

PIOTR JANAS, MONIKA KORDOWSKA-WIATER, STANISŁAW MLEKO

IZOLACJA PROTOPLASTÓW Z *TRICHODERMA REESEI* M-7 PRZY UŻYCIU ENZYMÓW LITYCZNYCH Z *TRICHODERMA VIRIDE* F-19

Streszczenie

Wysokie ceny handlowych preparatów enzymów litycznych zmuszają do opracowywania nowych metod izolacji protoplastów z komórek grzybów strzępkowych i drożdży. Celem pracy było zbadanie wpływu filtratu pochodzącego *Trichoderma viride* F-19 na stopień tworzenia protoplastów *Trichoderma reesei* M-7 w porównaniu z preparatami handlowymi enzymów litycznych. Wydajności protoplastyzacji po zastosowaniu filtratu pochodzącego *T. viride* F-19 i Enzymów litycznych z *Cytophaga* były porównywalne. Liczby otrzymanych protoplastów po inkubacji mycelium z preparatem Lyticasa były niższe. Pomimo wyższej wydajności protoplastyzacji, protoplasty otrzymane w wyniku działania cieczy pochodzącej *T. viride* F-19 i Enzymów litycznych z *Cytophaga* wykazywały mniejszą zdolność do regeneracji niż po zastosowaniu preparatu Lyticasa.

Wstęp

Badania nad otrzymywaniem protoplastów i sferoplastów z komórek grzybów strzępkowych i drożdży prowadzone są od wielu lat. Protoplasty komórek, pozbawione ściany komórkowej oraz sferoplasty, z częściowo zniszczoną ścianą, wykorzystywane są do izolacji poszczególnych frakcji komórkowych, do badań dotyczących przepuszczalności ściany komórkowej, oporności na czynniki zewnętrzne, sekrecji enzymów i biosyntezy ściany komórkowej [11]. Izolacja protoplastów zdolnych do regeneracji jest niezbędnym etapem doskonalenia szczepów, na drodze manipulacji genetycznych i fuzji protoplastów [1, 8, 9]. Znaczenie protoplastów w badaniach naukowych zmusza do ciągłych poszukiwań optymalnych warunków procesu protoplastyzacji i regeneracji protoplastów. Metody otrzymywania protoplastów z grzybów strzępkowych i drożdży możemy podzielić na trzy główne grupy [11]:

- Metody mechaniczne i z zastosowaniem enzymów autolitycznych, związanych z protoplazmą komórek podlegających protoplastyzacji.
- Metody polegające na indukowaniu zmian metabolizmu komórek, prowadzących do zahamowania biosyntezy ściany komórkowej.
- Metody z użyciem specyficznych enzymów, mających zdolność rozkładania składników ścian komórkowych (chitynaz, β -glukanaz i innych).

Najczęściej stosowane są metody wykorzystujące enzymy lityczne produkowane przez grzyby strzępkowe, drożdże, bakterie czy ślimaki. Istnieje wiele preparatów handlowych tych enzymów np. Novozyme 234 (Novo Enzyme Products Ltd. Dania), Funcelase (Yakult Pharmaceutical IND Co. Ltd. Japonia), Lytic enzymes from *Trichoderma harzianum*, Lyticase – Sigma Chemical Co., USA). Jednak wysoka cena często ogranicza ich szersze zastosowanie.

Celem pracy było zbadanie wpływu filtratu pochodzącego z *Trichoderma viride* F-19, zawierającego enzymy lityczne, na stopień tworzenia protoplastów *T. reesei* M-7, w porównaniu z preparatami handlowymi: Enzymów litycznych z *Cytophaga* (Merck, Niemcy) i Lyticase (Sigma Chemical Co. USA). Poszukiwano również optymalnych warunków protoplastyzacji. Określono także zdolność do regeneracji protoplastów, otrzymanych w wyniku działania ww. preparatów litycznych w różnych warunkach reakcji.

Materiały i metody badań

Mikroorganizmy

Szczep *Trichoderma viride* F-19, o zwiększonych uzdolnieniach do produkcji enzymów litycznych, pochodził z kolekcji Katedry Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa [10]. Szczep *Trichoderma reesei* M-7, otrzymany w wyniku mutagenizacji promieniowaniem UV *Trichoderma reesei* QM 9414, w Katedrze Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa, charakteryzował się podwyższeniem produkcji enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych [2]. Szczepy przechowywano na skosach brzezkowych w temperaturze 2°C, okresowo je przeszczepiając.

