

PIOTR JANAS, JAN FIEDUREK, ZDZISŁAW TARGOŃSKI,
STANISŁAW MLEKO

IZOLACJA I WSTĘPNA CHARAKTERYSTYKA NISKOPROTEAZOWYCH MUTANTÓW *TRICHODERMA REESEI*

Streszczenie

Po mutagenizacji promieniowaniem UV i NTG szczepu *Trichoderma reesei* M-7 i selekcji na podłożu z dodatkiem żelatyny wyizolowano około 960 niskoproteazowych mutantów. Dziesięć z nich zostało przetestowanych podczas hodowli okresowych w zakresie produkcji celulaz, proteaz i beta-galaktozydazy w obecności serwatki i laktozy jako źródła węgla. Aktywności proteolityczne oznaczone po hodowlach 9 mutantów w obecności laktozy były niższe od szczepu wyjściowego. Zaobserwowano większy indukcyjny wpływ serwatki niż laktozy, na sekrecję proteaz przez wszystkie badane szczepy. Czysta laktoza okazała się bardziej efektywnym induktorem produkcji beta-galaktozydazy niż zawarta w serwatce. Plony biomasy większości mutantów po hodowlach na serwatce były tylko nieznacznie wyższe od oznaczonych po hodowlach na czystej laktozie. Było to prawdopodobnie związane z litycznym mechanizmem kompensującym proteaz, przejawiających wyższe aktywności w filtratach pochodzących z hodowli w obecności serwatki. Praca jest wstępem do dalszych badań nad zależnościami pomiędzy proteazami i innymi enzymami w filtratach pochodzących z hodowli *Trichoderma reesei*.

Słowa kluczowe: *Trichoderma reesei*, niskoproteazowe mutanty, laktoza, serwatka.

Wstęp

Jednymi z najlepszych producentów enzymów celulolitycznych o znaczeniu przemysłowym są grzyby z rodzaju *Trichoderma*, a w szczególności *Trichoderma reesei* QM6a i jej mutanty. Efektywnym induktorem produkcji celulaz *T. reesei* jest laktoza, ale w stanie czystym jest zbyt droga jako źródło węgla do hodowli grzybów. Ze względu na wysoką zawartość tego cukru, a także kwasu mlekowego, witamin oraz mikroelementów w serwatce, produkcji ubocznym mleczarni, można ją z powodze-

niem wykorzystać do tego celu. Poważnym problemem podczas hodowli *T. reesei*, zarówno w obecności czystej laktozy jak i serwatki, są proteazy obecne w filtratach pochodzących z grzyba, które powodują posekrecyjne modyfikacje celulaz, a przez to wpływają na obniżenie ich aktywności. Poprzez dobór warunków hodowli – pH podłoża hodowlanego, rodzaj i stężenie źródła azotu i węgla oraz rodzaj hodowli można otrzymywać filtry o niskich aktywnościach proteaz.

W prezentowanej pracy podjęto próby uzyskania mutantów *Trichoderma reesei* o obniżonych w stosunku do szczepu rodzicielskiego zdolnościach do produkcji enzymów proteolitycznych. Mutanty testowano podczas hodowli okresowych w obecności czystej laktozy i serwatki jako źródeł węgla.

Material i metody badań

W badaniach zastosowano:

