



wgłębnej. Mutanty indukowano przez naświetlenie wodnych zawiesin konidiów promieniami UV w dawkach 1920–4800 ergów/mm<sup>2</sup> lub UV w połączeniu z 0,01% roztworem nitrozoguanidyny (NTG) działającym w czasie 15–30 min. W tych warunkach przeżywalność konidiów mieściła się w granicach 0,6–27,5%. Działanie mutagenów przerywano przez odwirowanie konidiów (10 min, 10 000 × g) i zawieszenie ich w jałowej wodzie destylowanej. Selekcja form zmutowanych i auktrotroficznych *P. notatum* z zawiesiny konidiów potraktowanej mutagenami dokonywana była przez jej krótkotrwałą (12 godz.) inkubację na wytrząsarce w podłożu minimalnym Czapeka (glukoza 1%; NaNO<sub>3</sub> 0,2%; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1%; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 0,05%; KCl 0,05%; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 0,001%; pH 5,5) i późniejsze oddzielenie kiełkujących spor od nie wykiełkowanych. Po oddzieleniu wykiełkowanych konidiów (wata szklana) pozostałą część odpowiednio rozcieńczonej zawiesiny zmutowanych form wysiewano na płytki Petriego z agarem brzeczkowym i inkubowano przez 4 dni w temp. 30°C.

Izolowane na każdym etapie mutagenizacji mutanty *P. notatum* poddawane były wstępnej ocenie pod względem aktywności dekstranolitycznej, której dokonywano na podstawie pomiaru wielkości stref dyfuzji enzymu do podłoża selekcyjnego A (pH 5,5), składającego się z dekstranu (m.cz. 40 mln) 1%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%; NaNO<sub>3</sub> 0,2% i agaru 2%. Powstające wokół wyrosłych (po 4 dniach inkubacji w temp. 30°C) kolonii strefy przejaśnienia podłoża są następstwem rozkładu dekstranu.

Następny etap selekcji szczepów aktywnych pod względem syntezy dekstranazy dokonywany był przez mikrohodowle probówkowe kultur (średnica probówek 2,5 cm, 12 ml podłoża), których kolonie tworzyły strefy aktywności tego enzymu o największych średnicach. Aktywności dekstranolityczne stwierdzone w płynach pohodowlanych określano techniką dyfuzji płytkowej, używając podłoża selekcyjnego B zawierającego dekstran (m.cz. 40 mln) 1%; agar 2% i 0,1 M bufor octanowy, pH 5,0, do 100%. Po wycięciu w nim „studzienek” o średnicy 8 mm napełniano je w ilości 0,05 ml przesączem pohodowlanym uzyskanym z 4-dniowej hodowli wytrząsanej na podłożu podstawowym z dekstranem (dekstran — m.cz. 110 000 1,5%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%; NaNO<sub>3</sub> 0,2%; ekstrakt drożdżowy 0,2%; pH 5,5) i płytki inkubowano w temp. 30°C w ciągu 18 godz. W następstwie tego wokół „studzienek” powstawały dobrze widoczne granice dyfuzji enzymu w postaci jasnego pierścienia. Porównując rozmiary dyfuzji enzymu wywołane przez płyn pohodowlany szczepu wyjściowego (kontrola) z płynami pochodzącymi od jego mutantów, staje się możliwe różnicowanie form bardziej aktywnych od nie zmienionych lub wykazujących spadek aktywności dekstranolitycznej. Wyselekcjonowane na tej podstawie mutanty poddano następnie szczegółowej ocenie na aktywność dekstranazy w warunkach 4-dniowej hodowli wgłębnej prowadzonej w kolbach stożkowych à 500 ml, zawierających po 100 ml pożywki podstawowej z dekstranem, w temp. 30°C, na wytrząsarce rotacyjnej poruszającej się z szybkością 220 obr./min.

