

PROTOPLASZTKÉPZÉS KÜLÖNBÖZŐ GOMBAFAJOKBÓL
TRICHODERMA TÖRZSEK ENZIMEIVEL

Doktori értekezés

Készítette és a József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Karára benyújtja

Perki Mária

Készült
a szegedi József Attila Tudományegyetem Mikrobiológia
Tanszékén



TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	1
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
VIZSGÁLATI ANYAGOK, MÓDSZEREK	8
1. Mikroorganizmusok	8
2. Tápközegek	10
3. Gombák előtenyésztése enzimindukcióhoz	13
4. Gombák előtenyésztési protoplasztképzéshez	14
5. Enzimindukció módja	14
6. Protoplasztképzés menete	16
7. Protoplasztszámlálás	17
VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK	20
1. Az enzimindukció paramétereinek vizsgálata	20
1.1. A legalkalmasabb tápközegösszetétel megállapítása	20
1.2. A tápközeg optimális pH-jának meghatározása	25
1.3. Optimális tápoldatmennyiség meghatározása	28
1.4. Az indukcióhoz használt optimális Geotrichum sejt-tömegmennyiség megállapítása	31
1.5. Az enzintermeltetés időtartama	35
2. A protoplasztképződés optimális feltételeinek vizsgálata	36
2.1. A protoplasztszámlálás időtartama	36
2.2. 2-merkaptostanol hatásának vizsgálata protoplasztképződésre	37
2.3. A protoplasztképzésre felhasznált tenyészet kora	41
2.4. A protoplasztképződés feltételeinek tanulmányozása Rhodotorula rubra esetében	43

3. Különböző Trichoderma fajok által termelt enzimpreparátum vizsgálata	54
4. Az enzimpreparátum protoplasztképző aktivitásának vizsgálata az enzinkoncentráció függvényében	113
5. Száraz enzimpreparátum előállítása és vizsgálata	116
6. Enzimpreparátum aktivitásának vizsgálata fagyasztva történő tárolás során	118
VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	119
1. Trichoderma fajokkal kapcsolatos vizsgálatok értékelése	119
2. Enzinkoncentrációtól függő protoplasztképzés értékelése	131
3. Száraz enzimpreparátummal kapcsolatos vizsgálati eredmények értékelése	132
4. Enzimpreparátum fagyasztva történő tárolásával kapcsolatos kísérletek értékelése	133
ÖSSZEFOGLALÁS	134
IRODALOMJEGYZÉK	138

BEVEZETÉS

A gombák alapszénhidrát-anyagcsere folyamat tekintetében heterotrof táplálkozású, reducens élőlények. Ezen tulajdonságuk kiemelkedő szinten áll a többi élőlények viszonylatában. Nagyszámú enzimet termelnek, amelyet a környezetbe ki is választhatnak /Fukui és trs., 1960/. A legjobb cellulóz- és ligninbontó szervezetek, szinte nincs olyan makromolekuláris rendszere a természeti környezetnek, melyet ne tudnának felbontani /Wolf, és trs., 1959, Mandels, és Reese, 1957, 1960, Mandels és trs., 1961, Reese és trs. 1961, 1962/.

Más oldalról vizsgálva a kérdést: a gombák igen alkalmazak és kiterjedten használatosak morfológiai, biokémiai, genetikai folyamatok tanulmányozására.

A fenti folyamatok elemzése lényegesen leegyszerűsödik oly módon, ha a sejtekből protoplasztokat, fal nélküli sejteket sikerül létrehozni. A protoplasztok nyerése új utat nyit egyrészt a sejtfal fiziológiai és genetikai szerepének tanulmányozásához /Novaes, Lendieu és trs., 1970/, másrészt a sejtszerkezettel, növekedéssel, tápanyagfelvétellel, bioszintézissel, paraszexuális folyamatokkal, valamint a gátolóanyagok hatásmechanizmusával kapcsolatos problémák magyarázatára /Bartnicki-Garcia, 1968, Darling és trs., 1969, Kuo és Lampen, 1971/.

Többféle módszert ismerünk protoplasztok előállítására, és nem kevés azon gombafajok száma sem, amelyekből már valamilyen éten sikerült protoplasztot nyerni. Ennek ellenére a kutatás nem állhat meg a "meglévőkre" támaszkodva.

Ezen megfontolások vezettek bennünket olyan gombafajok keresésére, amelyek esetleg széles körben alkalmazhatók gomba-protoplasztok előállítására.

Kísérleti organizmusokként *Trichoderma* törzseket választottunk.

A szakirodalomból ismert az egyes *Trichoderma* fajok enzintermelő-, sőt sejtfalbontó enzinkomplexumot termelő képessége /Mandels és Reese, 1957, de Vries és Wessels, 1972, 1973a, 1973b, Mary Mandels és trs., 1971, Hisizawa, 1971a, 1971b, Gupta, Das, Gupta, 1972, Halliwell és Griffin, 1973, Gupta és trs., 1973/.

Célul tűztük ki a rendelkezésünkre álló 30 *Trichoderma* törzs sejtfalbontó-enzimet szintetizáló képességének vizsgálatát.

A vizsgálati szempontokat az alábbiakban jelöltük meg:

1. enzimszintézis vizsgálata különböző tápközegeken,
2. enzimszintézis vizsgálata indukciós körülmények között az indukció idejének függvényében,
3. enzimpreparátumok protoplasztképző tulajdonságának vizsgálata *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula rubra* és *Saccharomyces cerevisiae* sejtekre vonatkozóan,

4. 2-merkaptotanol hatása a protoplasztképződésre,
5. enzimpreparátum aktivitásának változása a koncentráció függvényében és fagyasztva tárolás során,
6. szárazenzim-preparátum előállítása és aktivitásának vizsgálata.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A protoplaszt kifejezést 1953 óta használják. Weilbull /1953/ szerint sejtfalától megfosztott baktérium sejt.

Ma már ezt a kifejezést alkalmazzák a legkülönbözőbb organizmusok falmentes állapotára; akár prokariotikus, akár eukariotikus szervezetekről van szó.

Svihla és Schlenk /1967/ élesztőknél a szferoplaszt kifejezést vezeti be, hivatkozva arra, hogy a sejtfalat nem szükséges teljes egészében leválasztani ahhoz, hogy a protoplasztra jellemző bélyegek, pl. ozmotikus körülmények iránti érzékenység, megjelenjenek.

Brenner és trs. /1958/ megállapítják, hogy a baktériumoknál leírt protoplasztismérvek a gombákra is igazak.

A protoplasztállomány valamennyi jellemzőjét még mindig nem sikerült teljesen tisztázni, s így nehéz is a protoplaszt fogalmának pontos meghatározása.

Villanueva /1963/ , valamint Villanueva és Garcia Acha /1971/ protoplasztnak nevezik a sejtfal nélküli merevségüket elvesztett ozmotikusan érzékeny "gömbtesteket".

A protoplasztok mérete 5 és 50 μ között változhat, általában 10 μ körüli. Az ép sejtekkel szemben legjellemzőbb ismertetőjele a protoplasztnak, hogy az izoozmotikus körülmények csökkenésekor fokozatosan duzzad, majd szétesik.

Egyéb fizikai hatásokkal szemben is érzékenyebb, mint a teljes sejt: így pl. centrifugálás /Rodriguez Aguirre és trs. 1964/, ultrahang /Rodriguez Aguirre és trs. 1964/ UV sugárzás /Svihla és trs. 1961, Svihla, 1971/.

Vizsgálatuk így csak ozmotikusan stabilizált közegben lehetséges. Számos kutató tanulmányozta a gombaprotoplasztok ozmotikus stabilitásának /Svihla és trs. 1961, Ottolenghi és Lillehoj, 1967, Duell és trs. 1964, Lampen és trs., 1962/ körülményeit illetve a protoplasztok stabilizálására alkalmazható közegeket /Villanueva és Garcia Acha, 1971/.

Különböző szerzők más és más stabilizáló közegot használnak gombaprotoplasztok vizsgálatára; KCl-t /Ferenczy és trs., 1974, Svihla, 1961, Bartnicki-Garcia és Lippman, 1966, Svoboda és trs, 1969/, mannitot /Bartnicki-Garcia és Lippman, 1966, Rodriguez Aguirre és trs, 1964, Garcia Acha és trs, 1964/, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ /Gascon és Villanueva, 1965, Villanueva és trs, 1969/, glükózt /Ferenczy és trs, 1974, Bartnicki-Garcia, Lippman, 1966, Strunk, 1969/ és így tovább. Nem hagyható figyelmen kívül az a tény sem, hogy maga a stabilizátor és annak koncentrációja is befolyásolhatja a protoplasztképződést /Gascon és trs., 1965, Bartnicki, 1966/.

Közösleges fénymikroszkópban, illetve fáziskontrasz mikroszkóppal jól figyelemmel kísérhető a protoplasztok kiszabadulás, a protoplasztképződés mértéke.

Elektronmikroszkópos vizsgálatukhoz megfelelő fixálási módszerekkel készült preparátumokat használnak /Necas és Havelkova, 1967, Sentandreu és Northcote, 1969, Uruburu és trs., 1968/, mely lehetővé teszi a protoplasztok finomabb struktúrájának felderítését is /Villanueva, 1971/.

A protoplasztokat Boulton /1965/ alkalmazta először membrán-preparátum vizsgálatára. Ezt követően Mendoza és Villanueva /1967/, Mendoza /1968/ adja részletes elemzését a protoplasztokból nyert membrán szerkezetnek. Matile /1960/ a membránnal kapcsolatos enzim-lokalizációs vizsgálatokhoz használt fel nélküli sejteket. A citoplazma alakos elemait tanulmányozták hasonló körülmények között Svihla /1961/, Abrams /1969/, Eddy /1959/, Duell és trs. /1964/, Elorza és trs. /1969/ a protoplasztok permeabilitási tulajdonságait vizsgálták.

Emerson és Emerson /1958/, Bachmann és Bonner /1959/ figyelték elsőként a gombaprotoplasztok növekedését.

Antibiotikumok hatásmechanizmusát tanulmányozták Lampen és trs. /1962/, Kinsky /1963/, Ferenczy /1970/.

Számos irodalmi adat utal a protoplasztok regenerációjára, a sejtfal-szintézissel kapcsolatos megfigyelésekre /Villanueva, Garcia Acha /1971/, Necas /1971/, Havelkova /1972/, Sietsman és trs. /1973/, Kevei és trs. /1972/.

Végezetül egyre több esetben sikerült protoplasztok közötti fúziót megoldani /Brock, 1961, Suminane és Duckmo, 1963, Holter és Ottolenghi, 1960, Strunk, 1966, Lopez-Belmonte és trs., 1966, Ferenczy és trs., 1974/.

Villanueva és Garcia-Acha /1971/ rendszerezését követve a gombaprotoplasztképzési módszerek három csoportba sorolhatók - mechanikai v. autolitikus módszerek,

- enzimekkel történő sejtfalbontás,
- sejtfal szintézisének gátlása.

Az enzimekkel történő sejtfalbontásnak ismét három változatát írja le:

- csiga emésztőenzim,
- mikrobiális enzimek,
- más enzimpreparátumok.

A nevezett módszerek közül a mikrobiális enzimekkel való sejtfalbontást választottuk, minthogy az eddigi vizsgálatokban is kitűnt, hogy számos mikroorganizmus képes olyan enzimpreparátum szintetizálására, amely a komplex felépítésű sejtfal "emésztésére" alkalmas. Sikeresen oldották meg pl. *Streptomyces* fajokból /Villanueva, 1971/ illetve *T. viride*ből /de Vries, 1974/ nyert enzimpreparátummal különböző gombákból való protoplaszt előállítását.

VIZSGÁLATI ANYAGOK, MÓDSZEREK

1. Mikroorganizmusok

Geotrichum candidum

JATE Mikrobiológia Tanszékének törzsgyűjteményéből

Rhodotorula rubra CBS 830

JATE Mikrobiológia Tanszékének törzsgyűjteményéből

Saccharomyces cerevisiae R XII

JATE Mikrobiológia Tanszékének törzsgyűjteményéből

Trichoderma viride CBS 354. 33.

JATE Mikrobiológia Tanszékének törzsgyűjteményéből

Trichoderma koeningi 51-35/13. 3.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koeningi 51-35/13. 4.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koeningi 51-35/13. 5.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koeningi 51-35/13. 6.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koeningi 51-35/13. 7.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koeningi 51-35/13. 11.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma pseudo koeningi 51-32/1. 9.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma pseudo koeningi 51-32/1. 8.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koningi komplex *kingii* típus 23-33/6. 56.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koningi komplex *kingii* típus 23-32/1. 59.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma hamatum 51-35/13. 10.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma hamatum 23-35/13. 34.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma hamatum 23-32/1. 37.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma hamatum 23-38. 46.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma hamatum 23-33/6. 50.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma hamatum 55-38. 53.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma harzianum 23-38. 17.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma harzianum 23-33/6. 23.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma harzianum 23-38. 65.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koningi komplex 23-35/13. 19.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koningi komplex 23-35/13. 20.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koningi komplex 23-35/13. 21.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből

Trichoderma koningii komplex 23-33/6. 24.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből
Trichoderma koningii komplex 23-33/6. 29.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből
Trichoderma koningii komplex 23-32/1. 36.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből
Trichoderma koningii komplex 23-32/1. 39.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből
Trichoderma koningii komplex 23-38. 48.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből
Trichoderma koningii komplex 23-38. 49.

Soproni Erdészeti és Faipari Egyetem törzsgyűjteményéből
Trichoderma glaucum 0593

JATE Mikrobiológia Tanszékének törzsgyűjteményéből
Trichoderma sp. 0592

JATE Mikrobiológia Tanszékének törzsgyűjteményéből

A *Trichoderma*-k rendszertani helye vitatható.

A törzseket élesztőkivonat táptalajon, ferdeagaron tartottam fenn, s alkalmanként ebből oltottam ki friss tenyészet készítéséhez.

2. Tápközégek

2.1. Élesztőkivonatós tápoldat:

5 g élesztőkivonat /Yeast extract "Oxoid/",

10 g glükóz /a.lt./,

1000 ml deszt. viz.

2.2. Élesztő kivonatos táptalaj:

1000 ml élesztő kivonatos tápoldat,

20 g Bacto-agar /Difco/.

2.3. Vitaminos szintetikus minimál /M/ tápoldat:

5 g $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ /a.lt./,

1 g KH_2PO_4 /a.lt./,

0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /a.lt./,

10 g glükóz /a.lt./,

1 ml Wickerham-féle vitaminoldat,

1000 ml csapviz.

2.4. Geotrichum sejtfalet tartalmazó szintetikus vitaminos minimál tápoldat /M+G/

1000 ml szintetikus vitaminos minimál, sterilizálás előtt 2 % /nedvesség/ Geotrichum candidum tenyészet, rázogatva míg csomómentesen nem oszlik szét.

2.5. Geotrichum sejtfalet tartalmazó glükózmentes vitaminos minimál tápoldat /G/:

5 g $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ /a.lt./,

1 g KH_2PO_4 /a.lt./,

0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /a.lt./,

1 ml Wickerham-féle vitaminoldat,

1000 ml csapviz,

2 % Geotrichum sejtfalet az előbbieket szerint hozzáadva.

2.6. Rhodotorula sejteket tartalmazó glükózmentes vitaminos minimál tápoldat /Rh/:

A 2.5. pontban leírt tápoldathoz hasonlóan készült, de a Geotrichum helyett 1 % /nedvesség/ Rhodotorula rubra sejteket viszünk a tápoldatba egyenletesen szétválasztva, sterilizálás előtt.

2.7. Rhodotorula sejteket tartalmazó hiányos minimál tápoldat /Rh-P/:

5 g NH_4SO_4 s.l.t.,

0,5 g MgSO_4 s.l.t.,

1 ml Wickerham-féle vitaminoldat,

1000 ml csapviz

1 % Rhodotorula az 2.6. pont szerint.

2.8. Saccharomyces sejteket tartalmazó glükózmentes vitaminos minimál tápoldat /S/:

A 2.5. pontban leírtak szerint, de Geotrichum helyett 1 % Saccharomyces sejtet tartalmaz.

2.9. Wickerham-féle vitaminoldat:

0,2 mg folsav,

0,2 mg biotin,

40 mg Ca-pantotenát,

200 mg inozitol,

40 mg niacin,

20 mg p-aminobenzoésav,

40 mg piridoxin HCl ,
40 mg aneurin HCl,
20 mg riboflavin,
100 ml desztillált víz.