1. *Szczep Trichoderma reesei M-7* (szczep wyjściowy) pochodzący z kolekcji mikroorganizmów Katedry Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowywania AR w Lublinie, charakteryzujący się zdolnościami do zwiększonej sekrecji enzymów zewnątrzkomórkowych (celulaz, ksylanaz i enzymów autolitycznych) podczas hodowli na płynnym podłożu mineralnym. Szczep wyizolowano po mutagenizacji promieniami UV *Trichoderma reesei* QM 9414.
2. *Niskoproteazowe mutanty Trichoderma reesei*. Indukcję mutantów prowadzono przez naświetlanie zawiesiny konidiów szczepu *Trichoderma reesei* M-7 promieniami UV oraz poddaniu jej działaniu 0,01% roztworu nitrozoguanidyny. Po odwirowaniu konidiów, prowadzono selekcję mutantów o zmniejszonych zdolnościach do sekrecji proteaz podczas hodowli na płynnym podłożu mineralnym z 1% dodatkiem żelatyny, w celu pobudzenia do szybkiego wzrostu konidii o wyższych aktywnościach proteolitycznych. Konidia wykiełkowane oddzielano przez sączenie od konidiów niewykiełkowanych. Przesącz zawierający spory niewykiełkowane wysiewano na agar brzeczkowy i inkubowano przez 3 dni w temp. 30°C. Wyrosłe kolonie przeszczepiano na podłoże zawierające 1% żelatyny. Kolonie wykazujące najniższy wzrost na podłożu z żelatyną poddawano hodowli wstrząsanej na podłożu płynnym wg Mandels i Weber [9]. Za podstawę do oceny aktywności proteolitycznych przyjęto wielkość stref dyfuzji enzymów zawartych w płynach pochodzących, które nakraplano do studzienek wyciętych w podłożu agarowym z żelatyną. Spośród około 960 wyizolowanych mutantów, wybrano 10, których zdolności do syntezy enzymów proteolitycznych, celulolitycznych i beta-galaktozydazy sprawdzono podczas hodowli prowadzonych w kolbach Erlenmeyera o pojemności 500 cm³ na podłożu wg Mandels i Weber [9] z dodatkiem 1% laktozy i serwatki.

Hodowle mikroorganizmów

Hodowle mutantów prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 500 cm³ napełnionych 100 cm³ pożywki wg Mandels i Weber [9] z 1% laktozy. Serwatkę rozcieńczano, aby stężenie zawartej w niej laktozy, również wynosiło około 1%. pH pożywki ustalano na poziomie 5 i sterylizowano w autoklawie w 110°C przez 30 min. Kolby szczepiono 4 cm³ wcześniej przygotowanego płynnego inokulum z grzybnią odpowiedniego mutantu. Hodowle prowadzono w wytrząsarce rotacyjnej (250 obr./min) w temp. 26°C przez 72 godziny. Hodowle prowadzono w dwóch powtórzeniach.

Oznaczanie aktywności enzymatycznych

Do oznaczenia 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 temp. 50°C przez 30 min. Po tym czasie reakcję przerywano dodając do objętości reakcyjnej 2,25 cm³ 5% kwasu trójchlorooctowego, a następnie wirowano przez 10 min. Ekstynkcję cieczy nadosadowej odczytywano przy $\lambda = 366$ nm wobec kontroli odczynnikowej. Za jednostkę aktywności proteolitycznej przyjęto zmianę ekstynkcji mieszaniny reakcyjnej w ciągu 1 min w 1 cm³ filtratu pochodowlanego.

Ogólną aktywność celulolityczną oznaczano wobec bibuły filtracyjnej (tzw. aktywność FPA). 50 mg (1 × 6 cm) paski bibuły filtracyjnej Whatman No 1. umieszczano w probówkach i dodawano 1 cm³ 0,1M buforu octanowego o pH = 4,8 i 0,5 cm³ odpowiednio rozcieńczonego filtratu pochodowlanego. Mieszaninę inkubowano przez 1 godz. w temp. 50°C. Ilość uwolnionych cukrów redukujących oznaczano metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynnika zawierającego kwas 3,5 dwunitrosalicylowy. Aktywność celulaz w filtratach pochodowlanych wyrażano w jednostkach FPU (Filtre Paper Unit) wg IUPAC [2]. Za jednostkę FPU przyjęto ilość enzymu, zawartego w 1 cm³ płynu pochodowlanego, która uwalnia 1 μ mol (180 μ g) glukozy w ciągu 1 min w warunkach reakcji.