Dla otrzymania protoplastów grzyb *P. notatum* wyrastał na podłożu zawierającym: glukozę 0,5%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5%; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5%; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 0,1%; ekstrakt drożdżowy 0,2%; pH 5,0–6,0. Hodowlę prowadzono w czasie 18–20 godz. w temp. 30° na wytrząsarce (220 obr./min) w kolbach stożkowych à 500 ml, zawierających 100 ml podłoża. Namnożoną grzybnię (400–600 mg wilgotnej masy) filtrowano przez sączek G-2, przemywano wodą jałową oraz 1 M roztworem sorbitolu i przenoszono na 1–4 godz. do kolby stożkowej à 100 ml, zawierającej 20 ml wyjałowionego (przy użyciu filtru bakteriologicznego Schleichera i Schuella, Niemcy) roztworu enzymów litycznych (sorbitol 0,85 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 M; Novozym 234, Novo, Dania — 5 mg/ml; pH 6,0). Protoplastyzacja zachodziła w warunkach statycznych w temp. 25°C. Utworzone protoplasty oddzielano od resztek grzybni za pomocą sączenia przez filtr G-2, dwukrotnie przemywano 1 M sorbitolem, zbie-



rano przez odwirowanie (600–800 ×g, 10 min, 4°C) i zawieszano w odpowiedniej objętości 1 M sorbitolu w celu uzyskania stężenia  $10^7$  protoplastów/ml. Liczbę utworzonych protoplastów określano w komorze Bürkera, a ich żywotność badano stosując błękit trypanowy jako wskaźnik (11). Żywe protoplasty pozostawiały w tym teście odbarwione (14). Pomiaru wielkości oraz zdjęć mikroskopowych protoplastów dokonywano przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego (Nikon, Optiphot 2, Japonia) przy powiększeniu 1000 razy.

Aktywność dekstranazy w przesączach hodowlanych oznaczano wobec dekstranu jako substratu. W tym celu do 1 ml 2% dekstranu (m.c.z. 110 000) w 0,1 M buforze octanowym (pH 5,0) dodawano 0,5 ml odpowiednio rozcieńzonego enzymu (płyn pochodzący). Po trwającej 30 min inkubacji w temp. 50°C oznaczano uwolnione z dekstranu cukry redukujące w reakcji z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (19). Za jednostkę aktywności dekstranazy (DU) przyjęto ilość enzymu, która w ciągu 1 min w warunkach oznaczania uwalnia z dekstranu cukry redukujące równoważne mikromolowi izomaltozy (mierzonej jako maltoza). Białko rozpuszczalne analizowano według metody podanej przez Schacterle i Pollacka (25), a suchą masę grzybni określano po jej wysuszeniu do stałej wagi w temp. 105°C.

#### WYNIKI I DYKUSJA

W podjętych badaniach kulturę rodzicielską stanowił grzyb *Penicillium notatum* 1. Gatunek ten jest nowym, nie opisanym dotychczas w literaturze, producentem dekstranazy grzybowej. Aktywność zewnątrzkomórkowej dekstranazy tego grzyba po 4 dniach zoptymalizowanej hodowli wgłębną na podłożu podstawowym z dodatkiem dekstranu jako jedyne źródła węgla, wahała się w granicach 12–13 DU/ml. Uzyskana aktywność jest wyższa od poziomu syntezy tego enzymu (1,5–7,0 DU/ml) otrzymanego dla takich gatunków grzybów, jak *P. luteum* (5), *P. purpurogenum* (20), *Paecilomyces lilacinus* (7) oraz drożdży *Lipomyces starkeyi* (13). Wyższą aktywność dekstranolityczną (17,5 DU/ml) wykryto natomiast u *Chaetomium gracile* oraz takich grzybów, jak *Aspergillus insuetus* — 20–30 DU/ml i *P. piscarium* — 17 DU/ml (9, 17, 18).

W celu zwiększenia aktywności dekstranolitycznej szczepu rodzicielskiego konidia *P. notatum* 1 poddano procesowi dwustopniowej mutagenizacji. W pierwszym etapie jako czynniki mutagenne zastosowano promienie UV lub łączne ich oddziaływanie z nitrozoguanidyną. W wyniku indukcji otrzymano ok. 1000 mutantów, których aktywność dekstranolityczną oceniono wykorzystując metodę wstępnego ich różnicowania opartą na dyfuzji enzymu do podłoża agarowego z dekstranem. Do dalszych badań wybrano 150 szczepów, których aktywność enzymatyczną określono poprzez mikrohodowle próbowkowe. W końcowej fazie selekcji 5 kultur najaktywniejszych poddano szczegółowej analizie ilościowej na aktywność dekstranazy po 4 dniach hodowli wgłębną na podłożu podstawowym z dekstranem. Jak wy-

Tab. 1. Wytwarzanie dekstranazy i zewnątrzkomórkowego białka przez wybrane mutanty *P. notatum* 1 po 4 dniach hodowli wglębnej na podłożu podstawowym z dodatkiem dekstranu