3. Gombák előtenyésztése enzimindukcióhoz

Élesztőkivonatot /2.1./ tartalmazó tápoldatot 30-50 ml-ként Rouxpalackokba adagoltam, sterilizálás után leoltottam *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula rubra* vagy *Sacch. cerevisiae* 48 órás tenyészetéből vett kicsinyi mennyiséggel.

24 órán át 30°C hőmérsékleten inkubáltam, majd összegyűjtöttem a sejteket.

Geotrichum esetében sűrű nyilon anyagon átszűrtem a folyadékos tenyészetet, majd csapvízzel 3-4-szer átmostam a szűrőn fennmaradt sejtösszeget. Rövid ideig tartó szikkasztás után kimértem a kívánt mennyiséget, s az indukciós tápoldathoz adagoltam.

A *Rhodotorula* és *Saccharomyces* sejteket centrifugálással választottam le a tápoldatból. Az így kiülepedett sejteket háromszor átmostam csapvízzel, közben újra centrifugáltam.

Az utolsó centrifugálás után a felülúszót leöntöttem, a sejttömegből 1 %-nyi mennyiséget adagoltam az alaptápládatához.

4. Gombák előtenyésztése protoplasztikához

A protoplasztikához a gombákat Roux-palackban szaporítottam 30-30 ml tápoldaton. A tápoldatot a protoplasztálás kísérlet tervezett időpontját megelőző 12-15 órával leoltottam a vizsgálandó gomba 48 órás ferdeageros tenyészetéből vett kacsnyi mennyiségű sejttömeggel. Az inkubálást 30°C-on végeztem. 12-15 óra elteltével az aktív szaporodási fázisban lévő, de még fiatal sejteket elválasztottam a tápoldattól. Az elválasztást az előző /3./ pontban leírtak szerint végeztem.

A steril vízzel háromszor átmosott és lecentrifugált sejtekből használtam a protoplasztikához.

5. Maximindukció módja

A sejtfalbontó enzimpreparátumok termeltetését különböző összetételű tápközegeken végeztem, amelyek induktorként más és más szénforrást tartalmaztak.

A tápoldatokat előre elkészítettem nagy mennyiségben, s alkalmanként ebből vettem ki steril körülmények között. Így igyekeztem kiküszöbölni a nem egységes tápközegösszetételből adódó szórást.

Az enzimindukció Kelle-csészékben 15-15 ml tápoldatban történt.

Az oltáshoz használandó *Trichoderma* törzseket az enzimindukció beindítása előtt 72 órával kioltottam friss ferdeagarra. Így jutottam megfelelően spórás inokulumhoz.

Az inkubációt különböző ideig végeztem, általában 2, 4 és 6 napon át. Ezt úgy oldottam meg, hogy leoltottam egy tápoldatsorozatot a 72 órás *Trichoderma* tenyészetből vett nagy kecsnyi spórával, majd kettő és négy nap múlva újabb tápoldatsorozatokot oltottam ugyanazon törzs spóráival. A 6. napra rendelkezésemre állt a 2, 4 és 6 napos fermentáló, melyek hatását így egyidejűleg tudtam vizsgálni. A fermentáció folyamán naponta több ízben felrázogattam, miközben figyeltem a tápoldatban bekövetkező, szemmel kísérhető /fel-tisztulás mértéke/ változást.

A tenyésztés hőfoka 25°C volt, amely a *Trichoderma*-k számára kedvező hőmérséklet.

Az inkubációs idő elteltével a fermentlevet sejtmentesen elválasztottam. E célból egyszerűen redőszűrőpapíron leszűrtem a vizsgálati anyagot. Amennyiben nem tisztult le teljesen - az általában a *Rhodotorula* és *Saccharomyces* sejteket tartalmazó tápközegeknél fordult elő - centrifugáltam.

A tiszta fermentlevet használtam protoplasztképzés vizsgálatára.

6. Protoplasztképzés menete

A protoplasztok ozmotikusan érzékeny sejtek, így a képzésnél elsődlegesen arról kell gondoskodni, hogy a közeg ozmotikusan stabilizált legyen.

A protoplasztképzéshez stabilizátorként 0,6 M KCl-t alkalmaztam, s pH 6 mellett végeztem a protoplasztálást. A fermentléből 1-1 ml-t félkémcsővekbe vittem. Mindegyikhez mértem 44,7 mg KCl-t, valamint a 6 pH beállítására /Sørensen szerint/ 7,98 mg KH_2PO_4 -t /a.lt./ és 1,42 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -t /a.lt./.

Az így elkészített fermentléhez adagoltam a protoplasztálásra kijelölt 4. pont alapján előkészített gombasejteket.

Geotrichum candidum-ból 1 ml fermentléhez 100 mg-t mértem.

A *Rhodotorula* és *Saccharomyces*-ből annyit vittem be, hogy a kezdeti csiraszám kb. 10^5 - 10^6 db/ml legyen.

Az így elkészített szuszpenziót szobahőmérsékleten tartottam, 10 percenként felráztam.

Ezzel párhuzamosan egy másik sorozathoz 1 % merkaptoetanolt adagoltam a protoplasztképzés serkentésére.

Protoplasztszámlálást a kísérlet beindításától számított 2., 4., 6., és 24. órában végeztem.

7. Protoplasztszámlálás

A protoplasztok számát Bürker-kamrában határoztam meg.

Geotrichum candidum esetében a fermentléből felcsepentettem a Bürker-kamrára, ezt mikroszkópban 300 x-os nagyítás mellett vizsgáltam. A gömb alakú protoplasztok jól elkülönülnek a fonalas sejtektől. A protoplasztokat az $\frac{1}{250}$ mm-es idomokban számoltam, mintánként 25-25 egységben. Végül átlagot számolva minden esetben 1 μ l-re vonatkoztattam a képződött protoplasztok számát. Ezt az adatot tüntettem fel táblázatosan, s ábrázoltam grafikusan. A grafikonon minden esetben bejelöltem a 100 %-nak megfelelő protoplasztszámokat.

A *Rhodotorula rubra* és *Saccharomyces* sejtekből képződött protoplasztok számát közvetett úton határoztam meg, mivel itt az ép sejtek és sejtfal nélküli protoplasztok között

nem minden esetben érzékelhető meggyőző különbség a mikroszkópban.

A fermentléből 0,1 ml-t 1 ml 0,6 M KCl oldattal és 0,1 ml-t 1 ml desztillált vízzel higitottam. A stabilizált oldatban a protoplasztok épen maradnak, míg a desztillált vízben az ozmotikusan érzékeny "gömbtestek" szétesnek. Mindkét közegben meghatároztam a sejtek számát. A kettő közötti különbség adta a protoplasztszámot, melyet itt is 1 μ l-re vonatkoztattam, és az előbbihez hasonlóan rögzítette.

VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK

Ismert tény, hogy a mikroorganizmusok élettevékenységét döntően befolyásolják a környezeti tényezők. Fokozottan vonatkozik ez a specifikus, meghatározott biokémiai folyamatokat irányító enzimekre, enzimrendszerekre /Villanova, 1971/.

Vizsgálataim során elsődleges célként tűztem ki tisztázni azokat a kísérleti körülményeket, amelyek legpozitívabban hatnak az általunk kiválasztott *Trichoderma* fajok enzimszintézisére, mégpedig olyan enzimkomplexum képződésére, amely széles körben alkalmazható gombaprotoplasztok előállítására.

Előkísérleteimet két fő irányban végeztem. Először az enzimindukció optimális paramétereit:

- legalkalmasabb tápközegösszetételt,
- optimális pH-t,
- tápoldat mennyiségét,
- indukcióhoz használt sejttömeget,
- az indukció idejét

határoztam meg.

Ezek ismeretében a protoplasztképződés legkedvezőbb körülményeit vizsgáltam. Így megnéztem, hogy mennyiben befolyásolja az enzimpreparátum kora, a protoplasztképzésre felhasznált tenyészet kora és előtenyésztési körülményei /levegőztetés/, valamint a β -merkaptopatanol a protoplasztképződés mértékét.

Választ kerestem arra, hogy milyen időközönként, s mennyi ideig érdemes figyelemmel kísérni a protoplasztképződést.

1. Az enzimindukció paramétereinek vizsgálata

Az enzimindukció optimális feltételeinek megállapítására a szakirodalomból protoplasztképző tulajdonságáról már ismert /de Vries, 1974/ *Trichoderma viride* törzset használtam tesztorganizmusként, protoplasztképzésre *Geotrichum candidum* törzset választottam. A *Geotrichum candidum* gombafonalakat csigaamészfehérjével 100 %-ban protoplasztává lehet alakítani /Kevci és trs, 1972/.

1.1. A legalkalmasabb tápközegösszetétel megállapítása

Hat különböző összetételű tápközeg:

- vitaminos minimál /M/,
- vitaminos minimál + 2 % *Geotrichum* sejt /M+G/,
- glükózmentes minimál + 5 % *Geotrichum* sej /G/,
- glükózmentes minimál + 1 % *Rhodotorula* sejt /Rh/,
- glükóz és P-mentes minimál + 1 % *Rhodotorula* /P-Rh/,
- glükózmentes minimál + 1 % *Saccharomyces cerevisiae*

R XII. /S/

hatását vizsgáltam meg abból a szempontból, hogy mennyiben befolyásolják a gombaprotoplaszt-képzésére alkalmas enzimek szintézisét.

Az enzintermeltetést a VIZSGÁLATI ANYAGOK, MÓDSZEREK c. fejezetben leírtak alapján végeztem. *Trichoderma viride* erősen spórás tenyészetéből oltottam le a tápközégeket nyolc, illetve hat egymást követő napon. Napenként figyeltem a tápközeg feltisztulásának mértékét, s összehasonlítottam a leoltás nélküli kontrollal. Az eredményeket az 1. táblázat mutatja.

	M+G	G	Rh	Sacch.
1. nap	+++++	+++++	+++++	+++++
2. nap	+++++	++++	+++++	+++++
3. nap	++++	+++	++++	+++
4. nap	+++	+++	+1,2.10 ² /	++/3,4.10 ³
5. nap	+	++		
6. nap		++		
controll	+++++	+++++	5,04.10 ⁷	8,04.10 ⁷

+++++ alapszavaroosság

1. táblázat: Különböző tápközégek feltisztulása az enzintermelítés során

Az inkubáció előrehaladásával a tápoldatok fokozatosan tisztulnak fel. A 2 % *Geotrichum*-ot tartalmazó minimál tápközeg a 6. napra teljesen feltisztult.

A Rhodotorulás tápoldatban, mely ml-ként eredetileg $5,04 \cdot 10^7$ sejtet tartalmazott - a 4. napon a Rh. sejtszáma $1,2 \cdot 10^2$ -ra csökkent, az 5. napra a tápoldatban már csak Trichoderma fonalak látszóttak.

Saccharomyces-tartalmú tápközegben a kezdeti $8,04 \cdot 10^7$ ml-kénti sejtszám a 4. napra $3,4 \cdot 10^3$ -ra csökkent, az ötödik napra a Saccharomyces sejtek eltűntek a tápközegből.

Ezekből már némi következtetést lehet levonni az enzintermelődésre vonatkozóan. Az utolsó oltást követő napon a fermentlevet sejtmentesen elválasztottam a tenyésztettől, majd 1 ml-ébe 100 mg 12-15 órás Geotrichum sejttömeget vittem. A protoplasztokat $1/2^h$, 1^h , 3^h és 24 óra elteltével számoltam a leirtak szerint.

A vizsgálatok eredményeit a 2. táblázat és az 1. grafikon szemlélteti.

Az eredményekből kitűnik, hogy Geotrichum candidum protoplasztálására a legaktívabb enzimpreparátumot abban az esetben nyertem, amikor glükózmentes, Geotrichum-tartalmú minimálisan végzetten az enzintermelítést. A legkevesebb protoplasztot a glükóztartalmú és élesztőt tartalmazó tápközeg esetében kaptam.

Induktorként Rhodotorula sejteket tartalmazó tápközegben is képződött enzim, amely sejtfalbontó tevékenységet mutatott, azonban ennek hatása is jóval elmaradt a Geotrichumot tartalmazó glükózmentes minimálisan termelt enzimpreparátumétól.

Proto- plasz- tuk duk- ció ma ide- je ml	Protoplasztálás ideje																							
	1/2 ^h						1 ^h						3 ^h						24 ^h					
	Indukcióhoz használt tápközeg																							
	M	M+G	G	Rh	P-Rh	S	M	M+G	G	Rh	P-Rh	S	M	M+G	G	Rh	P-Rh	S	M	M+G	G	Rh	P-Rh	S
8. nap	o	o	o	-	-	-	2o	1o	15o	-	-	-	2o	o	36o	-	-	-	13o	14o	46o	-	-	-
7. nap	o	o	o	-	-	-	3o	7o	27o	-	-	-	3o	13o	13oo	-	-	-	14o	19o	177o	-	-	-
6. nap	o	o	o	o	o	o	1o	7o	4oo	15o	25	3o	1o	14o	134o	225	75	3o	4o	66o	171o	15o	275	3o
5. nap	o	o	o	o	o	o	1o	6o	48o	125	o	o	1o	7o	132o	2oo	5o	o	8o	1oo	16oo	3oo	225	o
4. nap	o	o	o	o	o	o	1o	4o	25o	1oo	o	o	1o	3o	82o	15o	25	o	4o	14o	97o	25o	15o	o
3. nap	o	o	o	o	o	o	o	2o	11o	25	o	o	o	2o	25o	3o	o	o	1o	4o	36o	76	25	o
2. nap	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	2o	25	o	o	o	o	7o	5o	o	o
1. nap	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

M = vitaminos minimál

P-Rh = glükóz és foszfor mentes minimál + 1 % Rhodotorula

M+G = vitaminos minimál + 5 % Geotrichum

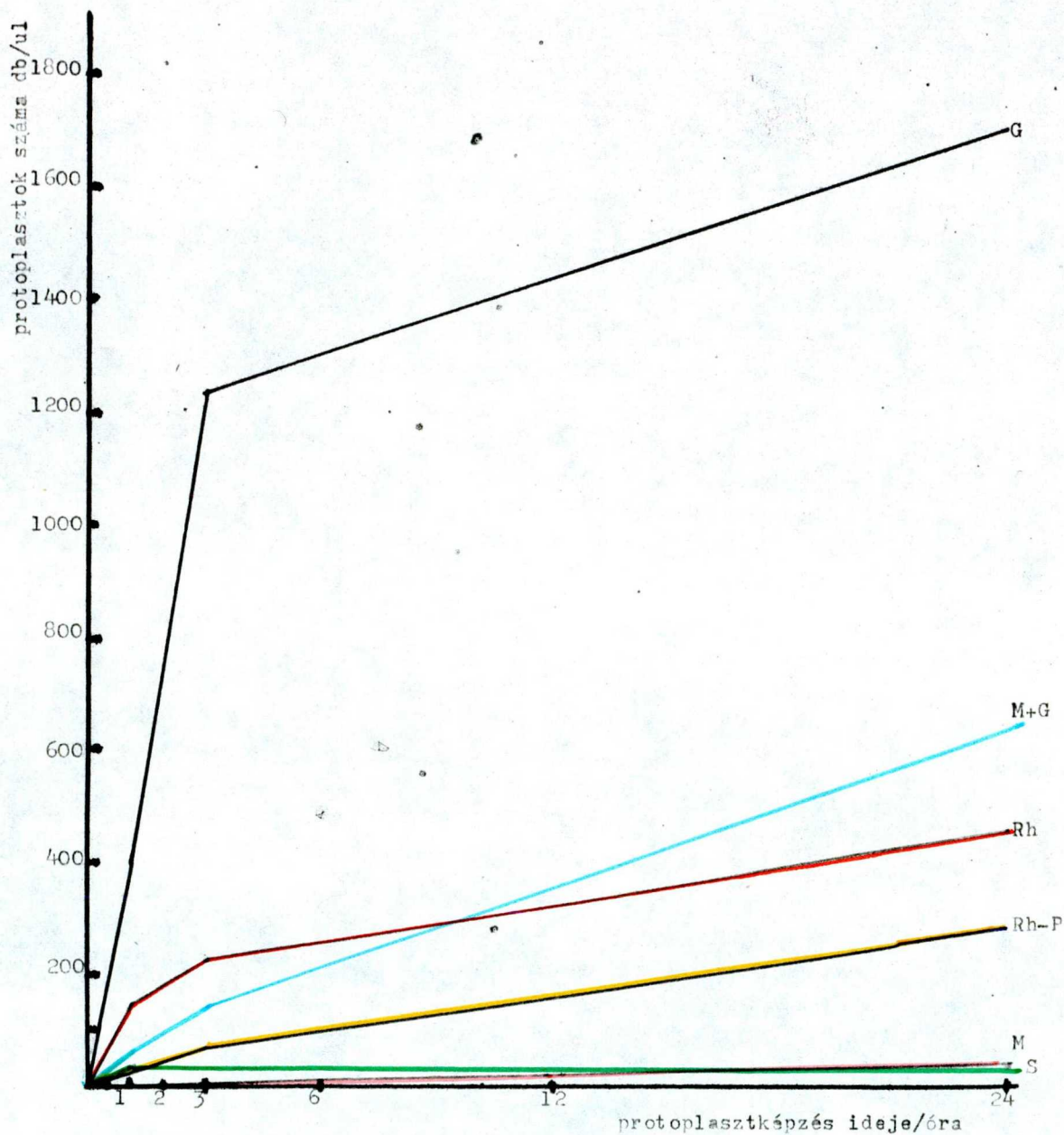
G = glükózmentes minimál + 2 % Geotrichum

Rh = glükózmentes minimál + 1 % Rhodotorula

S = glükózmentes minimál + 1 % Saccharomyces

2. táblázat: Trichoderma viride enzimtermelésének alakulása hat különböző tápközegen

1. grafikon: Különböző tápközegeken indukált *T. viride* enzim-preparátum protoplasztképző képessége az indukció 6. napján



G= Geotrichum tartalmu szén mente minimál
 Rh=Rhodotorula " " " "
 S= Saccharomyces " " " "
 M= minimál tápoldat
 M+G= Geotrichum tartalmu minimál tápoldat
 Rh-P= Rhodotorula tartalmu szén- és foszformentes minimál

1.2. A tápközeg optimális pH-jának meghatározása

Az előző vizsgálatssorozattól legalkalmasabbnak tűnő *Geotrichum* sejtet tartalmazó glükózmentes minimál tápközegen végeztem a következő megfigyeléseket. Három eltérő pH-tartományban, pH 6, pH 7,5 és pH 8,5-n termeltettem az enzimet. A vizsgálatok metodikailag teljesen megegyeztek az előző sorozattal.