Do oznaczenia aktywności β -galaktozydazy używano 0,01M roztworu β -o-nitrofenylogalaktozydu (β -nifegalu). Do 0,5 cm³ roztworu β -nifegalu dodawano 3,5 cm³ 0,1M buforu octanowego o pH = 4,8 i 1 cm³ odpowiednio rozcieńczonego filtratu pochodowlanego. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temp. 30°C przez 30 min. Reakcję przerywano dodając do objętości reakcyjnej 1 cm³ 1M roztworu węglaanu sodu, a następnie 10 cm³ wody. Ekstynkcję prób odczytywano przy długości fali 420 nm wobec próby odczynnikowej. Za jednostkę aktywności β -galaktozydazy przyjęto

zmianę ekstynkcji mieszaniny reakcyjnej w ciągu 1 min w 1 cm³ filtratu pochodzącego.

Oznaczanie suchej masy grzybni

Pobierano 10 cm³ zawiesiny hodowlanej i odwirowywano w ciągu 10 min przy 15000xg. Zlewano supernatant, a grzybnię przemywano wodą destylowaną, ponownie wirowano i suszono do stałej masy w temp. 105°C.

Wyniki i dyskusja

Aktywności proteolityczne oznaczone po hodowli 9 mutantów *T. reesei* w obecności laktozy jako źródła węgla były o około 30 do 60% niższe od szczepu wyjściowego. U jednego mutantu oznaczonego symbolem Mp8, aktywność ta była znacznie wyższa i wynosiła 16,45 U/cm³·10³. Filtraty pochodzące tego mutantu charakteryzowały się również najniższymi aktywnościami celulolitycznymi. Najniższą aktywność proteolityczną oznaczono w filtratach po hodowli mutantu Mp5 w obecności laktozy. Była ona ujemnie skorelowana z aktywnością celulolityczną FPU, której wartość była prawie identyczna jak szczepu kontrolnego M-7 (1,364 FPU/cm³ – tab. 1).

Tabela 1

Produkcja celulaz i proteaz przez niskoproteazowe mutanty i szczep wyjściowy *Trichoderma reesei* podczas hodowli w obecności 1% serwatki jako źródła węgla.

Production of cellulases and proteases by low-protease mutants and parental strain of *Trichoderma reesei* during cultivation on 1% of whey as source of carbon.

Szczep <i>Trichoderma reesei</i> [*] Strain of <i>Trichoderma reesei</i> [*]	Aktywność celulolityczna [FPU/cm ³] Cellulolytic activity [FPU/cm ³]	Aktywność proteolityczna [U/ cm ³ · 10 ³] Proteolytic activity [U/ cm ³ · 10 ³]
Mp1	0,665	18,86
Mp2	0,738	8,41
Mp3	0,58	11,68
Mp4	0,593	8,76
Mp5	0,92	11,01
Mp6	0,446	8,49
Mp7	0,808	14,19
Mp8	0,64	25,5
Mp9	0,785	12,84
Mp10	0,998	7,92
M-7	0,872	18,64

^{*}*Trichoderma reesei* Mp1-Mp10 – niskoproteazowe mutanty, *Trichoderma reesei* M-7 szczep wyjściowy

^{*}*Trichoderma reesei* Mp1-Mp10 – low-protease mutants, *Trichoderma reesei* M-7 – parental strain

Niespecyficzne aktywności celulolityczne filtratów uzyskanych po hodowli pozostałych niskoproteazowych mutantów były od około 5,5 do 38% niższe od aktywności kontrolnej szczepu rodzicielskiego. Filtraty uzyskane po hodowlach szczepu wyjściowego M-7 i 10 pochodzących od niego mutantów w obecności 1% serwatki charakteryzowały się niższymi aktywnościami FPU od oznaczanych po hodowlach w obecności laktozy jako źródła węgla. Zaobserwowano natomiast większy niż laktozy, indukcyjny wpływ serwatki, na sekrecję proteaz przez wszystkie badane szczepy (tab. 2).

Tabela 2

Produkcja celulaz i proteaz przez niskoproteazowe mutanty i szczep wyjściowy *Trichoderma reesei* podczas hodowli w obecności 1% laktozy jako źródła węgla.