Oznaczanie aktywności enzymatycznych

Do oznaczania aktywności enzymatycznej chitynaz używano chityny koloidalnej. Do 0,5 cm³ roztworu koloidalnego chityny o stężeniu 0,5%, w 0,1M buforze octanowym o pH = 4,8 dodawano 0,5 cm³ cieczy pochodzącej. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 50°C przez godzinę. Uwolnione w warunkach reakcji cukry redukujące oznaczano metodą kolorymetryczną, używając odczynnika zawierającego kwas 3,5-dinitrosalicylowy, mierząc ekstynkcję próby badanej przy 550 nm wobec

próby odczynnikowej. Za jednostkę aktywności przyjęto ilość uwolnionych substancji redukujących w nmolach/cm³ filtratu pochodowlanego x minuta. W celu oznaczenia aktywności β -1,3-glukanazy sporządzono 1% roztwór laminaryny w 0,1M buforze octanowym o pH = 4,8. Do odmierzonej objętości 0,9 cm³ roztworu laminaryny dodawano 0,1 cm³ odpowiednio rozcieńczonego filtratu pochodowlanego. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 50°C przez 30 min. Ilość uwolnionych cukrów redukujących oznaczano metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynnika zawierającego kwas 3,5-dinitrosalicylowy (DNS), po pomiarze absorpcji próby wobec kontroli odczynnikowej. Za jednostkę aktywności β -1,3-glukanazy przyjęto taką ilość enzymu, która uwalnia 1 μ mol glukozy w czasie minuty, w warunkach reakcji.

Do oznaczania aktywności proteolitycznej przygotowywano roztwór zawierający 100 mg azokazeiny w 10 cm³ 0,1M buforu octanowego o pH = 4,8 i dodawano kroplę 2-merkaptoetanolu. Do 0,9 cm³ tak przygotowanego roztworu dodawano 1,35 cm³ filtratu pochodowlanego i inkubowano w temperaturze 50°C przez 30 min. Po tym czasie reakcję przerywano, dodając do objętości reakcyjnej 2,25 cm³ 5% kwasu trichlorooctowego, a następnie wirowano przez 10 min. Ekstynkcję cieczy nadosadowej odczytywano dla $\lambda = 366$ nm wobec kontroli odczynnikowej. Za jednostkę aktywności proteolitycznej przyjęto zmianę ekstynkcji mieszaniny reakcyjnej, mierzonej w spektrofotometrze „Specol”, w ciągu minuty, na cm³ filtratu pochodowlanego.

Zawartość białka w filtratach pochodowlanych oznaczano metodą Lowry'ego [5].

Zawartość cukrów redukujących oznaczano metodą z kwasem 3,5-dwunitrosalicylowym wg Miller 1959 [7].

Warunki hodowli

Do produkcji enzymów litycznych używano szczep *T. viride* F-19. Hodowle prowadzono w fermentorze Biomer o objętości 1,5 dm³, z pełną regulacją pH, temperatury, napowietrzania i mieszania. Temperatura hodowli wynosiła 25°C, a pH 5,0. Skład podłoża hodowlanego wg Mandels'a i Weber'a [6] był następujący [g/dm³]: KH₂PO₄ (2,0), MgSO₄ (0,3), (NH₄)₂SO₄ (1,4), CaCl₂ (0,3), Tween 80 (1,0), ekstrakt drożdżowy (1,0), roztwór mikroelementów 0,5 cm³/dm³ zawierający: FeSO₄·7H₂O 5 g/dm³ MnSO₄·H₂O 1,96 g/dm³, ZnCl₂ 1,66 g/dm³, CoCl₂ 2 g/dm³. Jako źródło węgla używano glukozę – 50 g/dm³ oraz grzybnię *T. reesei* M-7 otrzymaną po hodowli na laktozie.

Do protoplastyzacji używano szczep *Trichoderma reesei* M-7. Hodowle grzyba prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 500 ml, wypełnionych 100 ml pożywki hodowlanej, w wytrząsarce rotacyjnej o 220 obr/min, w temperaturze 28°C. Skład pożywki był taki sam jak w przypadku hodowli szczepu F-19, tylko jako źródło węgla używano glukozę o stężeniu 0,5%. Pożywkę szczepiono grzybnią, w ilości znajdującej się na 0,5 cm² powierzchni skosu brzczkowego. Hodowle prowadzono

przez 72 godziny. Następnie grzybnię filtrowano przez jałową gazę w celu oddzielenia jej zbitych fragmentów. Uzyskany przeczad odwirowywano przy 8000 obr/min przez 5 min, a otrzymane komórki grzybni zawieszano w wodzie destylowanej.