A protoplasztaszámlálást $1/2^h$, 1^h , 2^h , 3^h és 4 óra elteltével végeztem.

A vizsgálati eredményeket a 3. táblázatban és a 2. sz. grafikonon tüntettem fel.

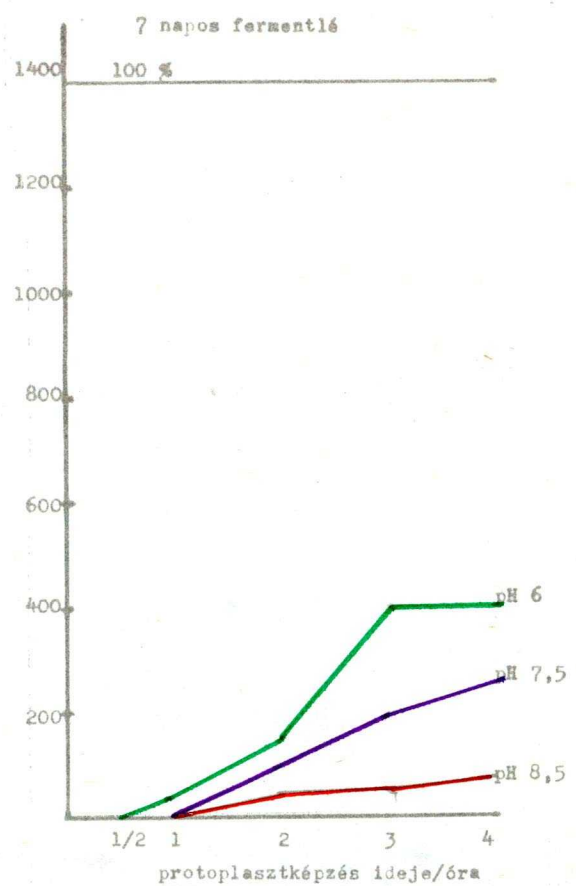
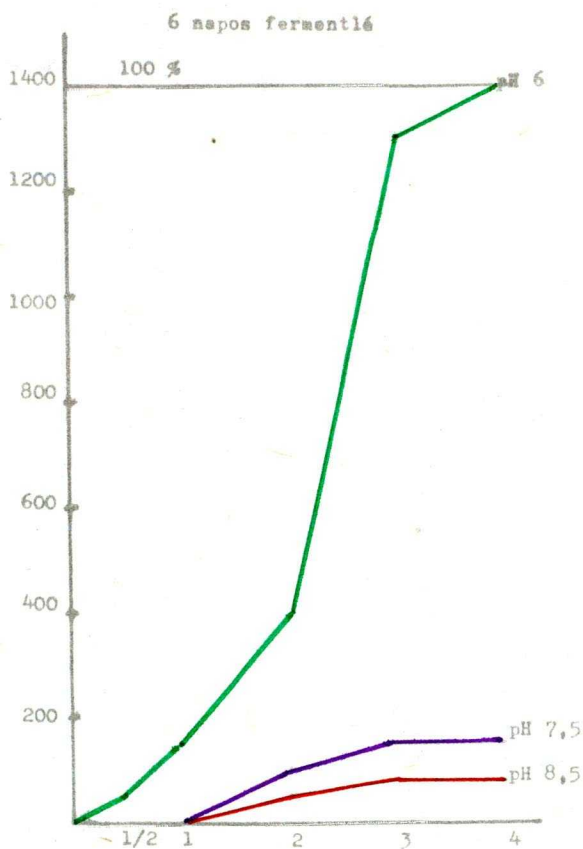
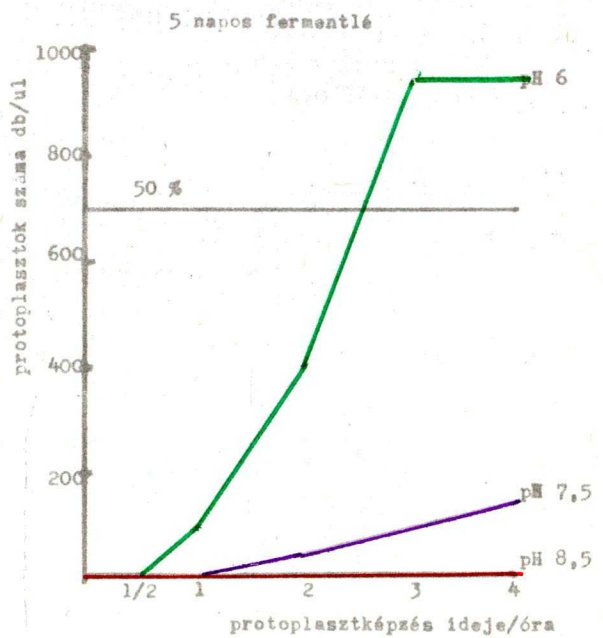
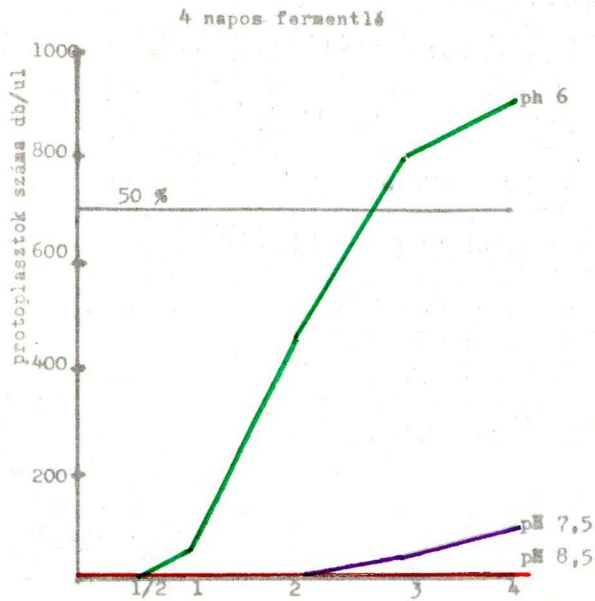
A vizsgálati eredmények azt mutatják, hogy a *Trichoderma viridé*vel termeltetett enzim a legnagyobb aktivitást abban az esetben mutatta, amikor az indukciós tápközeg pH-ja 6-os volt. pH 7,5 esetében az enzim aktivitása erősen lecsökkent. pH 8,5-nél a négy- és ötnapos fermentlével egyáltalán nem sikerült *Geotrichum* fonalakból protoplasztot nyerni. A hat- és hétnapos enzimpreparátummal is mindössze néhány protoplasztot láttam, s ennek száma a protoplasztálás idejének növekedésével sem változott.

A kísérleti eredményekre támaszkodva a további vizsgálatokhoz az enzintermeltetéshez 6-os pH-jú tápközegot használtam.

Indukció ideje	Protoplasztálás ideje														
	1/2 ^h			1 ^h			2 ^h			3 ^h			4 ^h		
	pH 6	pH 7,5	pH 8	pH 6	pH 7,5	pH 8	pH 6	pH 7,5	pH 8	pH 6	pH 7,5	pH 8	pH 6	pH 7,5	pH 8
7.nap	o	o	o	5o	o	o	15o	1oo	5o	1oo	2oo	5o	4oo	25o	75
6.nap	5o	o	o	15o	o	o	4oo	1oo	5o	13oo	15o	75	14oo	15o	75
5.nap	o	o	o	1oo	o	o	4oo	5o	o	95o	1oo	o	95o	15o	o
4.nap	o	o	o	5o	o	o	45o	o	o	8oo	5o	o	9oo	1oo	o
3. nap	o	o	o	o	o	o	o	o	o	15o	5o	o	25o	5o	o

3. táblázat: Enzimaktivitás változása a tápközeg pH-jának és az indukció idejének függvényében

2. grafikon: Enzimaktivitás változása a tápközeg pH-jának és az indukció idejének függvényében



1.3. Optimális tápoldatmennyiség meghatározása

Vizsgálatom célja annak megállapítása volt, hogy a Colle-palackokba milyen mennyiségű tápoldat mellett célszerű a tenyésztést végezni, hogy a szaporodó *Trichoderma* sejtek elegendő oxigénhez jussanak, de ugyanakkor a tápoldat egyenletes eloszlást mutasson a lefektetett palackokban.

Az eredményeket a 4. táblázatban és 3. sz. grafikonon ábrázoltam.

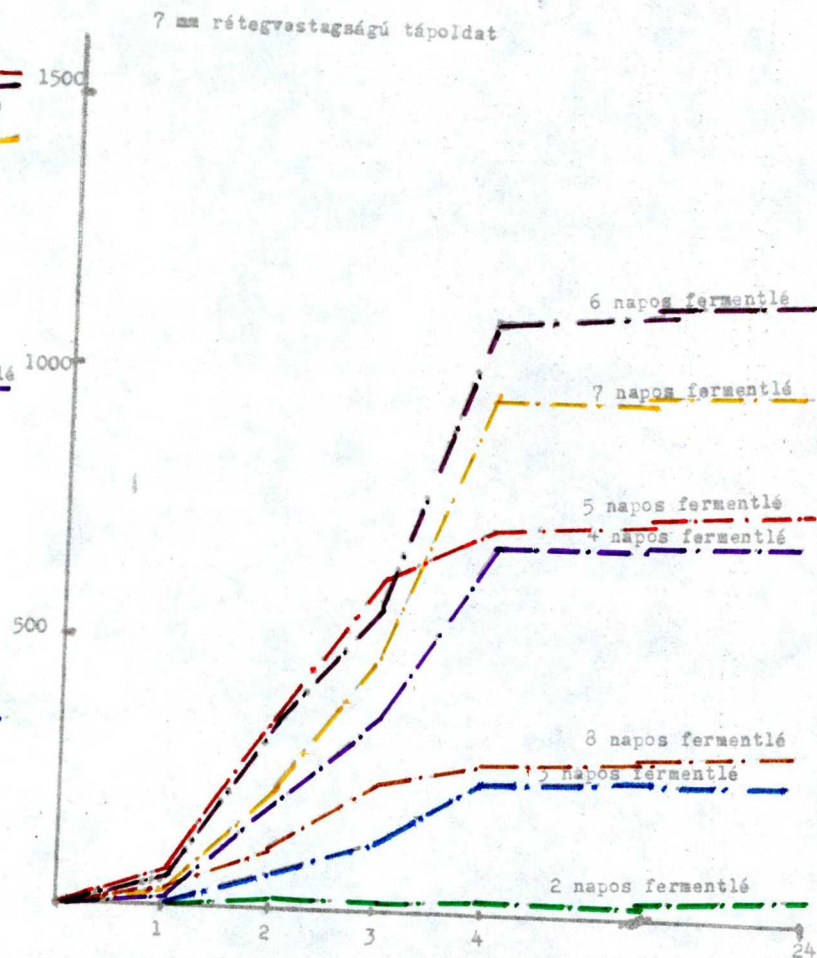
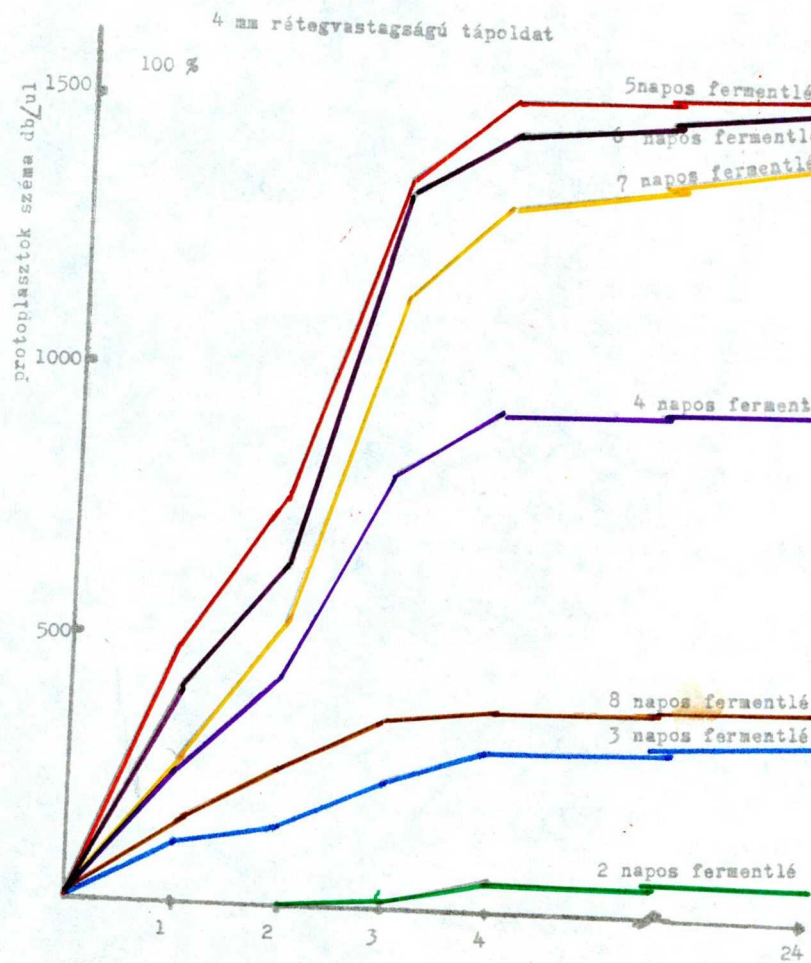
Szembetűnő különbség mutatkozott a tápközeg mennyiségétől függően a nyert enzimpreparátum sejtfalbontó aktivitásában. Kisebb mennyiségű /15 ml = 4 mm/, de a tenyészfelületet egyenletesen befedő tápoldat kedvezően befolyásolja a sejtfalbontó-enzim képződését.

Az eredményeket figyelembe véve a továbbiakban 15-15 ml tápközegot használtam az enzimindukcióhoz.