Production of cellulases and proteases by low-protease mutants and parental strain of *Trichoderma reesei* during cultivation on 1% of lactose as source of carbon.

Szczep <i>Trichoderma reesei</i> [*] Strain of <i>Trichoderma reesei</i> [*]	Aktywność celulolityczna [FPU/cm ³] Cellulolytic activity [FPU/cm ³]	Aktywność proteolityczna [U/ cm ³ · 10 ³] Proteolytic activity [U/ cm ³ · 10 ³]
Mp1	1,016	6,32
Mp2	0,886	6,51
Mp3	0,926	6,0
Mp4	0,832	5,51
Mp5	1,364	3,94
Mp6	1,194	6,65
Mp7	0,90	5,48
Mp8	0,786	16,45
Mp9	1,198	5,38
Mp10	1,268	6,52
M-7	1,34	9,53

^{*}*Trichoderma reesei* Mp1-Mp10 – niskoproteazowe mutanty, *Trichoderma reesei* M-7 szczep wyjściowy

^{*}*Trichoderma reesei* Mp1-Mp10 – low-protease mutants, *Trichoderma reesei* M-7 – parental strain

Osiem wyselekcjonowanych niskoproteazowych mutantów charakteryzowało się niższymi (31 do 57,5%), od mutantu wyjściowego, aktywnościami protelitycznymi filtratów pochodzących. Mutant Mp7 syntetyzował proteazy o zbliżonych aktywnościach, natomiast w filtracie pochodzącym Mp8 oznaczono o 27% wyższe aktywności proteolityczne od M-7. Dwa spośród mutantów (Mp5 i Mp10) o niższych od szczepu rodzicielskiego aktywnościach proteolitycznych, charakteryzowały się nieznacznie wyższymi aktywnościami celulolitycznymi filtratów. U pozostałych mutantów aktywności te były od 7,4 do 92,6% niższe od oznaczonych podczas hodowli szczepu wyjściowego w obecności serwatki (tab. 1). Czysta laktoza okazało się bardziej efektywnym induktorem produkcji beta-galaktozydazy niż zawarta w serwatce. Aktywności tego

enzymu oznaczone w filtratach 9 niskoproteazowych mutantów i szczepu rodzicielskiego były wyższe w obecności pierwszego induktora (tab. 3).

Tabela 3

Aktywności filtratów pochodzących oznaczonych po hodowlach okresowych niskoproteazowych mutantów i szczepu wyjściowego *Trichoderma reesei* w obecności 1% serwatki i laktozy jako źródeł węgla. Activities of culture filtrates estimated after batch cultivation of low-protease mutants and parental strain of *Trichoderma reesei* in the presence of 1% of whey and lactose as source of carbon.

Szczep <i>Trichoderma reesei</i> * Strain of <i>Trichoderma reesei</i> *	Aktywności beta-galaktozydazy [U/cm ³ · 10 ³] Activities of beta-galactosidase [U/cm ³ · 10 ³]	
	Źródło węgla – 1% serwatka Source of carbon – 1% whey	Źródło węgla – 1% laktoza Source of carbon – 1% lactose
Mp1	16,23	41,0
Mp2	25,56	27,2
Mp3	14,67	42,2
Mp4	17,56	16,0
Mp5	38,78	57,9
Mp6	17,87	46,9
Mp7	29,67	55,7
Mp8	18,5	19,5
Mp9	24,5	66,8
Mp10	35,7	37,6
M-7	31,9	55,5