Dextranase and extracellular protein production by selected mutants of *P. notatum* 1 after 4 days of submerged culture on basal medium with dextran

Szczep <i>P. notatum</i> <i>P. notatum</i> strain	Czas działania mutagenów		Przeżywalność Survival rate	Aktywność dekstranazy		Białko Protein
	Mutagenic treatment min			Dextranase activity		
	UV	NTG	%	DU/ml	%	mg/ml
Rodzicielski Parent 1	0	0	100,0	12,04	100	0,47
Mutant Mutant A-94	4	0	27,5	24,20	201	0,55
B-93	2	20	4,6	20,11	167	0,59
B-65	2	20	4,6	21,91	182	0,60
B-76	2	20	4,6	18,06	150	0,53
B-81	2	20	4,6	22,88	190	0,60

nika z danych zawartych w tab. 1, wszystkie uzyskane mutanty posiadały wyższą aktywność dekstranazy niż kultura rodzicielska — od 50 (mutant B-76) do 101% (mutant A-94). Najlepszy mutant *P. notatum* 1-A-94 charakteryzował się aktywnością tego enzymu na poziomie 24,2 DU/ml, podczas gdy dla kultury wyjściowej tego grzyba wynosiła ona jedynie 12,04 DU/ml.

W kolejnych badaniach konidia najaktywniejszego mutantu *P. notatum* 1-A-94 poddano wtórnej mutagenizacji za pomocą łącznego działania promieniowania UV i nitrozoguanidyny. Spośród 750 kolonii wyrosłych z pojedynczych konidiów, po potraktowaniu ich mutagenami i wysianiu na podłoża agarowe, wyizolowano 85 szczepów, których kolonie wytworzyły strefy aktywności dekstranazy o największych średnicach. Zostały one poddane analizie ilościowej w zakresie wytwarzania zewnątrzkomórkowej dekstranazy w warunkach hodowli wglębnej przeprowadzonej w kolbach stożkowych zawierających podłoże podstawowe z dekstranem. W tab. 2 zestawiono wyniki w odniesieniu do 5 szczepów najaktywniejszych. Przyniesione w niej dane potwierdzają w pełni istnienie wysokich predyspozycji do wytwarzania dekstranazy u wszystkich badanych w tym kierunku mutantów. W szczególności dotyczy to szczepu *P. notatum* 1-114, którego aktywność wobec kultury wyjściowej *P. notatum* A-94 wzrosła maksymalnie o 23%, natomiast w stosunku do szczepu dzikiego (*P. notatum* 1) o ok. 147%. Warto jednak podkreślić, że uzyskane w drugim etapie mutagenizacji przyrosty aktywności dekstranoli-



Tab. 2. Wytwarzanie dekstranazy i zewnątrzkomórkowego białka przez wybrane mutanty II stopnia *P. notatum* 1 po 4 dniach hodowli wglębnej na podłożu podstawowym z dodatkiem dekstranu

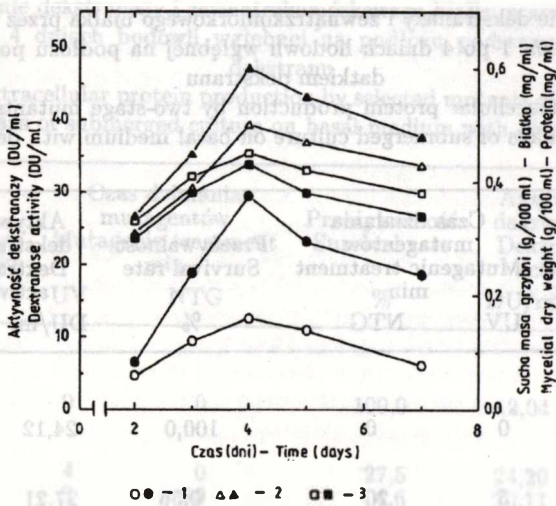
Dextranase and extracellular protein production by two-stage mutants of *P. notatum* 1 after 4 days of submerged culture on basal medium with dextran

Szczep <i>P. notatum</i> <i>P. notatum</i> strain	Czas działania mutagentów Mutagenic treatment min		Przeżywalność Survival rate %	Aktywność dekstranazy Dextranase activity		Białko Protein mg/ml
	UV	NTG		DU/ml	%	
	Rodzicielski Parent 1-A-94 Mutant Mutant 53 111 114 13 38	0 5 5 5 3 3	0 20 20 20 30 30	100,0 0,56 0,56 0,56 0,60 0,60	24,12 27,21 27,50 29,67 26,53 27,98	100,0 112,8 114,0 123,0 110,0 116,0

tycznej były kilkakrotnie (w przypadku najlepszego mutantu *P. notatum* 1-114 ponad 4-krotnie) niższe w porównaniu z pierwszym etapem, co jest zjawiskiem często spotykanym w procesie indukcji wielostopniowej.