Protoplasztok száma Indukció ideje mm/db	Protoplasztaszámlálás ideje									
	1 ^h		2 ^h		3 ^h		4 ^h		24 ^h	
	Indukcióhoz használt tápoldat rétegvastagsága									
	4 mm	7 mm	4 mm	7 mm	4 mm	7 mm	4 mm	7 mm	4 mm	7 mm
8. nap	150	30	260	120	360	250	380	280	460	350
7. nap	270	30	540	230	1140	490	1320	960	1170	1030
6. nap	400	50	640	340	1340	570	1460	1100	1710	1350
5. nap	480	70	760	360	1360	620	1520	720	1600	860
4. nap	250	10	430	190	820	350	970	680	970	750
3. nap	110	0	150	70	250	130	310	250	350	270
2. nap	0	0	20	0	20	20	70	30	90	50
1. nap	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

4. táblázat: *Trichoderma viride*-enzimek aktivitásának alakulása 4 mm és 7 mm-es rétegvastagságú tápoldatban való tenyésztés esetében

3. grafikon: *Trichoderma viride* enzimek aktivitásának alakulása különböző rétegvastagságú tápoldatban való indukció esetén



1.4. Az indukcióhoz használt optimális Geotrichum sejttömegmennyiség megállapítása

Az 1.1. pont vizsgálati eredményei szerint Geotrichum protoplasztok képzésére a legaktívabb enzimpreparátumot abban az esetben nyertem, ha az enzintermeltetést olyan glükózmentes minimál tápközegben végeztem, amely szénforrásként Geotrichum sejteket tartalmazott.

Ezen vizsgálat sorozatban célul tűztem ki annak megállapítását, hogy milyen mennyiségű Geotrichum sejttömeggel érdemes dolgozni.

Négy különböző koncentrációjú tápközeget készítettem - 1, 2, 3 és 5 % Geotrichum sejtet tartalmazót - s ezeket oltottam Trichoderma viride tenyészetével.

Figyelemmel kísértem a változásokat az indukció során, valamint vizsgáltam a kinyert fermentlé protoplasztképző tulajdonságát.

Az enzintermeltetés folyamán a tápközegben bekövetkező változást, a feltisztulás mértékét az 5. táblázat tartalmazza.

Ugyanezen fermentleveknek a protoplasztképző hajlamát, a 6. táblázatban és 4. grafikonon mutatom be /A grafikon a 4. óra utáni protoplasztszámlálás eredményeit tartalmazza./.

Oltás után eltelt idő	Feltisztulás mértéke	Tápközet Geotrichum tartalma			
		1 %	2 %	3 %	5 %
1. nap		+++++	+++++	+++++	+++++
2. nap		+	+++	++++	++++
3. nap		+	++	++	+++
4. nap			+	+	+++
5. nap					++
6. nap					++
7. nap					++
8. nap					++

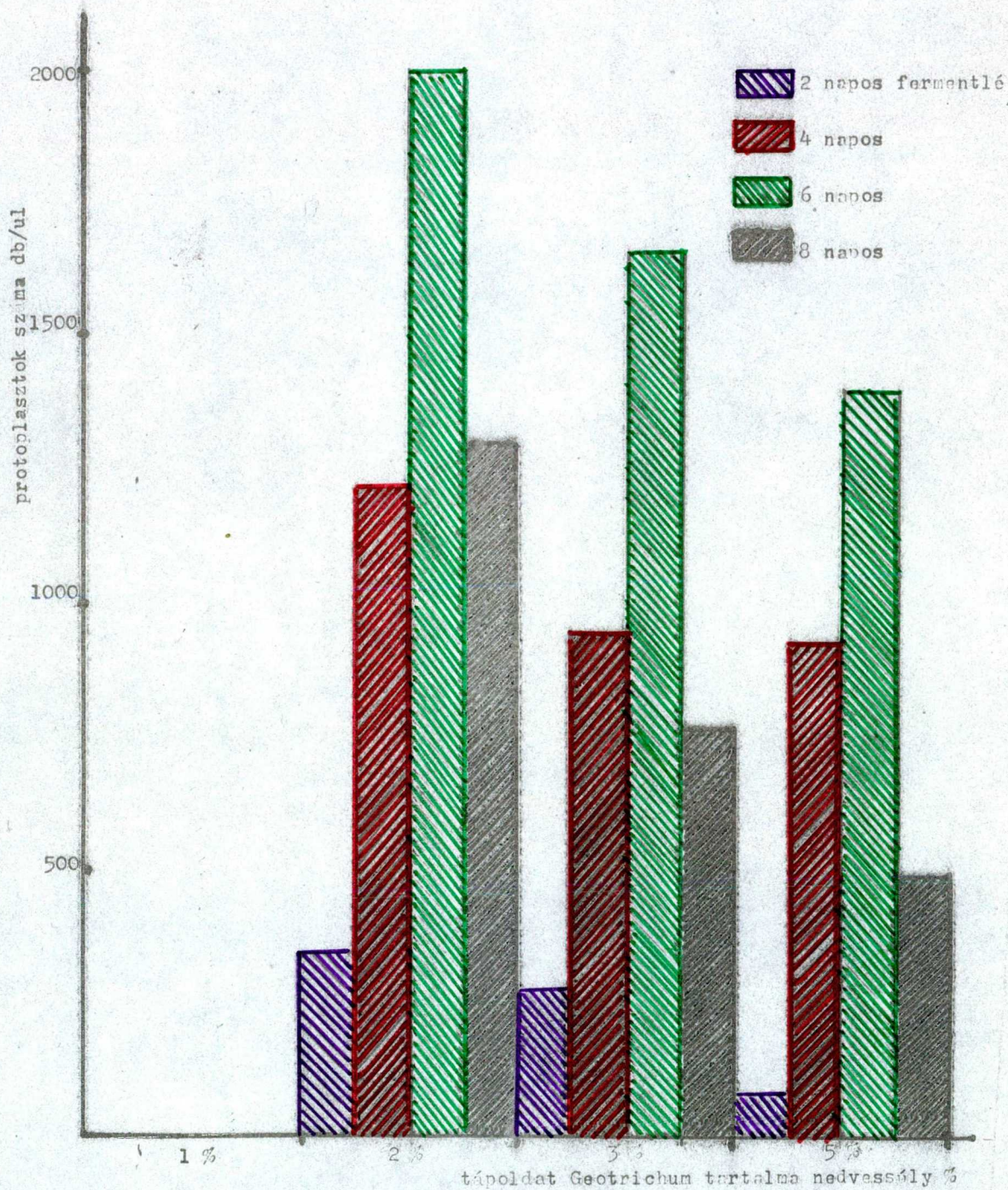
+++++ = alapzavarosság

5. táblázat: Különböző mennyiségű Geotrichum sejtet tartalmazó tápközetek feltisztulásának mértéke *Trichoderma viride*-vel való oltás után

Proto-	plesztok	For- szama	monis	kora	Tapolcst Geotrichum tartalma									
					1 h	2 h	3 h	4 h	1 h	2 h	3 h	4 h	1 h	2 h
1. nap	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2. nap	o	o	o	o	120	210	290	340	o	150	270	o	20	70
3. nap	o	o	o	o	310	450	530	625	130	160	380	400	110	250
4. nap	o	o	o	o	350	540	820	1210	300	490	580	940	250	820
5. nap	o	o	o	o	510	960	1230	1600	200	500	970	1520	480	1160
6. nap	o	o	o	o	680	1060	1540	2000	500	850	1280	1660	400	240
7. nap	o	o	o	o	370	830	1290	1820	400	630	780	900	270	780
8. nap	o	o	o	o	210	540	720	1300	150	270	540	760	150	360

6. táblázat: Kútnövény mennyiségű Geotrichum saját tartalmazó tápközegben nyert Trichoderma viride enzimekkel protoplasztokból aktiválása

4. grafikon: *T.viride* enzimpreparátum protoplasztokhoz
aktivitása különböző *Geotrichum* mennyiséget
tartalmazó tápközegen indukálva



A táblázatokban jól látható, hogy az 1 % Geotrichumot tartalmazó tápközegben a 2-3. napon már alig lehetett Geotrichum fonalat látni, az így nyert fermentlé protoplasztképzés tekintetében inaktívnak bizonyult.

Az 5 %-os tápoldat a 8. napra sem tisztult fel teljesen. Protoplasztképző aktivitása alul maradt a 2-3 %-os tápközegben nyert enzimnek.

A Geotrichumot 2 és 3 %-ban tartalmazó tápközegben a fonalak egyenletes eloszlást mutattak. Az enzimpreparátum protoplasztképző aktivitása közel egyenlő volt.

További vizsgálatokhoz így a 2 % Geotrichum mennyiség felhasználása tűnt célszerűbbnek.

1.5. Enzimtermeltetés időtartama

Az eddig elvégzett kísérletsorozatokból is kitűnik, hogy az enzim aktivitását jelentősen befolyásolja az enzimpreparátum kora. Sorozatvizsgálatok megkezdése előtt feltétlenül el kellett dönteni, hogy milyen korú enzimpreparátumokat érdemes előállítani és vizsgálni. Ezen megfontolásból kiindulva szükségesnek tartottam az eddigi eredményeket olyan szempontból is kiértékelni, amelynek alapján választ kapunk az előbb feltett kérdésre.

Amennyiben megfigyeljük a 4. és 6. táblázatokban, valamint a 3. és 4. grafikonon ábrázolt adatokat, láthatjuk, hogy függetlenül az egyéb kísérleti körülményektől az egy napos fermentlével protoplasztot nem sikerült nyerni.

A második naptól kezdődően az enzimaktivitás - a protoplasztok számának tükrében - fokozatosan emelkedett az 5-6. napig. A hétnapos enzim aktivitása már csökkent. A nyolcnapos indukció után elválasztott fermentlével 40-60 %-kal kevesebb protoplasztot kaptam, mint pl. a 6 napos enzimpreparátummal.

A fenti megfigyelésekből kiindulva az enzimtermeltestét hat napig érdemes folytatni.

2. A protoplasztképződés optimális feltételeinek vizsgálata

Miután megállapítottuk azokat a körülményeket, amelyek mellett *Trichoderma viride* segítségével protoplasztképzésre alkalmas megfelelő hatásfokú enzimpreparátumot nyerhetünk, további feladatunk volt a protoplasztképzéssel kapcsolatos kérdések tisztázása:

- protoplasztszámlálás időtartama,
- 2-merkaptotanol hatása,
- tenyészet kora,
- levegőztetés hatása a *Rhodotorula* előtenyésztése során.

2.1. A protoplasztszámlálás időtartama

A vizsgálatok során arra szerettem volna választ kapni, hogy milyen összefüggés van protoplasztok száma és a protoplasztálás időtartama között.

Kettő-, négy- és hatnapos fermentáléshoz edtem a 100-
100 mg Geotrichum sejtet. 1/2., 1., 2., 3., 4., 6. és 24.
óra elteltével végeztem protoplasztaszámlálást. A tapaszt-
alataimat a 7. táblázatban és 5. grafikonon tüntettem fel.

Protoplaszt- Fer- tok szá- mlálé ma	Protoplasztaszámlálás időpontja/óra					
	1/2	1	2	3	4	6
kora						
2. nap	0	120	210	290	340	360
4. nap	20	250	360	520	850	970
6. nap	30	400	680	1240	1420	1560

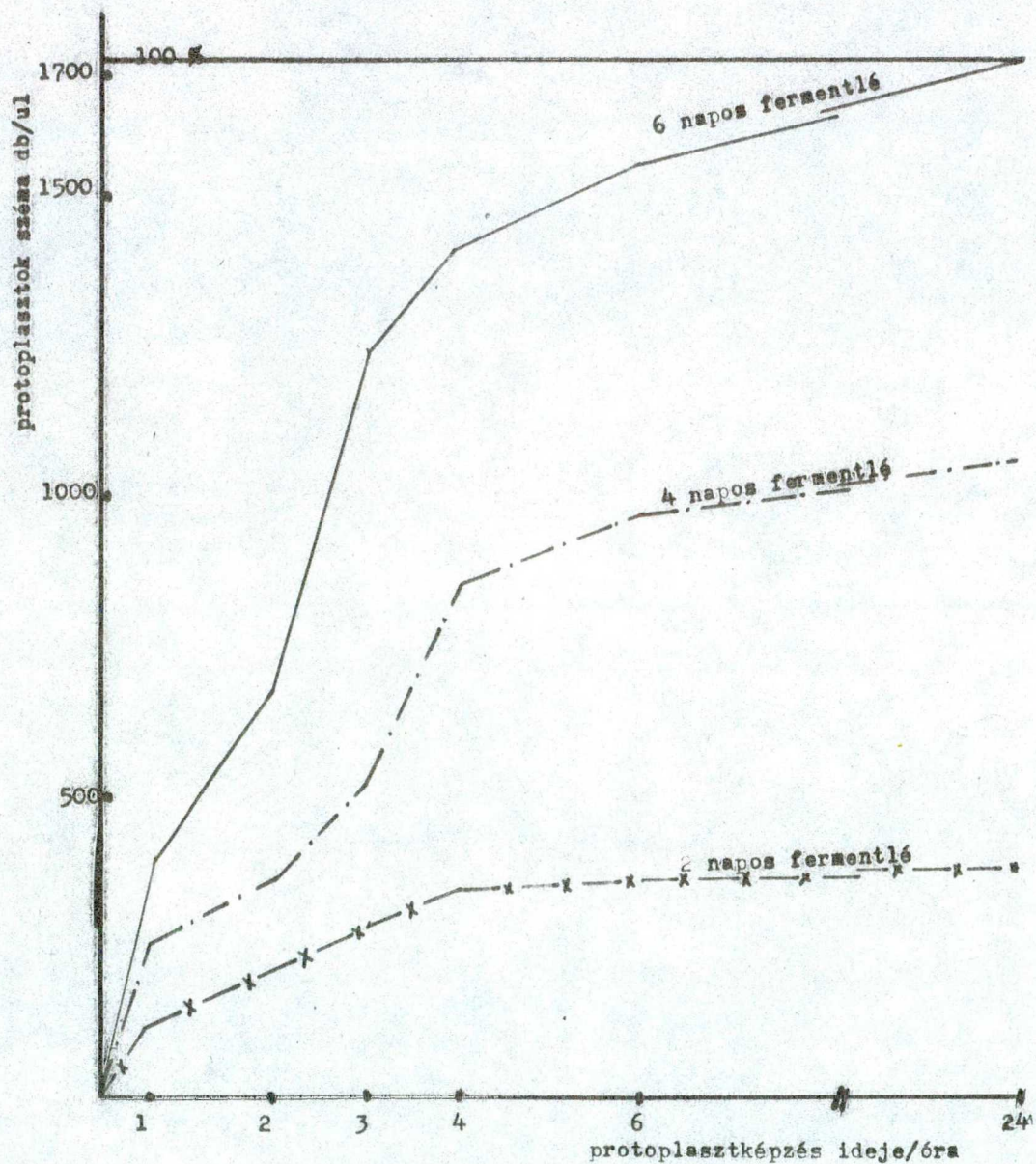
7. táblázat: Protoplasztok számának változása a protoplaszt-
képzés idejének függvényében

A vizsgálatok alapján a protoplasztaszámlálás célszerű ideje-
ként a 2., 4., 6., és 24 órát határoztuk meg.

2.2. 2-merkaptotetanol hatásának vizsgálata a protoplaszt-
képzésre

Irodalmi adatok alapján több szerző szerint /Davis és
Rivin, 1964, Nickerson és Falcon, 1956, Anderson, 1967,
Svihla és Schlen, 1967/ a 2-merkaptotetanol előnyösen befo-
lyásolja a protoplasztképződést.