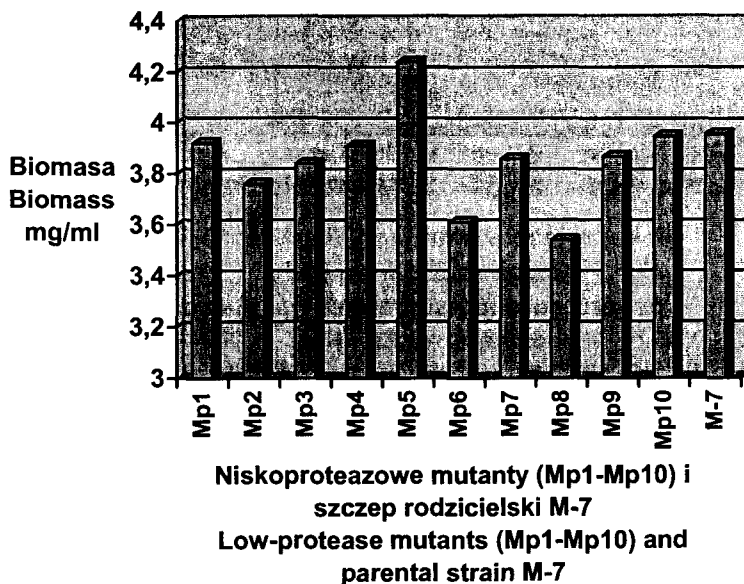
**Trichoderma reesei* Mp1- Mp10 – niskoproteazowe mutanty, *Trichoderma reesei* M-7 szczep wyjściowy

**Trichoderma reesei* Mp1- Mp10 – low-protease mutants, *Trichoderma reesei* M-7 – parental strain

Pomimo zawartości białka w serwatce stanowiącego dodatkowe źródło węgla i azotu podczas hodowli, plony biomasy 8 mutantów i szczepu M-7 były tylko nieznacznie wyższe od oznaczonych po hodowlach na czystej laktozie. Było to prawdopodobnie związane z litycznym mechanizmem kompensującym proteaz, przejawiających wyższe aktywności w filtratach pochodzących z hodowli w obecności serwatki (rys. 1, 2).

Nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy proteazy powodują potranslacyjne modyfikacje celulaz i innych enzymów w filtratach pochodzących. Brak tego wpływu potwierdziły wyniki eksperymentu przeprowadzonego przez Janasa [5]. Przeprowadzono elektroforetyczny rozdział białek z filtratów otrzymanych po hodowlach ciągłych mutantu *T. reesei* M-7 w różnych zakresach temperatury i przy różnych stężeniach induktora i represora w podłożu [6]. Następnie prowadzono 3-dniową inkubację wszystkich filtratów w 3 zakresach temperatury identycznych z temperaturą hodowli (26, 30 i 34°C), po czym sprawdzono ewentualne zmiany niespecyficznego aktywności celulolitycznej i ponownie przeprowadzono elektroforezę białek na żelu po-

liakrylamidowym w warunkach denaturujących. Nie stwierdzono wyraźnych zmian w aktywnościach celulolitycznych (FPU) i w profilach elektroforetycznych białek. Wyniki te są potwierdzeniem doniesień zaprzeczających wpływowi proteaz na celulazy podczas hodowli fermentorowych prowadzonych przy stałym pH [8, 10]. Jest to prawdopodobnie związane z właściwościami enzymów produkowanych przez *Trichoderma reesei*, które należą do podklasy proteinaz aspartylowych, przejawiających maksymalną aktywność przy pH poniżej 4 [3]. Hipotezę tę potwierdzają wyniki badań nad modyfikacjami proteolitycznymi celulaz podczas hodowli okresowej *Trichoderma reesei* QM 9414 w kolbach Erlenmayera, prowadzone przez zespół Kubicka [4]. Użycie przeciwciał monoklonalnych przeciwko poszczególnym domenom celulaz umożliwiło udowodnienie obecności w filtratach pochodzących z końcowego okresu hodowli (niskie pH) częściowo zmodyfikowanych w wyniku proteolizy pochodnych form CBH I i CBH II.