Protoplastyzacja

Przygotowane komórki *T. reesei* M-7 poddawano działaniu enzymów litycznych w celu pozabawienia ich ściany komórkowej. Zastosowano następujące preparaty: ciecz pochodzącą z *T. viride* F-19 – 1 cm³ preparatu na 1 cm³ zawiesiny komórkowej *T. reesei* M-7 (zawartość białka 2 mg/cm³) oraz preparaty handlowe: Enzymy lityczne z *Cytophaga* (Merck) 5 cm³ preparatu/cm³ (zawartość białka 1 mg/cm³) i Lyticasa (Sigma) 5 mg/cm³ (zawartość białka 0,9 mg/cm³). Doświadczenia prowadzono w zbuforowanym środowisku: 0,1 M bufor fosforanowy oraz 0,1 M bufor maleinowy o pH 5,5, w obecności następujących stabilizatorów osmotycznych: MgSO₄, KCl i mannitol w stężeniu 1,2 M. Komórki grzybni w ilości odpowiadającej około 100 mg suchej masy grzybni zawieszano w odpowiednim buforze z dodatkiem enzymów litycznych. Mieszanki reakcyjne inkubowano w wytrząsarce przy 100 obr/min, w temperaturze 30°C, przez 2 godziny. Protoplasty liczone za pomocą hemocytometru Thoma, określając ilość sprotoplastyzowanych komórek w cm³ hodowli wyjściowej.

Regeneracja

Uzyskaną po inkubacji zawiesinę protoplastów filtrowano przez filtr szklany 3G1. Filtrat wirowano 10 minut przy 6000 obr./min, a otrzymany osad zawieszano w 0,05 M buforze maleinowym o pH 5,8, z dodatkiem 0,6 M mannitolu jako stabilizatora osmotycznego. Zdolność do regeneracji badano na płytkach Petriego, na podłożu regeneracyjnym o następującym składzie: 0,1% pepton sojowy, 0,1% KH₂PO₄, 0,03% MgSO₄ x 7 H₂O, 0,05% ekstrakt drożdżowy, 0,06 M sacharoza i 0,7% i 2% agar. Odpowiednio rozcieńczoną zawiesinę protoplastów mieszano z pożywką regeneracyjną (0,7% agar), a następnie wylewano na płytki Petriego z tym samym podłożem (2% agar). Hodowle inkubowano w 30°C do momentu pojawienia się widocznych kolonii *T. reesei* M-7 na płytkach. Zdolność do regeneracji obliczano jako % protoplastów zregenerowanych, w stosunku do liczby protoplastów otrzymanych z 1 cm³ hodowli.

Wyniki i dyskusja

W wyniku przeprowadzonej protoplastyzacji uzyskano liczbę protoplastów rzędu 10⁶–10⁷ komórek na cm³ hodowli. W przypadku stosowania preparatu litycznego z *T. viride* F-19 najlepsze wyniki otrzymano po zastosowaniu buforu maleinowego lub fosforanowego oraz mannitolu jako stabilizatora osmotycznego, odpowiednio 9,12·10⁷ i 4,48·10⁷.

Do protoplastyzacji wykorzystano filtrat z 6. doby hodowli grzyba. Pomimo, że aktywność chitynaz i β -1,3-glukanaz nie była najwyższa w tym okresie hodowli, również aktywność enzymów proteolitycznych, mających niekorzystny wpływ na proces protoplastyzacji, nie osiągnęła wartości maksymalnej (tab. 1).

Tabela 1

Produkcja chitynaz, β -1,3-glukanaz i proteaz podczas hodowli *Trichoderma viride* F-19, w obecności glukozy i grzybni *Trichoderma reesei* M-7 jako źródła węgla.

Production of chitinases, β -1,3-glucanases and proteases during cultivation of *Trichoderma viride* F-19 in the presence of glucose and bot spown of *Trichoderma reesei* M-7 as the carbon source.

Czas hodowli [dni] Time of cultivation [days]	Aktywności enzymatyczne filtratów pochodzących Enzymatic activities of culture filtrates		
	Chitynaza Chitinase [nmol/cm ³ ·min]	β -1,3-glukanaza β -1,3-glucanase [μ mol/cm ³ ·min]	Proteaza Protease [U/cm ³]
1	10,41	1,15	3,18
2	23,67	2,17	5,94
3	27,62	2,14	7,79
4	39,43	6,34	8,15
5	46,78	8,34	8,02
6	61,9	13,23	9,59
7	64,12	14,16	15,07
8	68,23	15,16	14,78
9	73,34	14,12	17,65
10	76,23	12,56	16,64