Badano również dynamikę wytwarzania dekstranazy przez wyselekcjonowanego mutantu i jego kulturę rodzicielską w czasie 7-dniowej hodowli wglębnej na podłożu podstawowym z dodatkiem dekstranu (ryc. 1). Aktywność zewnątrzkomórkowego enzymu, zawartość białka w podłożu oraz sucha masa grzybni przyrastały stopniowo i osiągnęły swoje maksimum po 4 dniach hodowli. Okres ten przyjęto za optymalny dla produkcji dekstranazy przez badane szczepy grzybów. Warto zaznaczyć, że zwiększonej aktywności dekstranazy u wyselekcjonowanego mutantu towarzyszył również wyraźny przyrost w podłożu hodowlanym zawartości białka oraz niewielki spadek wydajności biomasy grzybowej w porównaniu z tymi, jakie osiągnęła kultura rodzicielska *P. notatum* 1.

Brak jest danych na temat intensyfikacji aktywności dekstranolitycznej grzybów na drodze mutagenizacji. Dlatego uzyskane przez nas wyniki (przyrost aktywności dekstranazy u najlepszego mutantu *P. notatum* 1-114 o 147%) można jedynie porównać z tymi, jakie są podawane w odniesieniu do innych enzymów. Na przykład Kuek i Kidby (16) osiągnęli wzrost aktywności glukoamylazy u mutantu *Aspergillus phoenicis* wynoszący 140%. Również Nevalainen i Palva (21) uzyskali ok. 2,5-krotny wzrost ak-



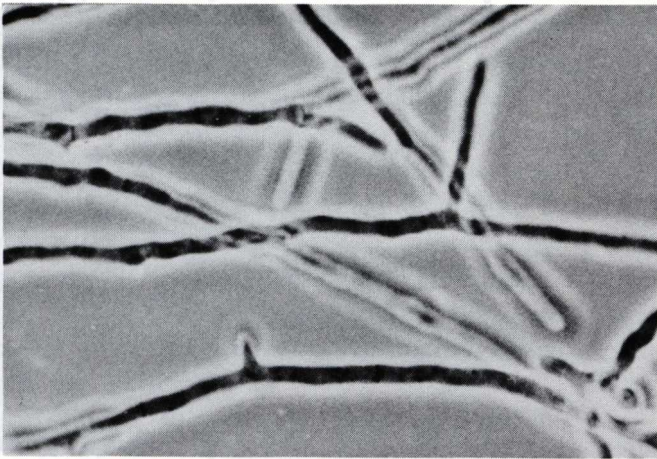
Ryc. 1. Dynamika wytwarzania dekstranazy (1), białka (2) i biomasy grzybowej (3) przez *P. notatum* (symbole puste) i jego mutantu *P. notatum* 1-114 (symbole wypełnione) w czasie hodowli wglębnej na podłożu podstawowym z dekstranem

Dynamics of dextranase (1), protein (2) and biomass (3) production by *P. notatum* 1 (hollow symbols) and its mutant *P. notatum* 1-114 (filled symbols) during submerged culture on basal medium with dextran

tywności tego enzymu u mutantu III stopnia *A. awamori* w porównaniu z poziomem jego syntezy u szczepu wyjściowego. Wysokie przyrosty aktywności enzymatycznej (ponad 125%) otrzymano również w przypadku biosyntezy enzymów pektynolitycznych przez mutanty *A. niger* (4). Podobny przyrost aktywności w odniesieniu do enzymów celulolitycznych osiągnął Szczodrak (27) w przypadku mutagenizacji grzyba *Trichoderma reesei*.