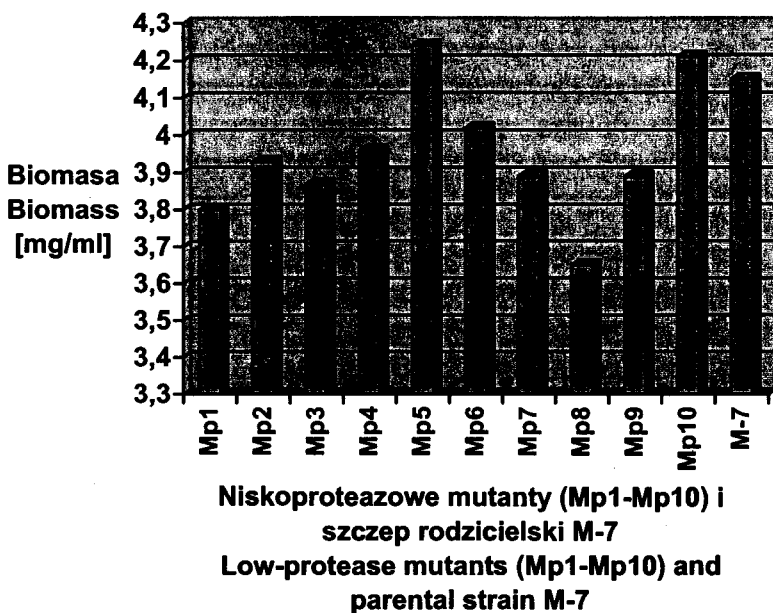


Rys. 1. Plony biomasy uzyskane po hodowlach niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* i szczepu wyjściowego w obecności laktozy jako źródła węgla.

Fig. 1. Yield of biomass obtained after cultivation of low-protease mutants of *T. reesei* and parental strain in the presence of lactose as a source of carbon.

Występowanie lub brak posekrecyjnych modyfikacji celulaz może być związane zarówno z rodzajem fermentacji (w fermentorze z regulacją pH lub w kolbie Erlenmayera), jak i sposobem prowadzenia eksperymentu czy składem podłoża hodowlanego. Potwierdzają to wyższe aktywności proteaz w filtratach pochodzących z hodowli

stosowanych szczepów *T. reesei*, w obecności serwatki zawierającej wysokie stężenie białka. Należy również pamiętać o niejednakowej wrażliwości celulaz pochodzących z różnych źródeł na działanie proteaz. Akiba i wsp. [1] oczyszczili i scharakteryzowali endo β -1,4 glukanazę z cieczy pochodzącej z *Aspergillus niger* odporną na proteolityczny atak. Nie stwierdzono obniżenia aktywności tego enzymu nawet po dwutygodniowej inkubacji w 40°C z proteazą (sawinazą).



Rys. 2. Plony biomasy uzyskane po hodowlach niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* i szczepu wyjściowego w obecności serwatki jako źródła węgla.

Fig. 2. Yield of biomass obtained after cultivation of low-protease mutants of *T. reesei* and parental strain in the presence of whey as a source of carbon.

Poza mutagenizacją oraz doбором warunków hodowli, dużą rolę w otrzymywaniu szczepów produkujących proteazy o niskich aktywnościach odgrywają techniki inżynierii genetycznej. Bakteria *E. coli* jest używana do produkcji licznych białek heterologicznych. W kompartmentach komórkowych *E. coli* występują proteazy, które pełnią różne funkcje. Np. proteaza DeP odpowiedzialna jest za degradację niesfałdowanych i nieprawidłowo ukształtowanych białek. Z kolei proteaza OmT (białko alfa), obecna w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej bakterii, powoduje proteolizę wielu rekombinowanych białek syntetyzowanych przez *E. coli*, co jest niekorzystne z biotechnologicznego punktu widzenia.

Jiang i wsp.[7] przeprowadzili dysrupcję genu kodującego proteazę OmT przez zamianę na gen oporności na chloramfenikol. Otrzymane w ten sposób rekombinanty charakteryzowały się zwiększoną stabilnością biosyntezy *in vitro* białka fosfolipazy D.

Prezentowana praca stanowi wstęp do dalszych badań nad zależnościami pomiędzy proteazami i innymi enzymami filtratów pochodzących *Trichoderma reesei*.