W przypadku Enzymów litycznych z *Cytophaga* największą liczebność protoplastów otrzymano w wyniku inkubacji komórek w buforze maleinowym z mannitolem ($4,14 \cdot 10^7$) oraz w buforze fosforanowym z $MgSO_4$ ($4,6 \cdot 10^7$). Najniższą wydajność protoplastyzacji zaobserwowano w wyniku działania preparatu Lyticasa. Najlepszy efekt w przypadku tego preparatu uzyskano stosując bufor fosforanowy lub maleinowy z dodatkiem mannitolu (odpowiednio $1,23 \cdot 10^7$ i $9,6 \cdot 10^6$ komórek sprotoplastyzowanych/ml zawiesiny hodowlanej). Efekt działania filtratu pochodzącego *T. viride* był porównywalny z efektem działania Enzymów litycznych z *Cytophaga* (tab. 2).

Spośród stosowanych stabilizatorów osmotycznych najlepszy okazał się mannitol i to zarówno w buforze maleinowym, jak i fosforanowym. Najniższe wyniki uzyskano po użyciu KCl. Oba bufony okazały się dobrym środowiskiem działania enzymów litycznych.

Pomimo wyższej wydajności protoplastyzacji, protoplasty otrzymane w wyniku działania cieczy pochodzącej *Trichoderma viride* F-19 i preparatu handlowego En-

zymów litycznych z *Cytophaga* wykazywały mniejszą zdolność do regeneracji niż po zastosowaniu preparatu Lyticasa. W przypadku filtratu pochodzącego *Trichoderma viride* jest to związane prawdopodobnie z wysoką aktywnością enzymów proteolitycznych, które niszcząc częściowo błonę cytoplazmatyczną uniemożliwiają odtworzenie wyjściowej struktury komórki. Najniższą, 15,3% zdolność do regeneracji protoplastów, otrzymanych pod wpływem preparatu Lyticasa, zanotowano w obecności siarczynu magnezowego(VI) jako stabilizatora osmotycznego w buforze maleinowym. Maksymalne wydajności regeneracji protoplastów otrzymanych pod wpływem filtratu pochodzącego *Trichoderma viride* F-19 i preparatu Enzymów litycznych z *Cytophaga* wynosiły odpowiednio 3,5% (bufor fosforanowy, KCl) i 3,3% (bufor maleinowy, KCl). Wydajności regeneracji przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Wpływ zastosowanego preparatu enzymów litycznych i warunków reakcji na protoplastyzację i regenerację protoplastów grzyba *T. reesei* M-7.

Effect of lytic enzymes preparations and conditions of reaction on yield of protoplasting and regeneration frequency of protoplasts from *Trichoderma reesei* M-7.

Środowisko reakcji (bufor i stabilizator osmotyczny) Conditions of reaction (buffer and osmotic stabilizer)	Preparat lityczny Lytic enzymes preparation	Liczba protopl. w cm ³ hodowli Number of proto- plasts in 1 cm ³ of culture medium	Wydajność regeneracji [%] Regeneration frequency [%]
b. maleinowy, mannitol	filtrat pochodzący <i>Trichoderma viride</i> F-19 culture filtrate of <i>Tricho- derma viride</i> F-19	9,12·10 ⁷	0,015
b. maleinowy, KCl		1,44·10 ⁷	0,08
b. maleinowy, MgSO ₄		3,04·10 ⁷	0,23
b. fosforanowy, mannitol		4,48·10 ⁷	0,9
b. fosforanowy, KCl		1,72·10 ⁷	3,5
b. fosforanowy, MgSO ₄		3,0·10 ⁷	0,2
b. maleinowy, mannitol	Enzymy lityczne z <i>Cytophaga</i> Lytic Enzymes from <i>Cy- tophaga</i>	4,14·10 ⁷	0,05
b. maleinowy, KCl		2,4·10 ⁶	3,3
b. maleinowy, MgSO ₄		1,86·10 ⁷	3,2
b. fosforanowy, mannitol		1,98·10 ⁷	0,2
b. fosforanowy, KCl		5,8·10 ⁶	0,7
b. fosforanowy, MgSO ₄		4,6·10 ⁷	0,08
b. maleinowy, mannitol	Lyticasa Lyticase	9,6·10 ⁶	4,16
b. maleinowy, KCl		6,15·10 ⁶	0,16
b. maleinowy, MgSO ₄		3,9·10 ⁶	15,3
b. fosforanowy, mannitol		1,23·10 ⁷	0,65
b. fosforanowy, KCl		5,85·10 ⁶	6,8
b. fosforanowy, MgSO ₄		5,1·10 ⁶	0,27

