 2003. Production of extracellular enzymes by low-protease mutants of *Trichoderma reesei*. Acta Scientiarum Polonorum 2, 103–114.
- Janas P., Fiedurek J., Targoński Z., Mleko S. 2003. Izolacja i wstępna charakterystyka niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei*. Żywność 2, 17–26.
- Jiang X., Oohira K., Iwasaki Y., Nakano H., Ichihara S., Yamane T. 2002. Reduction of protein degradation by use of protease-deficient mutants in cell-free protein synthesis system in *Escherichia coli*. J. Biosc. Bioeng. 93, 3, 151–156.
- Kammel W.P., Kubicek C.P. 1985. Absence of postsecretional modification in extracellular proteins of *Trichoderma reesei* during growth on cellulose. J. Appl. Biochem. 7, 138–144.
- Labudova I., Farkas V. 1983. Multiple enzyme forms in the cellulase system of *Trichoderma reesei* during its growth on cellulose. Biochim. Biophys. Acta. 744, 135–140.
- Liu F., Ridgway D., Gu T., Moo-Young M. 1998. Inhibition of extracellular protease secretion by *Aspergillus niger* using cell immobilization. Biotechnol. Lett. 20, 539–542.
- Lovrien R.E., Gusek T., Hart B. 1985. Cellulase and protease specific activities of commercial available cellulase preparations. J. Appl. Biochem. 7, 258–272.
- Mandels M., Weber J. 1969. The production of cellulase. In: Cellulase and Their Application. Adv. Chem. Ser., ed. G. J. Hajny, E. T. Reese, 95, 391–413.
- Papagianni H., Moo-Young H. 2002. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: Fungal morphology and inoculum effect. Proc. Biochem. 37, 1271–1278.