Wnioski

1. Dziewięć niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* M-7 charakteryzowało się niższymi od szczepu wyjściowego aktywnościami proteolitycznymi filtratów otrzymanych po hodowlach w obecności laktozy i osiem w obecności serwatki jako źródła węgla.
2. Serwatka wywierała większy indukcyjny wpływ na sekrecję proteaz podczas hodowli wszystkich badanych szczepów niż laktoza.
3. Czysta laktoza okazała się bardziej efektywnym induktorem produkcji beta-galaktozydazy przez mutanty niż zawarta w serwatce.
4. Plony biomasy ośmiu mutantów i szczepu M-7 były tylko nieznacznie wyższe od oznaczonych po hodowlach na serwatce niż na czystej laktózie, co było prawdopodobnie związane z litycznym mechanizmem kompensującym proteaz, przejawiających wyższe aktywności w filtratach pochodzących z hodowli w obecności serwatki.

Literatura

- [1] Akiba S., Kimura Y., Yamamoto K., Kumagai H.: Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. J. Ferment. Bioeng., 1994, **79** (2), 125-150.
- [2] Ghose T.K.: Measurement of cellulase activities. Pure Appl. Chem., 1987, **55**, 257.
- [3] Haab D., Hagspiel K., Szakmary K., Kubicek C.P.: Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulase degradation. J. Biotechnol., 1990, **16**, 187-198.
- [4] Hagspiel K., Haab D., Kubicek C.P.: Protease activity and proteolytic modification of cellulases from *Trichoderma reesei* QM 9414 selectant. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, **32**, 61-67.
- [5] Janas P.: Produkcja celulaż, ksylanaz i enzymów autolitycznych przez wybrane mutanty *Trichoderma reesei* w hodowlach okresowych i ciągłych. Praca doktorska, UMCS, Lublin 1997, s.92.
- [6] Janas P., Targoński Z., Udeh K.O., Waśko A.: Production of extracellular enzymes by *Trichoderma reesei* M-7 on mixtures of lactose and glucose at different temperatures. Pol. J. Food. Nutr. Sci., 2002, **11** (52), 23-29.
- [7] Jiang X., Oohira K., Iwasaki Y., Nakano H., Ichihara S., T Yamane.: Reduction of protein degradation by use of protease-deficient mutants in cell-free protein synthesis system of *Escherichia coli*. J. Biosc. Bioeng., 2002, **93** (2), 151-156.
- [8] Kammel W.P., Kubicek C.P.: Absence of postsecretional modification in extracellular proteins of *Trichoderma reesei* during growth on cellulose. J. Appl. Biochem., 1985, **7**, 138-144.
- [9] Mandels W., Weber J.: The production of cellulase. In: Cellulase and their application. Adv. Chem. Ser. Eds.: G.J. Hajny, E.T. Reese, Pergamon Press, Oxford 1969, pp. 391-413.

- [10] Sheir-Neiss G., Montencourt B.S.: Characterization of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1984, 20, 46-53.

ISOLATION AND ELEMENTARY CHARACTERISTIC OF LOW-PROTEASE MUTANTS OF *TRICHODERMA REESEI*

S u m m a r y

It has been isolated 960 low-protease mutants after mutagenisation using UV radiation and NTG and selection on medium with addition of gellatine. Ten of them have been tested during batch cultivation for the production of cellulases, proteases and beta-galactosidase in the presence of whey and lactose as a source of carbon. Proteolytic activities estimated after cultivation of 9 mutants in the presence of lactose were lower than parental strain. It has been observed better inductive effect of whey than lactose on the secretion of proteases by all mutants tested. Pure lactose appeared to be more effective inducer of the production of beta-galactosidase than contains in whey. Biomass concentration of most mutants after cultivation on whey was only slightly higher than estimated after cultivation on pure lactose. It was probably connected with lytic compensatory mechanism of proteases exhibited higher activities in culture filtrates from cultivation in the presence of whey. This work is an introduction for future studies on correlation between proteases and other enzymes in culture filtrates of *Trichoderma reesei*.

Key words: *Trichoderma reesei*, low-protease mutants, lactose, whey. ☒

XI INTERNATIONAL STARCH CONVENTION

CRACOW - MOSCOW

June 15 - 18, 2004

XI ISC