Przedstawione wyniki są porównywalne z uzyskanymi przez innych badaczy. Kitamoto [3] badając wpływ enzymów litycznych na protoplastyzację komórek 30 gatunków grzybów uzyskał wydajności w zakresie od $4 \cdot 10^4$ do $1,6 \cdot 10^8$ protoplastów z cm^3 hodowli. Znacznie wyższa była natomiast zdolność do regeneracji otrzymanych protoplastów, szczególnie po zastosowaniu preparatów enzymatycznych o obniżonej zawartości proteaz. Podobne tendencje zaobserwowano podczas badań nad protoplastyzacją komórek *T. reesei* przy użyciu preparatów handlowych enzymów litycznych: Novozyme i Fungelase w obecności 0,7 M KCl i 0,6 M sacharozy jako stabilizatorów osmotycznych. Zdolność do regeneracji w tych warunkach procesu wynosiła aż od 38,11 do 51,77% [4].

Wnioski

1. Wydajności protoplastyzacji komórek *Trichoderma reesei* M-7, po zastosowaniu filtratu pochodzącego *Trichoderma viride* F-19 i preparatu Enzymów litycznych z *Cytophaga*, były porównywalne i wyższe od uzyskanych w obecności preparatu Lyticasa.
2. Protoplasty otrzymane w wyniku działania cieczy pochodzącej *Trichoderma viride* F-19 i preparatu Enzymów litycznych z *Cytophaga* wykazywały mniejszą zdolność do regeneracji niż po zastosowaniu preparatu Lyticasa.
3. W przypadku filtratu *Trichoderma viride* powyższy efekt był prawdopodobnie związany z wysoką aktywnością enzymów proteolitycznych zawartych w tym preparacie.
4. Dalsze prace powinny koncentrować się na opracowaniu metod usuwania proteaz z filtratów pochodzących grzybów z rodzaju *Trichoderma* oraz doborze szczepów i warunków hodowli, aby otrzymywać preparaty lityczne o wysokich aktywnościach β -glukanaz i chitynaz, a maksymalnie niskich enzymów proteolitycznych.

LITERATURA

- [1] Chmiel A.: Biotechnologia, PWN, Warszawa 1991, 268.
- [2] Janas P., Targoński Z.: Effect of temperature on the production of cellulases, xylanases and lytic enzymes by selected *Trichoderma reesei* mutants. *Acta Mycol.*, 30, 1995, 255.
- [3] Kitamoto Y., Mori N., Yamamoto M., Ohiwa T., Ichikawa Y.: Cell-wall lytic *Trichoderma* enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 1988, 445.
- [4] Lakshmi B.R., Chandra T. S.: Rapid release of protoplasts from *Eremothecium ashbyii* in comparison with *Trichoderma reesei* and *Penicillium chrysogenum* using Novozyme and Fungelase. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 15, 1993, 699.

- [5] Lowry O.H., Rosenbourn N.J., Farr R.L., Rendel R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, 265.
- [6] Mandels W., Weber J.: The production of cellulase. In: *Cellulase and their application*. *Adv. Chem. Ser.*, 95, 1969, 391.
- [7] Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31, 1959, 426.
- [8] Minuth W., Esser K.: Intraspecific, interspecific and intergenetic recombination of β -lactam producing fungi via protoplast fusion. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 1983, 38.
- [9] Peberby J.F.: Protoplast fusion – a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganism. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2, 1980, 23.
- [10] Targoński Z.: Biosynteza celulaz, ksylanaz i enzymów litycznych przez *Trichoderma reesei* QM 9414 i *Trichoderma viride* F-19. *Biotechnologia*, 3(2), 1991, 50.
- [11] Villanueva J.R., Garcia Acha I.: Production and use of fungal protoplasts. *Methods in Microbiol.*, 4, 1971, 665.

ISOLATION OF PROTOPLASTS FROM *TRICHODERMA REESEI* M-7 BY THE USE OF LYTIC ENZYMES FROM *FRICHODERMA VIRIDE* F-19

S u m m a r y

High costs of commercially available lytic enzymes oblige to searching for new methods of isolation of protoplasts from filamentous fungi and yeast cells. The aim of work was the effect of the culture filtrate from *Trichoderma viride* F-19 on the protoplasts formation of *Trichoderma reesei* M-7 in comparison with commercially available preparations of cell-wall lytic enzymes. The yields of protoplasts obtained with culture filtrates of *Trichoderma viride* F-19 and Lytic Enzymes from Cytophage were comparable. Less number of protoplasts has been estimated after incubation of cells with Lyticase. In spite of higher yield of protoplasting, protoplasts derived from culture filtrates of *Trichoderma viride* F-19 and Lytic Enzymes from Cytophage gave a worse regeneration frequency then Lyticase – derived protoplasts. ☒