5. grafikon: Protoplasztképződés mértéke az enzimpreparátum korának függvényében



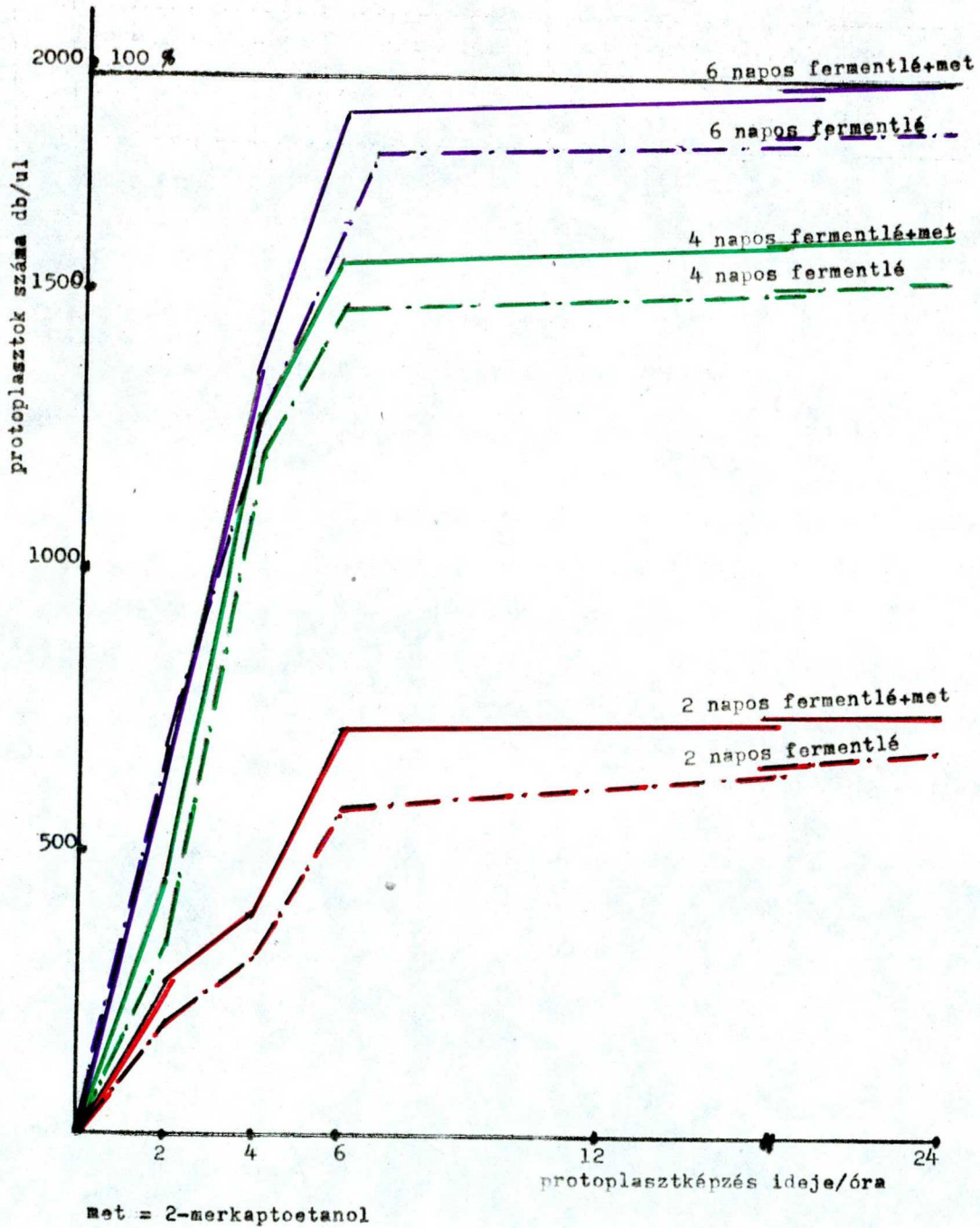
Az előzőekben leírtak szerint állítottam elő a fermentlevet, amellyel két párhuzamos sorozatot állítottam be protoplasztképzésre. Az egyik sorozatban csak a 100 mg Geotrichumot mértem, míg a másik sorozathoz a Geotrichumon kívül 1^o/oo-nyi mennyiségi 2-merkaptotanol-t adagoltam. A vizsgálati eredményeket a 8. táblázat és a 6. grafikon mutatja.

Protoplasztok száma Fermentlé kora	Protoplasztszámlálás időpontja/óra							
	2		4		6		24	
	NET	-	NET	-	NET	-	NET	-
2. nap	27o	20o	39oo	31o	72o	575	75o	69o
4. nap	45o	35o	127o	121o	155o	147o	161o	153o
6. nap	63o	68o	135o	125o	182o	175o	188o	179o

8. táblázat: Protoplasztképződés 1^o/oo 2-merkaptotanol jelenlétében és anélkül

Trichoderma viridevel előállított enzimpreparátum protoplasztképző tulajdonságát a merkaptotanol jelentősen nem befolyásolta. Annyi azonban elmondható, hogy jelenlétében általában nagyobbak és stabilabbak voltak. Célszerű a vizsgálatokat továbbra is elvégezni 2-merkaptotannal és anélkül is.

6. grafikon: Protoplasztképződés alakulása *T. viride* enzimpreparátummal 2-merkaptoetanol jelenlétében és nélküle



2.3. A protoplasztképzésre felhasznált tenyészet kora

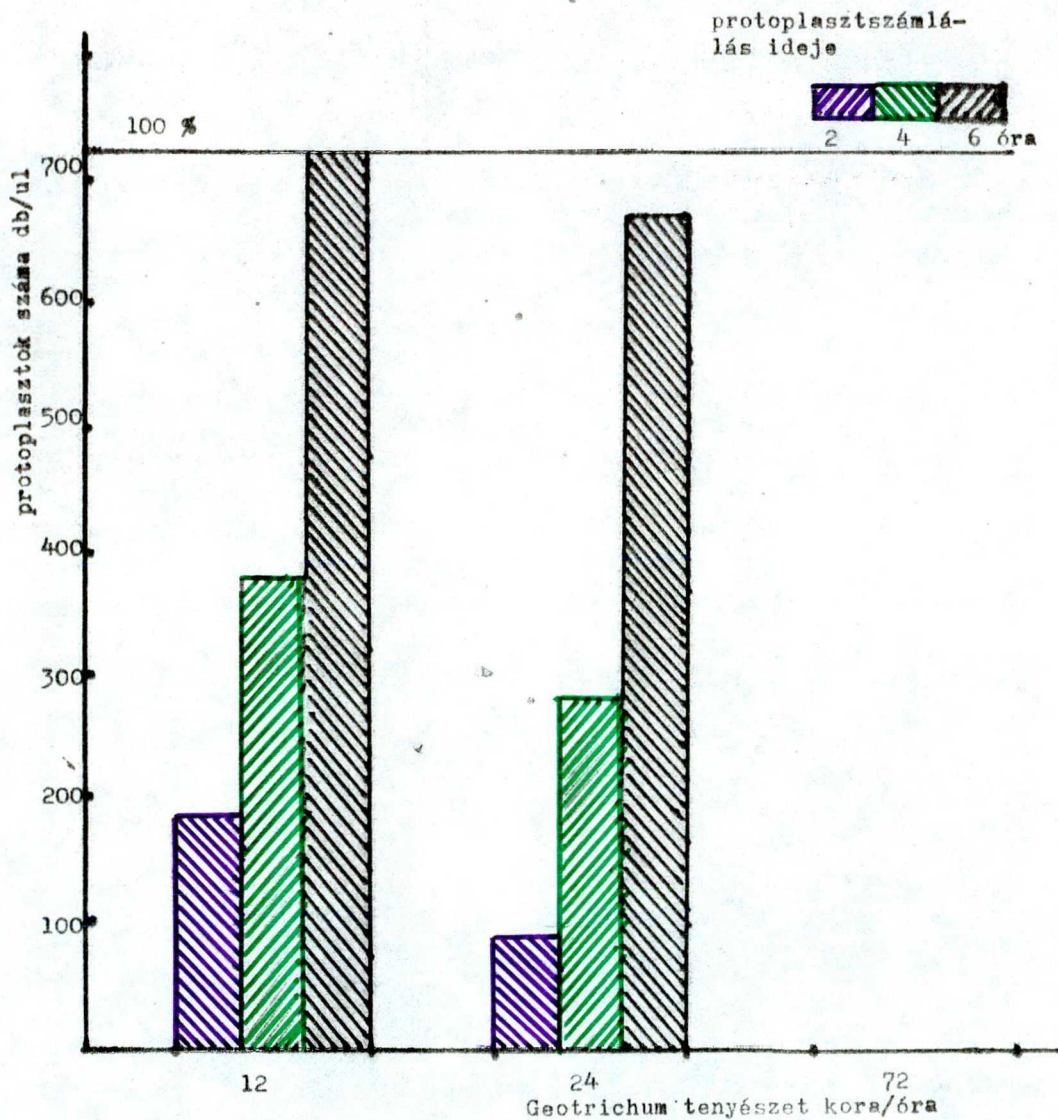
Vizsgálataim célja annak megállapítása, hogy mennyire befolyásolja a micélium tömeg kora annak protoplasztálódó képességét. Három kísérletsorozatban különböző korú tenyészetet vittem a fermentlébe 12, 24 és 72 órás *Geotrichum* sejteket. Tapasztalataimat a 9. táblázatban összegeztem. A 7. grafikon a 6 napos fermentlével kapott eredményeket szemlélteti.

Protoplasz- tok szá- ma Fer- mentlé kora	Geotrichum kora								
	72 ^h			24 ^h			12 ^h		
	Protoplasztszámlálás időpontja/óra								
	2	4	6	2	4	6	2	4	6
2. nap	o	o	o	o	3o	7o	o	5o	8o
4. nap	o	o	o	9o	28o	54o	15o	32o	67o
6. nap	o	o	o	9o	28o	67o	19o	38o	72o

9. táblázat: Protoplasztképződés változása a *Geotrichum* tenyészet korától függően

A kísérlet során az előállított *Trichoderma viride* enzimpreparátummal 72 órás *Geotrichum* tenyészetből protoplasztot nem tudtam nyerni.

7. grafikon: Protoplasztok számának alakulása a Geotrichum tenyészet korától függően, hat napos fermentlé esetében



A vizsgálatot ugyanezen preparátummal megismételtem, fiatal *Geotrichum* sejtekkel - 12^h és 24^h tenyésztéssel, s ily módon a hatodik óra végére a sejteknek kb. 60-70 %-a protoplasztá alakult. A 12 órás tenyésztéssel kaptam a legjobb eredményt, így a továbbiakban ilyen korú sejtekkel végeztem a protoplasztálást.

2.4. A protoplasztképződés feltételeinek tanulmányozása *Rhodotorula rubra* esetében

Feladatom különböző gombafajokból való protoplasztképzés volt.

Eddigi előkísérleteimben protoplasztáláshoz tesztorganizmusként a *Geotrichum candidum*-ot használtam.

Felmerült a kérdés, hogy a *Trichoderma viride*-ből nyert enzim alkalmas-e egyéb gombafajokból történő protoplasztképzésre.

A választ az első tájékozódó jellegű vizsgálatok megadták, amikor is a fermentlébe friss *Rhodotorula*, ill. *Saccharomyces* sejteket vittem, s egy óra elteltével megjelent a protoplasztokra utaló gömbtest a mikroszkópban.

Ezekre alapozva kutattam most már azokat a tényezőket, amelyekkel a protoplasztképződés intenzitása, illetve az enzim aktivitása fokozható.

Első lépésként különböző tápközegeken előállított /1.1. fejezet/ fermentlevekkel kíséreltem meg Rhodotorula sejtekből protoplasztot nyerni. A protoplasztálást 2-merkaptóetanol jelenlétében és a nélkül is elvégeztem. Az eredményeket a 10. táblázat mutatja. A 8. grafikonon a 6 napos enzimpreparátummal nyert eredményeket emeltem ki.

A fermentlevekben a protoplasztképzés beállításakor közvetlenül megállapítottam a sejtszámot. A kezdeti csiraszám 1800-2000/ml volt.

A táblázatból látható, hogy a tápközeg összetételétől függően változott a protoplasztok száma. A legkevesebb protoplasztot a foszformentes minimálon termelt enzimpreparátummal kaptam.

A 24. órára a protoplasztok nagy része szétesett.

A Rhodotorulával indukált enzimpreparátum aktívabbnak bizonyult, mint a Geotrichummal indukált. Ez vonatkozik különösen a kétnapos fermentlére.

A 2-merkaptóetanol kedvezően befolyásolta a protoplasztképződést.

A legjobb eredményt a Rhodotorulát tartalmazó glükózmentes minimálon előállított preparátummal kaptam, amikor a fermentléhez 1^o/oo merkaptóetanolt adtam. Azonban itt is csak kb. 70 %-os protoplasztképződést értem el.

A következőkben az lett volna a cél, hogy az eredményeket fokozzuk. Ehhez egyik megoldásként a protoplaszt-képzésre kerülő Rhodotorulát különböző körülmények között tenyésztettük. Nevezetesen folyékony tápoldatban és szilárd táptalaj felületén. Így tulajdonképpen a levegő el-látottságban volt eltérés, ami az anyagcserefolyamatok i-rányát befolyásolhatja.

Az enzimermelletés Geotrichum-tartalmú szénmentes mi-nimál tápközegen végeztem 2, 4 és 6 napon át. Az elválasz-tott fermentáló protoplasztáló képességét vizsgáltam:

- felületen /L/ tenyésztett Rhodotorula sejtekre 2-merkaptóetanol jelenlétében /Rh met/ és a nélkül /Rh/,

- folyadékban /F/ tenyésztett Rhodotorula sejtekre ugyiszintén 2-merkaptóetanol jelenlétében és nélküle.

A vizsgálati eredményeket a 11. táblázatban foglal-tam össze. A különböző korú enzimpreparátumokkal merkaptó-etanol jelenlétében kapott adatokat ábrázoltam a 9. grafi-konon.

Az eredményeket értékelve - a folyékony tápközegen előnevelt Rhodotorula sejtekből nagyobb mennyiségű proto-plasztot tudtam nyerni, mint petricsészében szilárd tápta-laj felületén szaporított Rhodotorula sejtekből, azonban itt is csak a 75 % volt a protoplasztok mennyisége a kez-deti csiraszámhoz viszonyítva.

Megjegyezném, hogy a sejtek mindkét esetben azonos korúak voltak. A további vizsgálatokhoz folyékony tápközegben ne-veltem elő a gombát.

Protoplasz- Kül- tok lön- száma bőző tápközegen nyers fermentlevek	Enzimpreparátum kora											
	2 nap				4 nap				6nap			
	Protoplasztálás időtartama											
	2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
G	o	5o	12o	8o	1o	19o	27o	1oo	1oo	25o	32o	18o
G met	2o	7o	21o	16o	4o	23o	26o	1oo	27o	53o	8oo	42o
Rh	5o	55o	71o	13o	1oo	34o	67o	6oo	15o	54o	68o	28o
Rh + met	12o	56o	83o	48o	15o	73o	121o	5oo	2oo	1o9o	129o	62o
Rh-P	o	1o	2o	6o	o	12o	15o	7o	12o	18o	22o	34o
Rh-P + met	3o	3o	9o	14o	7o	28o	3oo	2oo	4o	3oo	47o	15o

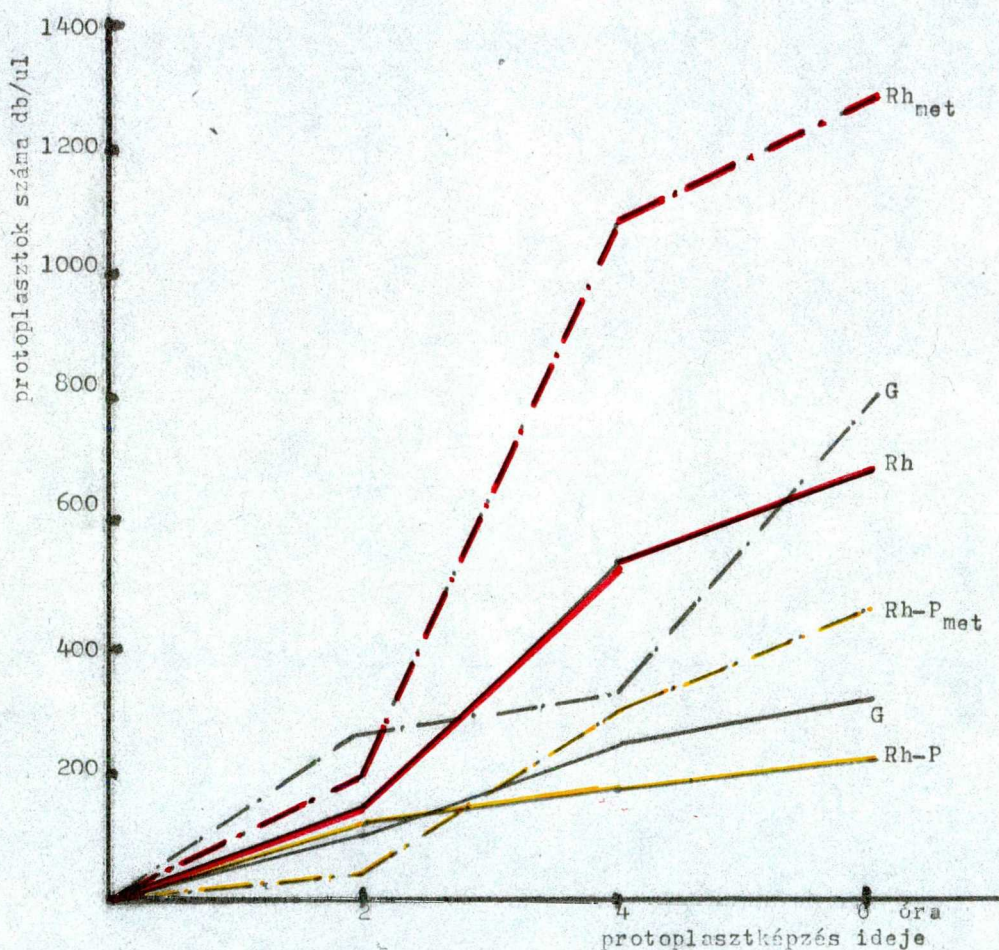
10. táblázat: Rhodotorula rubrából előállított protoplasztok számának változása az indukción tápközeg összetételének függvényében