W procesie mutagenizacji wyselekcjonowano równocześnie 22 formy auksotroficzne grzyba *P. notatum* jako szczepy markerowe do przeprowadzenia fuzji komórkowych. Częstotliwość pojawiania się auksotrofów wynosiła  $0,7 \times 10^{-5}$  w stosunku do liczby prototroficznych konidiów w zawiesinie wyjściowej. Stosując preparat enzymów litycznych Novozym 234 uzyskano również z tego grzyba protoplasty. Ich wydajność na poszczególnych etapach preparatyki zestawiono w tab. 3. Po 4 godz. inkubacji końcowy preparat zawierał ponad 98% żywych protoplastów (test z błękitem trypanowym), które otrzymywano z wydajnością ok. 70%. Podczas inkubacji grzybni z enzymami litycznymi pobrane próbki obserwowano w mikroskopie kontrastowo-fazowym (ryc. 2). Podobnie jak u większości grzybów (22), protoplasty tworzyły się głównie wzdłuż strzępek jako uwypuklenia powstające w miejscach enzymatycznie zdegradowanej ściany komórkowej. Nadtrawiona ściana

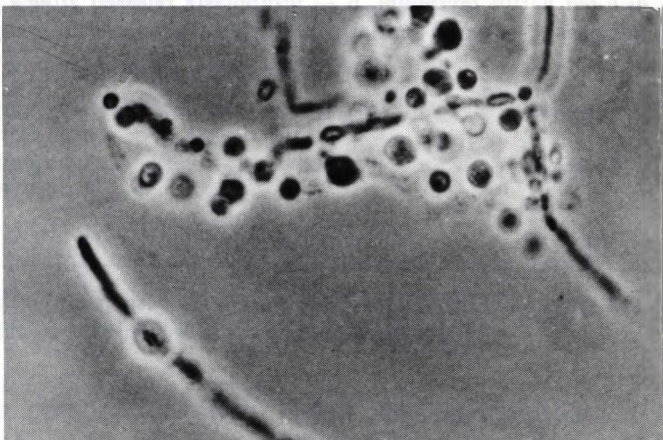
mórkowa była specjalna i pofalderowana. Rzadziej obserwowano również  
czasem się  
5% grzybn  
moleczne  
ty tona (m  
saje strukt  
ade i doie p  
k *P. chrysa*  
izotrofy i p  
owadzenia  
dywności de  
ygatunkowy



Yield of protoplasts from *P. notatum* mycelium during preparation

a

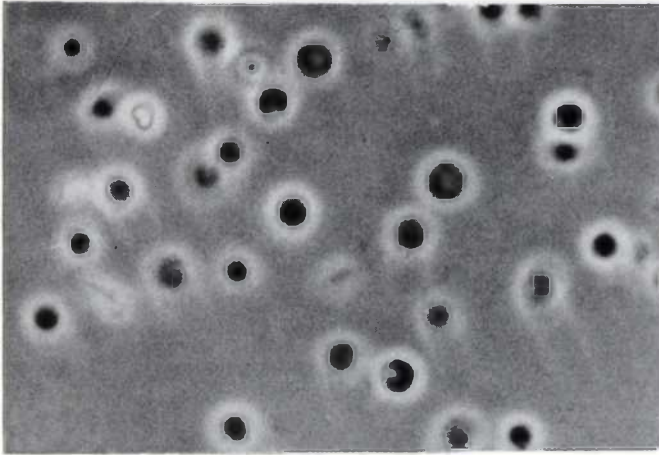
wómalogolp  
amoinolp  
po  
Yield of protoplasts from *P. notatum* mycelium during preparation



b

W wyniku  
124, który  
translityczn  
stała się  
Wydaje się, że uzyskany  
z nowo źródła enzymu do uzyskania aktywnego preparatu dekstranazy.  
Jeśli wyniki są zadowalające, to obracowanie przez nas metody selekcji  
stanów pozwalałby osiągnąć aktywność dekstranazy. Zależy to od  
stabilności, co pozwalałoby uzyskać w tym kierunku





c

Ryc. 2. Zdjęcia z mikroskopu kontrastowo-fazowego grzybni i izolowanych protoplastów *P. notatum* (pow. 1000 $\times$ ); a — wyjściowa grzybnia (20 godz.), b — protoplasty uwolnione z grzybni po 2 godz. inkubacji z enzymami litycznymi, c — małe i duże protoplasty po oddzieleniu od grzybni