G - 2 % Geotrichumot tartalmazó glükózmentes minimál

Rh--1 % Rhodotorula sejtet tartalmazó glükózmentes minimál

Rh - P. Pásztor és glükózmentes minimál

8. grafikon: Rhodotorula protoplasztok/ozmoplasztok/szá-
mának változása különböző tápközegeken elő-
állított enzimpreparátummal /6 napos/



G= Geotrichumot tartalmazó minimál tápoldat
 Rh=Rhodotorulát tartalmazó " "
 Rh-P= Rhodotorulát tartalmazó foszfor mentes minimál
 met= merkaptotanol

Proto- plasztok Fer- mentlé száma			Protoplasztálás időpontja/óra							
			2		4		6		24	
			Rhodotorula előtenyésztési körülményei							
			L	F	L	F	L	F	L	F
Kora/nap	2	Rh _{met}	125	350	325	475	375	650	450	725
		Rh	75	100	174	275	200	475	250	630
	4	Rh _{met}	325	725	550	1775	875	1825	1200	1950
		Rh	325	675	400	675	550	750	650	975
	6	Rh _{met}	475	925	550	1850	930	2240	1225	2925
		Rh	250	700	400	1225	680	1900	1075	2475

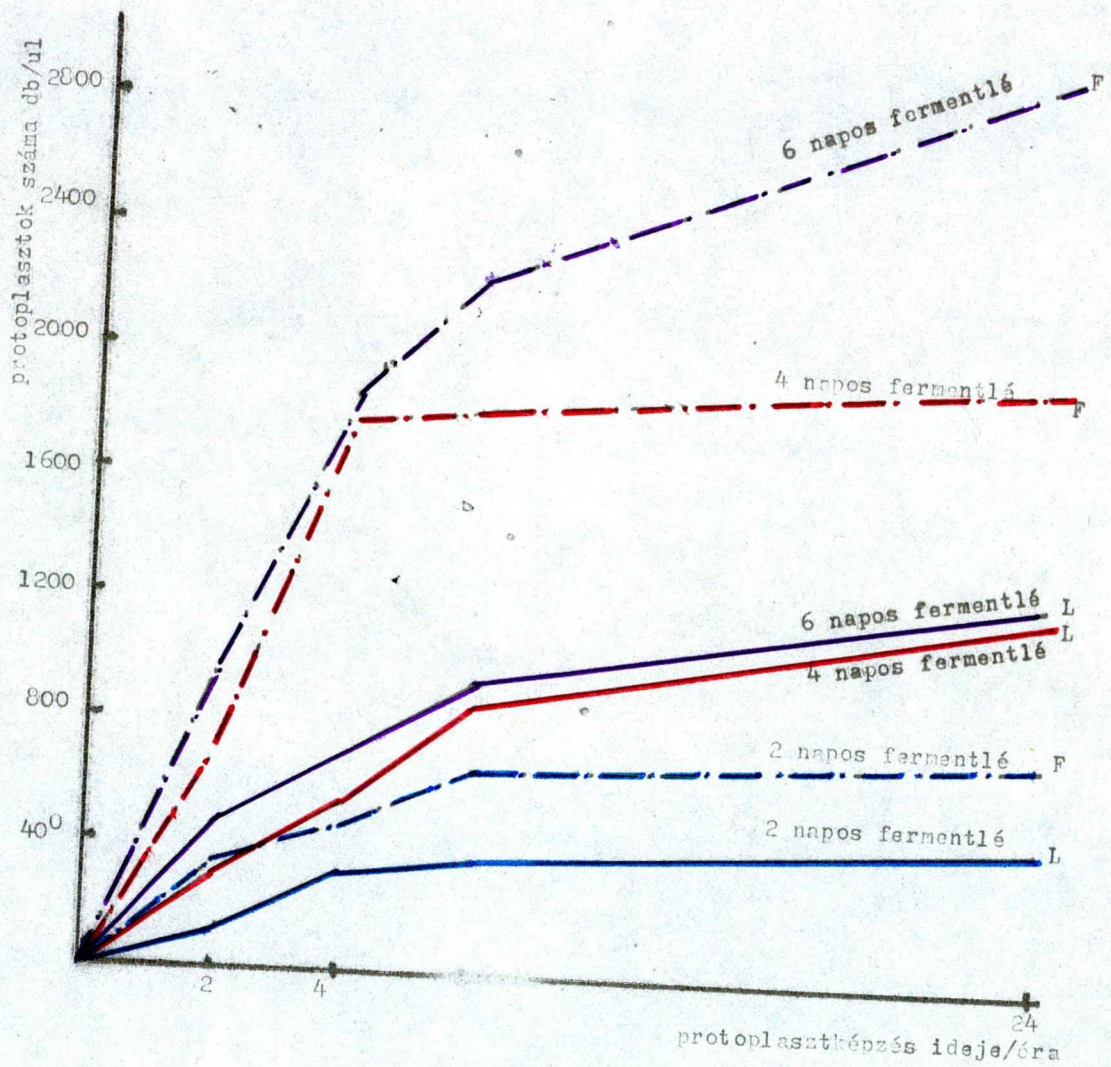
Kezdeti csiraszám: 3600-4000/ul

11. táblázat: Különböző körülmények között tenyésztett Rhodotorula sejtek protoplasztálódása

Rh = Rhodotorulát tartalmazó minimálisan indukálva
met = 1 °/oo merkaptotetanolt tartalmaz

L = lemez
F = folyadék

9. grafikon: Felületen /L/ és folyadékban /F/ tenyésztett
Rhodotorula sejtök protoplasztálódása 2, 4 és
6 napos T. viride enzimpreparátummal



A tájékozódó jellegű előkísérletek utolsó lépéseként megvizsgáltam a különböző tápközegeken nyert *Trichoderma viride* enzimpreparátum sejtfalbontó hatását *Saccharomyces cerevisiae* R XII sejtekre.

A tiszta ozmotikusan stabilizált fermentléhez az 6-lesztő 12 órás tenyészetéből annyit adtam, hogy a ml-kénti csiraszám kb. 10^6 - 10^7 legyen, s ellenőriztem a képződött protoplasztok számát 2., 4. és 6. óra elteltével.

Az eredményeket a 12. táblázat és 10. grafikon mutatja.

Mindhárom tápközegen termelt fermentlé rendelkezett sejtfalbontó aktivitással.

A legintenzívebb sejtfalbontást a *Geotrichum* indukció esetében kaptam. Merkaptotetanolos közegben a 4 és 6 napos fermentlével valamennyi sejt protoplasztává alakult.

A *Rhodotorula* és *Saccharomyces* tartalmú indukciós közegben nyert enzimrendszer aktivitása hasonló volt, de valamivel kisebb, mint az előző tápoldatonál.

A 2-merkaptotetanol pozitívan hatott a *Saccharomyces* sejtekből való protoplasztképzésre is.

Az aktivitás valamennyi esetben fokozódott a fermentációs idő emelkedésével.

A számottevő különbség a 2-merkaptotetanol nélkülihez viszonyítva nem mutatkozott.

A grafikon a 2-merkaptotetanol-tartalmú fermentlévek protoplasztképző hatását ábrázolja.

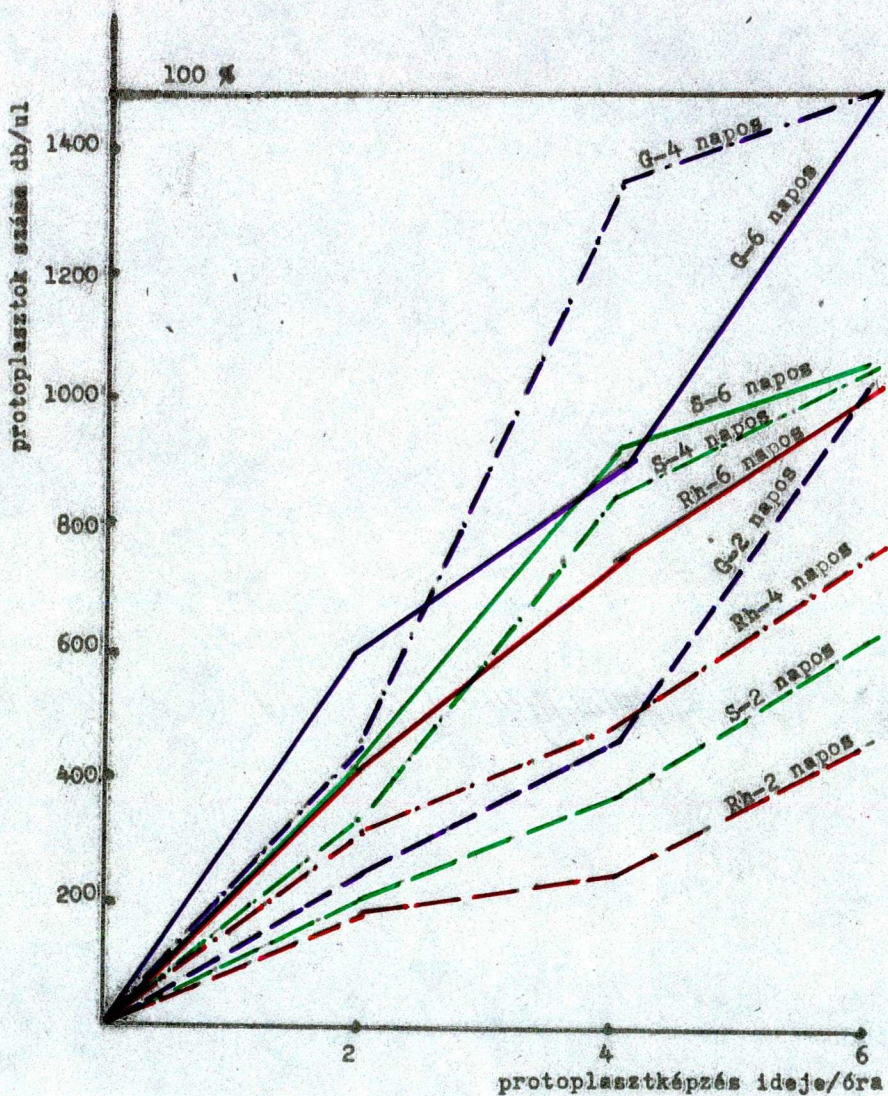
Protoplasztok Fermentle száma kora nap	Enzimindukcióhoz használt tápközegek								
	G -			Rh -			S -		
	Protoplasztszámlálás időpontja								
	2	4	6	2	4	6	2	4	6
2	228	388	980	132	227	450	200	342	620
2 + met	247	460	1040	186	250	480	210	380	645
4	370	1280	1390	250	390	620	310	540	830
4 + met	460	1370	1510	310	480	775	340	860	1050
6	452	540	1370	380	610	975	370	910	1020
6 + met	610	900	1490	1420	760	1030	435	930	1180

Kezdeti csiraszám: $1,5 \cdot 10^3$ /ul

met = merkaptotanol

12. táblázat: *Saccharomyces cerevisiae* protoplasztok képződése az indukciós tápközeg függvényében *Trichoderma viride*-ből nyert enzimpreparátummal

10. grafikon: Saccharomyces protoplasztok képződése különböző indukciós tápközegeken nyert 2, 4, 6 napos enzimpreparátumban



A *Trichoderma viride*-vel történő sejtfalbontásra alkalmas enzimpreparátum előállításával és az ezzel történő protoplasztképzéssel kapcsolatos tájékoztató jellegű kísérleti eredmények összefoglalásaként az alábbiakat állapíthatjuk meg.

1. Enzimtermeltetésre glükózmentes minimál tápközeg a legmegfelelőbb. Induktorként 2 % *Geotrichum* sejtet /nedvesség/, 1 % *Rhodotorulát* vagy 1 % *Saccharomyces* sejtet szükséges belevinni, illetve mindhárom tápközeggel párhuzamosan dolgozni.
2. Kis mennyiségű tápoldattal /amely a tenyészedényben egyenletesen leoszlik/ jobb eredmény érhető el.
3. Az enzimtermeltetést hat napon át érdemes végezni, a 2., 4. és a 6. napon is ellenőrizni a sejtfalbontó hatást.
4. Protoplasztaszámlálást a 2., 4., 6. és 24. órában célszerű végezni.
5. Protoplasztképzésre 12-15 óránál nem idősebb tenyészetet szükséges használni.

3. Különböző Trichoderma fajok által termelt enzimpreparátum vizsgálata

Három Trichoderma törzset vizsgáltam meg abból a szempontból, hogy termelnek-e olyan enzimpreparátumot, amely alkalmas *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula rubra* és *Saccharomyces cerevisiae* sejtekből való protoplasztok készítésére.

Az enzintermeltetést, a protoplasztképzést és a protoplasztok számlálását a VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK c. fejezet 5., 6., és 7. pontja szerint végeztem. A vizsgálatok eredményeit a 13-42. táblázatokban foglaltam össze.

A 11-38. grafikonokon mindig azon enzimpreparátummal nyert eredményeket emeltem ki, amelyekkel a legnagyobb számú protoplasztot nyertem.

Jelölések: G - *Geotrichum* tartalmú glükózmentes minimálisan indukált fermentlé,

G_m - az előző fermentlé 1^o/oo 2-merkaptoetanollel,

Rh - 1 % *Rhodotorula*t tartalmazó glükózmentes minimálisan termelt fermentlé,

Rh_m - az előző fermentlé 1^o/oo 2-merkaptoetanol tartalommal,

S - Saccharomyces tartalmú glükózmentes minimálisan
termelt fermentáció,

S_m - a fenti fermentáció + 1^o/oo 2-merkaptotetanollal.

Az ordinátán az 1 ul-ben lévő protoplasztok számát,
az abszcisszán a protoplasztszámlálás időpontját vittem
fel.