Phase-contrast micrographs of mycelium and isolated protoplasts from *P. notatum* ( $\times 1000$ ); a — 20 h-old native mycelium, b — protoplasts released after 2 h incubation with lytic enzymes, c — small and large protoplasts separated from mycelium



komórkowa była spęczniała i pofałdowana. Rzadziej obserwowano również tworzenie się protoplastów na szczytach strzępek. Po 2 godz. inkubacji ok. 60% grzybni było transformowane do kulistych i wrażliwych na ciśnienie osmotyczne (co sprawdzono przez rozcieńczenie 1 M sorbitolu wodą) oraz siły tnące (mieszanie lub wytrząsanie) protoplastów. Obserwowano dwa rodzaje struktur: małe, o średnicy 1,7–3,7  $\mu\text{m}$  i duże (średnica 4,6–7,1  $\mu\text{m}$ ). Małe i duże protoplasty grzybowe były wcześniej opisane u takich gatunków, jak *P. chrysogenum* (1), *P. paucisporum* (26) i *Aspergillus nidulans* (23). Uzyskane auksotrofy i protoplasty *P. notatum* posłużą w dalszych badaniach do przeprowadzenia ich fuzji w celu uzyskania form hybrydowych o zwiększonej aktywności dekstranolitycznej zarówno w obrębie tego gatunku, jak i międzygatunkowych.

Tab. 3. Wydajność protoplastów z grzybni *P. notatum* na różnych etapach preparatyki\*  
Yield of protoplasts from *P. notatum* mycelium during preparation\*

Frakcja Fraction	Objętość Volume ml	Liczba protoplastów w 1 ml Number of protoplasts in 1 ml	Końcowa liczba protoplastów Total protoplasts	Wydaj- ność Yield %
Po 4 godz. inkubacji z Novozymem 234 After 4 h incubation with Novozym 234	20	$2,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^8$	100,0
Po filtracji (G-2) After filtration (G-2)	17	$2,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^8$	72,0
Po pierwszym wirowaniu After first centrifugation	12	$2,9 \times 10^7$	$3,5 \times 10^8$	70,0
Po drugim wirowaniu After second centrifugation	10	$3,4 \times 10^7$	$3,4 \times 10^8$	68,0

- \* Ilość wilgotnej masy grzybni wziętej do protoplastyzacji wynosiła 600 mg.
- \* The mycelial wet weight at the beginning was 600 mg.

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano mutantą *P. notatum* 1-114, który charakteryzował się ok. 2,5-krotnie wyższą aktywnością dekstranolityczną niż szczep wyjściowy i był stabilny w okresie 18 miesięcy trwania doświadczeń. Wydaje się, że uzyskany szczep może być użyty jako nowe źródło enzymu do uzyskania aktywnego preparatu dekstranazy. Należy również zaznaczyć, że opracowane przez nas metody wstępnej selekcji mutantów pozwalają ocenić ich aktywność dekstranolityczną z dość dużą wiarygodnością, co pozwala przebadać w tym kierunku dużą populację mikroorganizmów (lub ich mutantów) w stosunkowo krótkim czasie.