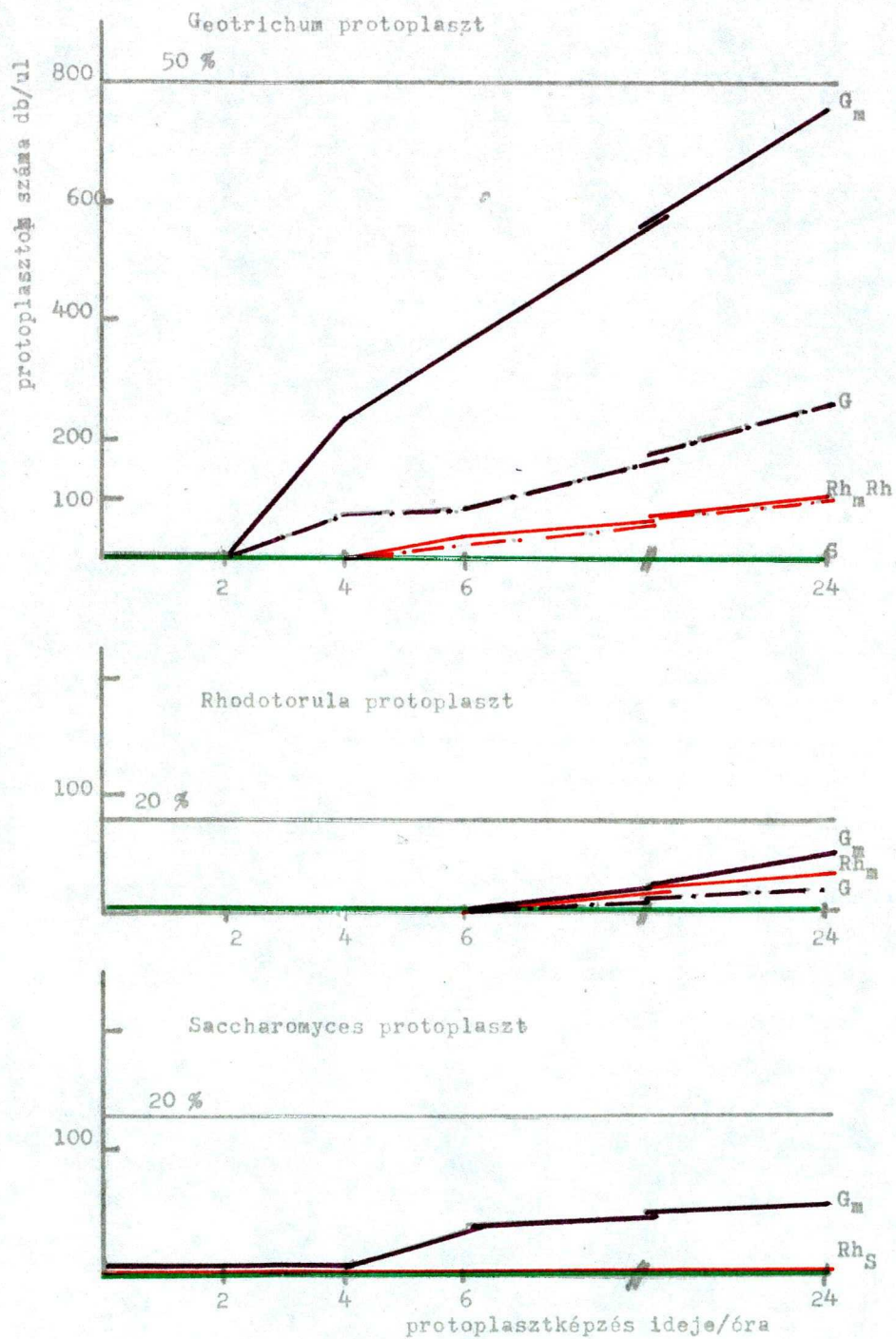
A protoplasztképződés mértékének gyors megítélése
szempontjából minden esetben bejelöltem egy százalékos
értéket.

A törzsek 48 órás ferdeagaron és lemezen szaporított
tenyészetéről készült felvételek a MELLÉKLET-ben szere-
pelnek.

Fermentlé kora	proto- plazmok fermentlé száma eredete ma	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	0	30	80	320	0	0	80	70	0	0	20	40
	G _m	0	100	500	1200	0	0	90	150	0	0	30	60
	Rh	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0
	Rh _m	0	0	0	110	0	0	0	90	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. nap	G	0	280	90	270	0	0	0	20	0	0	10	30
	G _m	0	230	360	770	0	0	0	50	0	0	40	50
	Rh	0	0	20	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rh _m	0	0	40	100	0	0	0	40	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. nap	G	0	80	110	250	0	0	0	0	0	0	0	0
	G _m	0	250	370	390	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rh	0	0	0	40	0	0	0	10	0	0	0	0
	Rh _m	0	0	20	50	0	0	0	30	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kezdeti csíreszáma:						400/ul				650/ul			

13. táblázat: Trichoderma koningi 51-35/13. 3. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

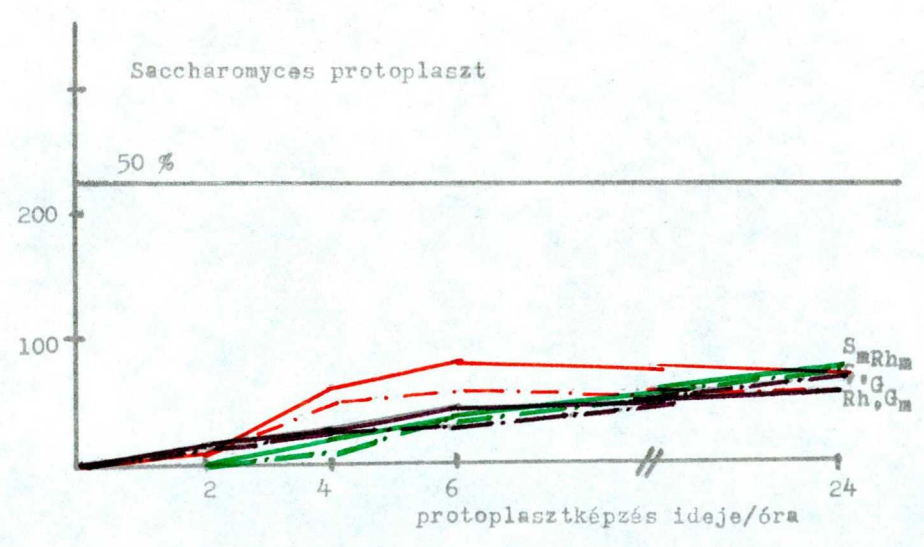
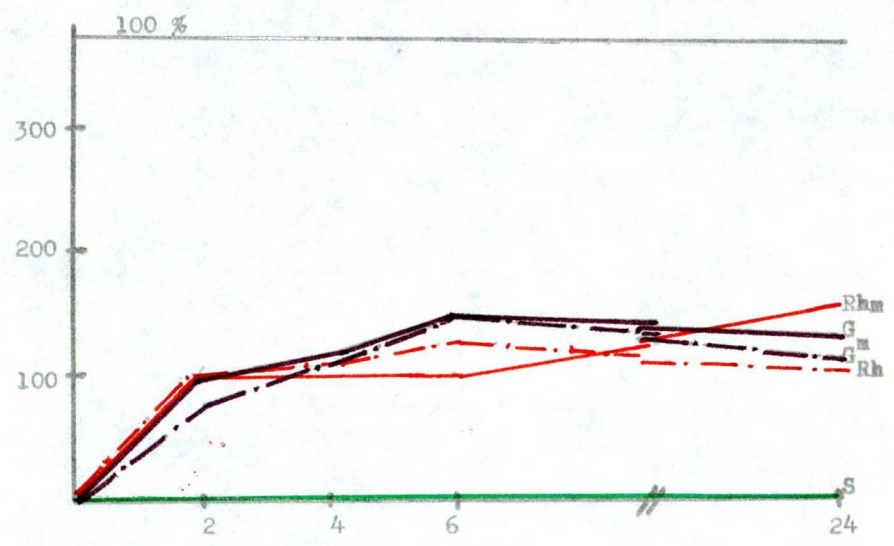
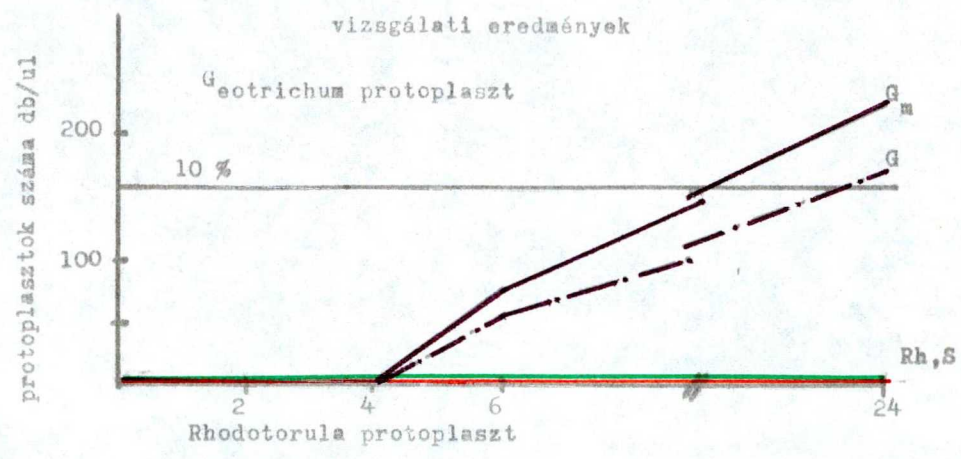
11. grafikon: *Trichoderma koeningi* 51-35/13.3. törzzsel kapcsolatos vizsgálatok eredményei



Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	o	200	280	o	o	o	25	o	10	30	40
	G _m	o	30	220	320	o	o	o	28	o	20	55	60
	Rh	o	o	o	o	o	o	40	60	o	20	30	60
	Rh _m	o	o	o	o	20	30	50	70	o	35	50	70
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	30	40	80
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	25	70	80
4. nap	G	o	o	60	180	80	110	150	120	10	30	30	70
	G _m	o	o	80	220	100	120	150	130	15	30	45	60
	Rh	o	o	o	o	80	100	100	160	10	50	60	60
	Rh _m	o	o	o	o	100	110	130	100	10	60	80	70
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	20	40	70
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	30	40	80
2. nap	G	o	o	60	140	18	35	40	70	o	o	10	30
	G _m	o	o	100	160	20	30	50	80	o	15	20	50
	Rh	o	o	o	o	40	50	60	80	o	o	30	60
	Rh _m	o	o	o	o	60	90	130	120	o	15	40	50
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	10	10	20
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	10	25
Kezdeti csíraszám:						370/ul				450/ul			

14. táblázat: *Trichoderma koeningi* 51-35/13. 4. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

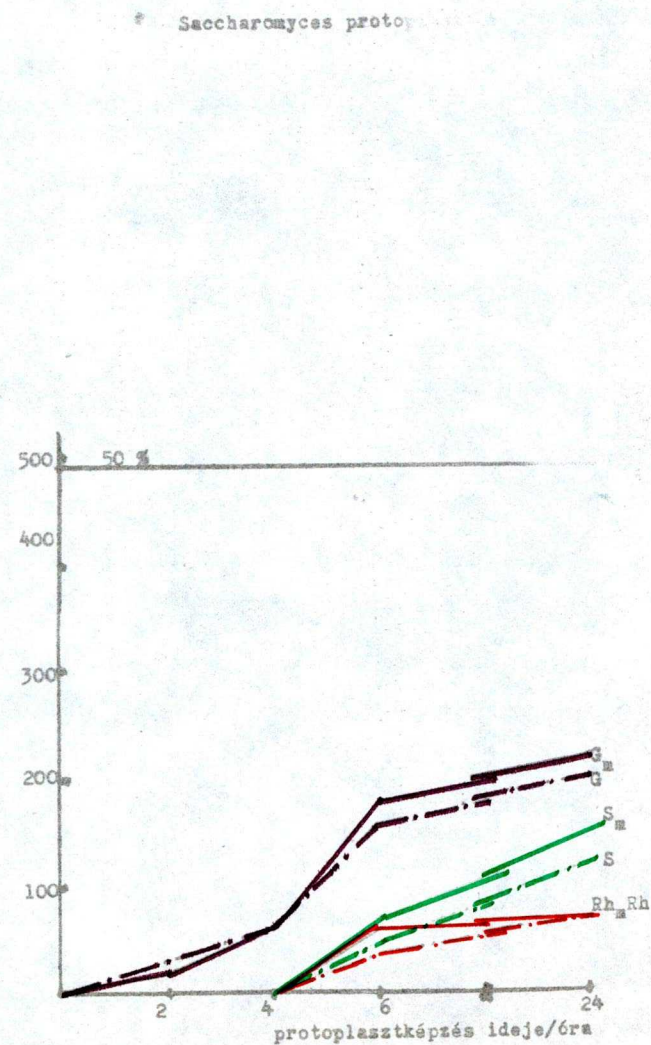
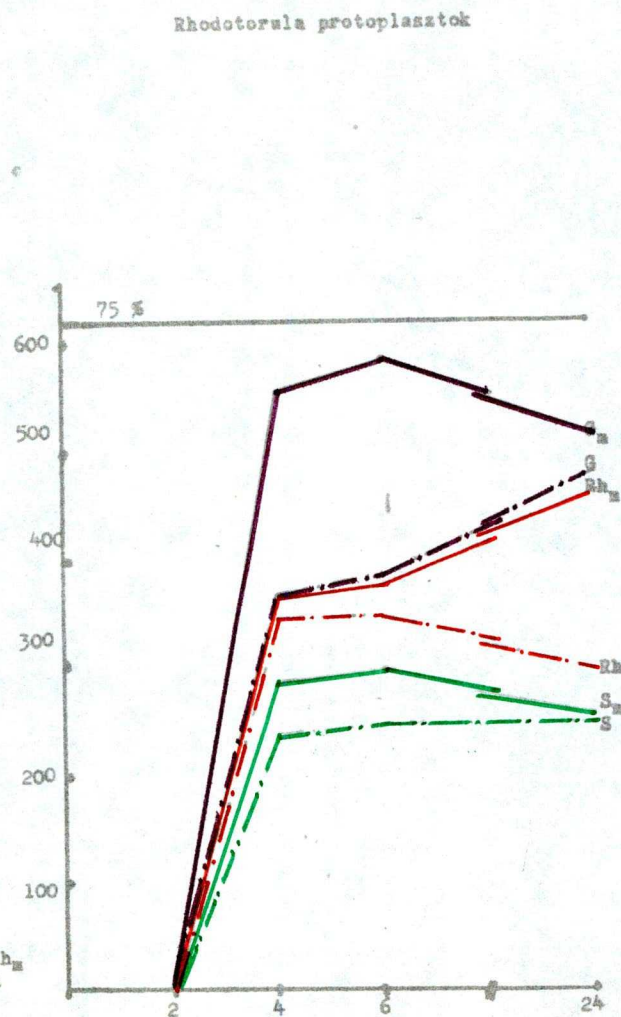
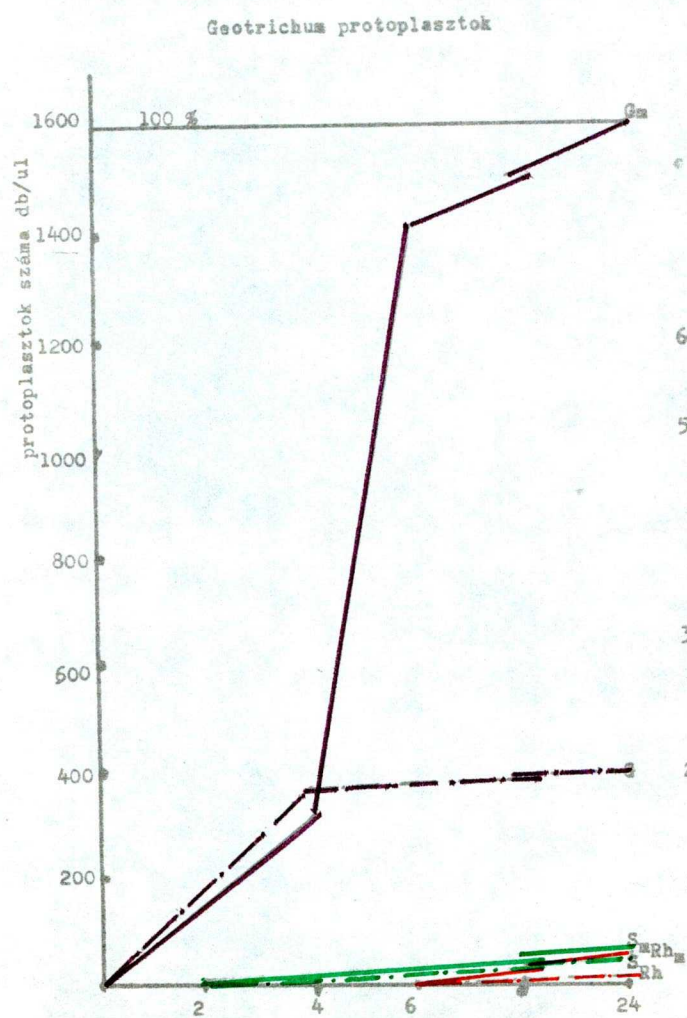
12. grafikon: Trichoderma koeningi 51-35/13. 4. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények



Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	10	200	240	260	0	0	150	300	15	70	130	190
	G _m	20	170	270	290	0	0	180	300	20	85	145	210
	Rh	0	0	0	20	0	240	260	270	0	0	15	120
	Rh _m	0	10	10	40	0	360	310	280	0	0	40	210
	S	0	0	10	60	0	160	170	140	0	0	60	190
	S _m	0	0	10	40	0	220	280	190	0	0	75	250
4. nap	G	0	370	380	400	0	370	390	480	30	60	160	200
	G _m	0	320	1420	1630	0	560	590	520	25	60	185	210
	Rh	0	0	0	20	0	350	350	300	0	0	40	70
	Rh _m	0	0	0	60	0	370	380	460	0	0	60	70
	S	0	0	30	50	0	240	250	250	0	0	50	120
	S _m	0	0	40	70	0	290	300	270	0	0	70	140
2. nap	G		120	570	950	0	320	340	350	0	30	100	110
	G _m		140	1250	1250	0	470	480	450	0	50	110	125
	Rh	0	0	0	0	0	330	350	300	0	0	0	0
	Rh _m	0	0	0	60	0	340	340	320	0	0	0	0
	S	0	0	20	40	0	200	210	190	0	0	0	0
	S _m	0	0	40	60	0	250	230	260	0	0	0	0
Kezdeti csíraszám:						1200/ul				860/ul			