## PIŚMIENICTWO

1. Annè J., Eyssen H., De Somer P.: Formation and regeneration of *Penicillium chrysogenum* protoplasts. Arch. Microbiol. **98**, 159–166 (1974).
2. Barfoed S., Mollgaard A.: Dextranase solved dextran problems in DDS' beet sugar factory. Zuckerindustrie **112**, 391–395 (1987).
3. Day D. F., Kim D.: A novel progress for the production of dextrans of selected molecular sizes. Ann. N.Y. Acad. Sci. **672** (Enzyme Engineering XI), 573–576 (1992).
4. Fiedurek J., Ilczuk Z.: Mutagenizacja pleśni *Aspergillus niger* aktywnych pektynolitycznie w warunkach hodowli wglębnej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C **33**, 29–39 (1978).
5. Fukumoto J., Tsuji H., Tsuro D.: Studies on mold dextranases. I. *Penicillium luteum* dextranase: its production and some enzymatic properties. J. Biochem. **69**, 1113–1121 (1971).
6. Galas E., Kubik C., Sikora B.: Enzymatyczna degradacja dekstranów w sokach cukrowniczych. Kosmos **38**, 57–61 (1989).
7. Galvez-Mariscal A., Lopez-Munguia A.: Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**, 327–331 (1991).
8. Hattori A., Ishibashi K.: Screening of dextranase producing microorganisms. Agric. Biol. Chem. **45**, 2347–2349 (1981).
9. Hattori A., Ishibashi K., Minato S.: The purification of the dextranase of *Chaetomium gracile*. Agric. Biol. Chem. **45**, 2409–2416 (1981).
10. Hopwood D. A.: The genetic programming of industrial microorganisms. Scientific American **245**, 91–102 (1981).
11. Hoskins J. M., Meynell G. G., Sanders F. K.: A comparison of the methods for estimating viable counts of a suspension of tumor cells. Exp. Cell. Res. **11**, 297–304 (1956).
12. Kikuchi M.: Application of genetics for strain improvement in industrial microorganisms. Biotechnol. Bioeng. **22**, 195–208 (1980).
13. Koenig D., Day D.: The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. Eur. J. Biochem. **183**, 161–167 (1989).
14. Kolar H., Mischak H., Kammel W., Kubicek C. P.: Carboxymethylcellulase and  $\beta$ -glucosidase secretion by protoplasts of *Trichoderma reesei*. J. Gen. Microbiol. **131**, 1339–1347 (1985).
15. Kubik C., Galas E.: Dekstranazy pleśniowe — właściwości i zastosowanie. Zesz. Nauk. Pol. Łódz., Technol. Chem. Spoż. **35**, 229–249 (1980).
16. Kuek C., Kidby D. K.: Screening fungi for improved glucoamylase productivity using buffered dextran broth cultures. Biotechnol. Lett. **6**, 561–566 (1984).
17. Łobanok A. G., Zinczenko O. N., Szyszło W. I.: Biosintez diekstranazy *Penicillium piscarium* Westling BIM G-102. Mikol. Fitopatol. **15**, 125–131 (1981).
18. Łobanok A. G., Zinczenko O. N., Szyszło W. I.: Wlijanije usłowii kultiwirwanija i sostawa pitatielnoj sriedy na sintez diekstranazy gribom *Aspergillus insuetus* G-116. Prikl. Biochim. Mikrobiol. **18**, 664–670 (1982).
19. Miller G. L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. **31**, 426–428 (1959).

20. Minakowa A. L., Prieobrażenskaja M. E.: Wydzielanie i swojstwa diekstranazy *Penicillium purpurogenum* (F toll). Prikl. Biochim. Mikrobiol. **16**, 682–690 (1980).
21. Nevalainen K. M. H., Palva E. T.: Improvement of amyloglucosidase production of *Aspergillus awamori* by mutagenic treatments. J. Chem. Tech. Biotechnol. **29**, 390–395 (1979).
22. Peberdy J. F.: Isolation and Properties of Protoplasts from Filamentous Fungi. [w:] Microbial and Plant Protoplasts. Red. J. F. Peberdy, A. H. Rose, H. J. Rogers, E. C. Cocking, Academic Press, London 1976, 39–50.
23. Peberdy J. F., Gibson R. K.: Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. J. Gen. Microbiol. **69**, 325–330 (1971).
24. Queener S. W., Lively D. H.: Screening and Selection for Strain Improvement. [w:] Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Red. A. L. Demain, N. A. Solomon, American Society for Microbiology, Washington D.C. 1986, 155–169.
25. Schacterle G. R., Pollack R. L.: A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. Anal. Biochem. **51**, 654–655 (1973).
26. Szajer I., Szajer Cz., Jamroz J.: Release of protoplasts from *Penicillium pazilli* by *Penicillium purpurogenum* enzymes. Acta Microbiol. Polon. **37**, 159–166 (1988).
27. Szczodrak J.: The use of cellulases from a  $\beta$ -glucosidase-hyperproducing mutant of *Trichoderma reesei* in simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw. Biotechnol. Bioeng. **33**, 1112–1116 (1989).

#### SUMMARY

Conidia of the *Penicillium notatum* 1 strain were mutagenized, and selected mutants evaluated for production of extracellular dextranase in shaken flask cultures. The most active mutant *P. notatum* 1-114, constructed by a two-stage mutagenization, showed about 2.5-times higher activity of the enzyme than the wild-type fungus *P. notatum* 1. The dynamics of dextranase synthesis by parent and mutant strains was also demonstrated.

Spherical, osmotically fragile, small and large protoplasts were obtained from the mycelium of *P. notatum*, using Novozym 234, a commercially available enzyme from *Trichoderma harzianum*. Maximum numbers of protoplasts were released from 20 h mycelium, using 1M sorbitol as osmotic stabilizer, after 4 h incubation with lytic enzymes at 25°C and at pH 6.0.