15. táblázat: *Trichoderma koeningi* 51-35/13. 5. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

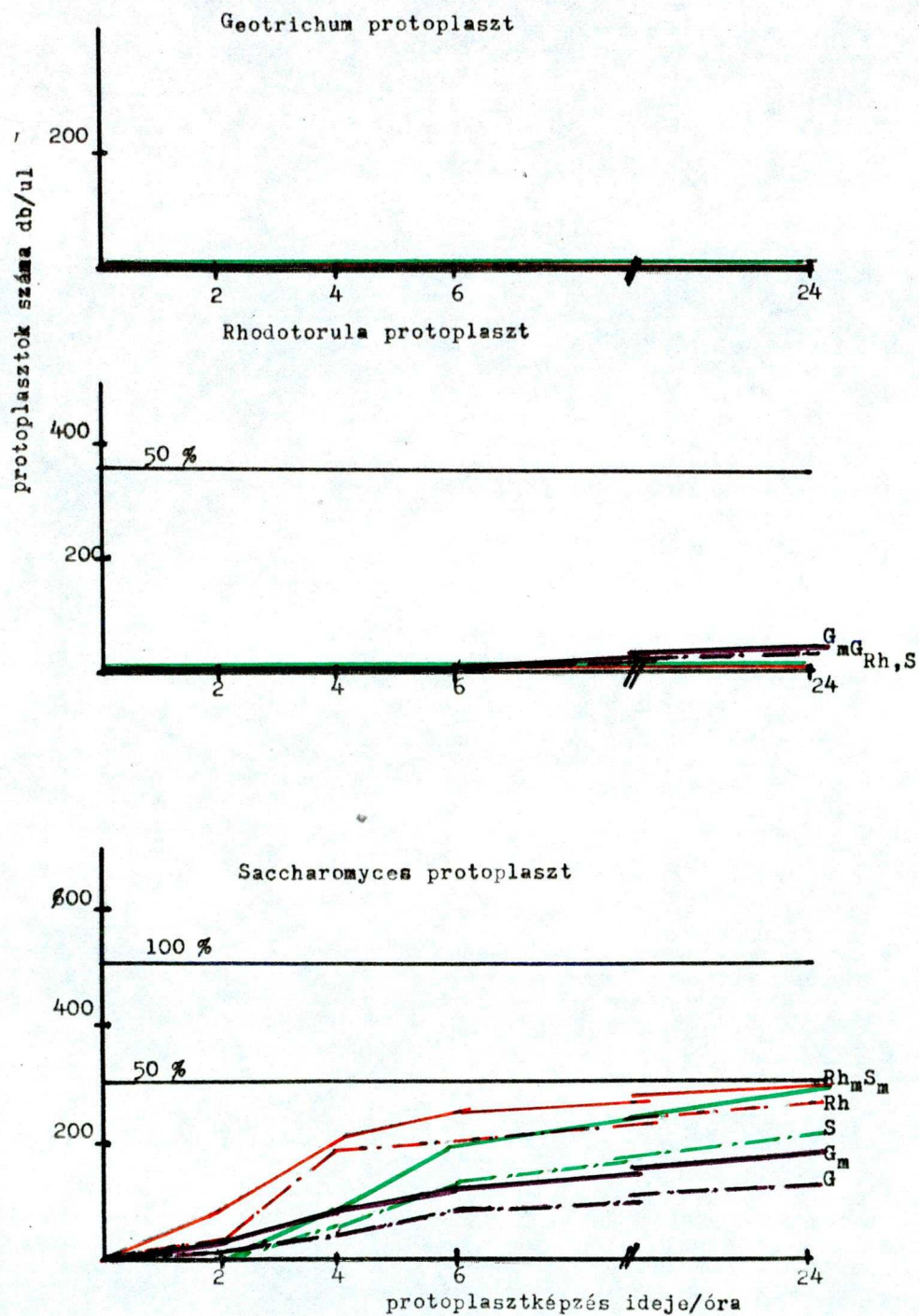
13. grafikon: Trichoderma koningi 51-35/13. 5. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények



Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé eradete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	2o	o	3o	11o	17o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	4o	o	3o	1oo	2oo
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	5o	6o	1oo	15o	23o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	6o	6o	12o	18o	29o
	S	o	o	o	o	o	o	o	1o	o	3o	5o	17o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	2o	o	5o	8o	19o
4. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	3o	1o	4o	8o	12o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	4o	3o	8o	12o	18o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	3o	19o	2oo	27o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	9o	21o	25o	3oo
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	6o	13o	21o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	9o	2oo	29o
2. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	2o	o	o	1o	2o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	2o	o	o	3o	5o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	2o	6o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1o	3o	1oo
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	3o	7o	11o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	5o	1oo	14o
Kezdeti csíreszáma:						71o/ul				522/ul			

16. táblázat: Trichoderma koeningi 51-35/13. 6. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

14. grafikon: *Trichoderma koeningi* 51-35/13. 6. törzzsel kapcsolatos vizsgálati eredmények

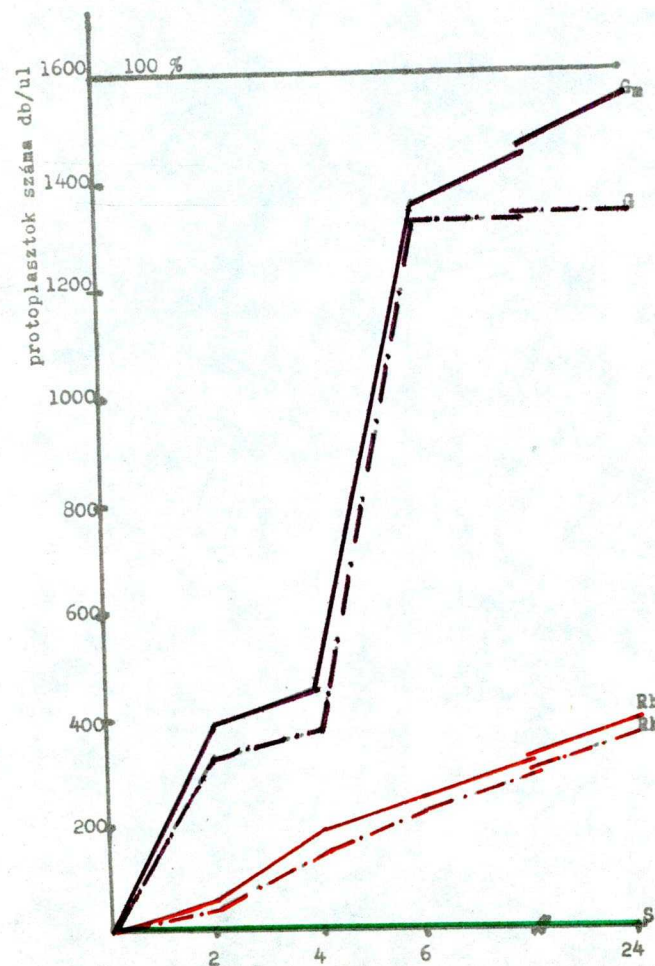


Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé száma eradete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	53o	79o	129o	152o	28o	45o	49o	61o	1o	6o	17o	28o
	G _m	68o	82o	137o	159o	29o	52o	54o	63o	3o	7o	19o	3oo
	Rh	o	o	5o	15o	6o	15o	18o	32o	11o	12o	17o	24o
	Rh _m	o	1o	6o	18o	13o	18o	24o	36o	12o	16o	19o	26o
	S	o	o	o	o	o	2o	4o	11o	1oo	13o	15o	23o
	S _m	o	o	o	o	o	3o	4o	13o	11o	15o	17o	25o
4. nap	G	33o	38o	132o	134o	23o	45o	46o	6oo	1o	1oo	15o	29o
	G _m	39o	46o	136o	156o	28o	51o	57o	63o	6o	12o	18o	32o
	Rh	5o	15o	22o	32o	24o	4oo	54o	56o	1oo	25o	27o	3oo
	Rh _m	7o	19o	25o	39o	27o	42o	59o	61o	13o	27o	38o	31o
	S	o	o	o	o	1o	4o	6o	15o	o	6o	9o	12o
	S _m	o	o	o	o	1o	6o	9o	16o	o	8o	13o	15o
2. nap	G	o	o	o	o	16o	17o	25o	46o	o	12o	13o	29o
	G _m	o	o	o	o	18o	21o	29o	5oo	3o	15o	17o	31o
	Rh	o	o	o	o	1oo	3o	44o	51o	o	o	9o	11o
	Rh _m	o	o	o	o	12o	33o	5oo	53o	o	3o	11o	14o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Kezdeti csíreszáma:						12oo/ul				73o/ul			

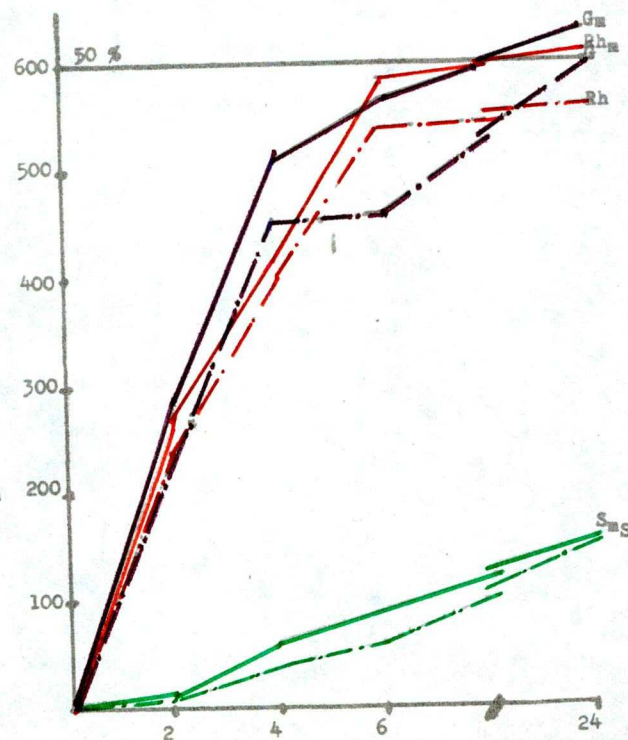
17. táblázat: T. koeningi 51-35/13. 7. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

15. grafikon: *Trichoderma koeningi* 51-35/13. 7. törzzsel kapcsolatos vizsgálati eredmények

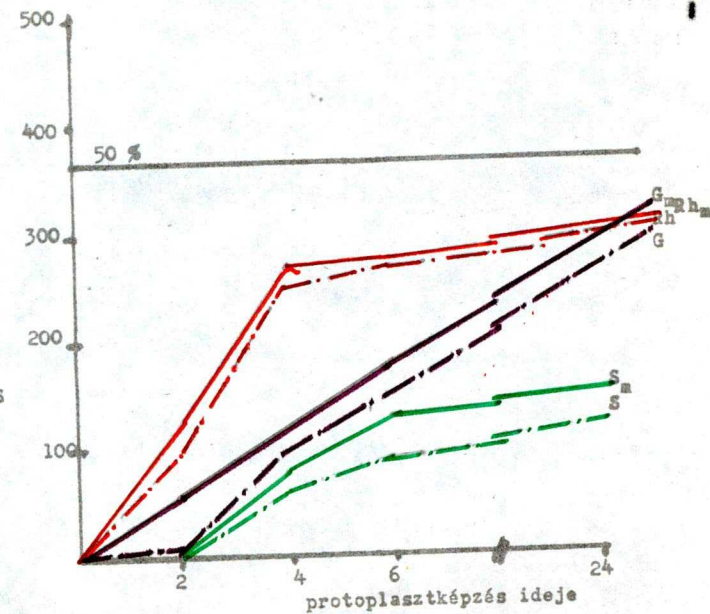
Geotrichum protoplasztok



Rhodotorula protoplasztok



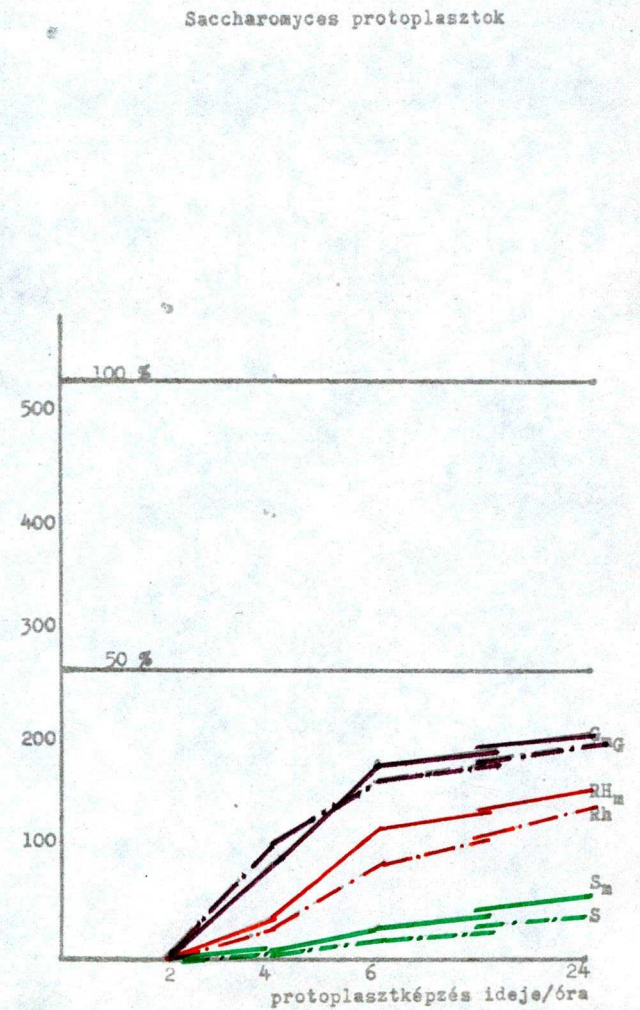
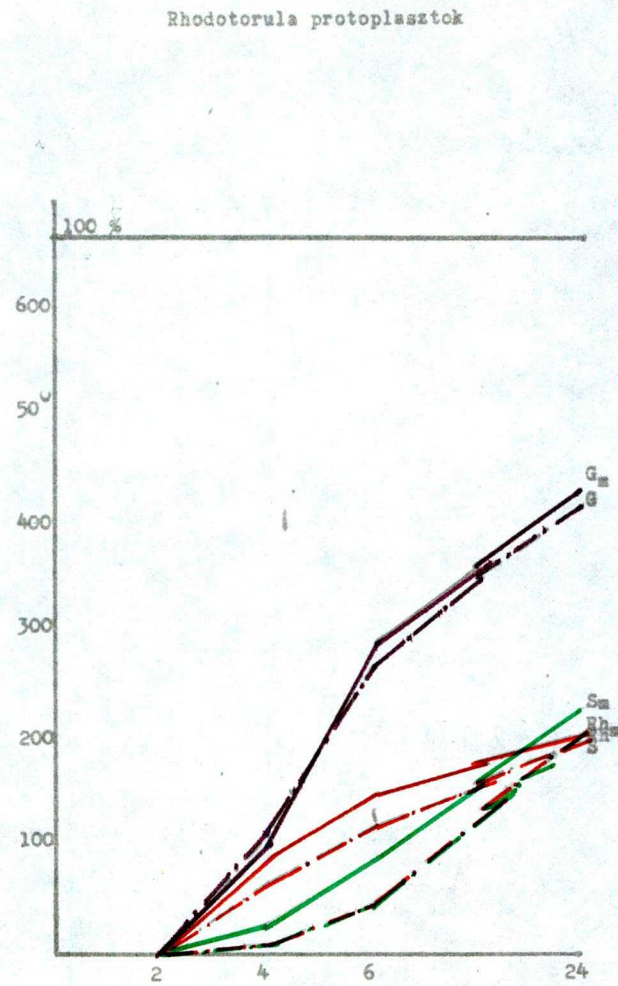
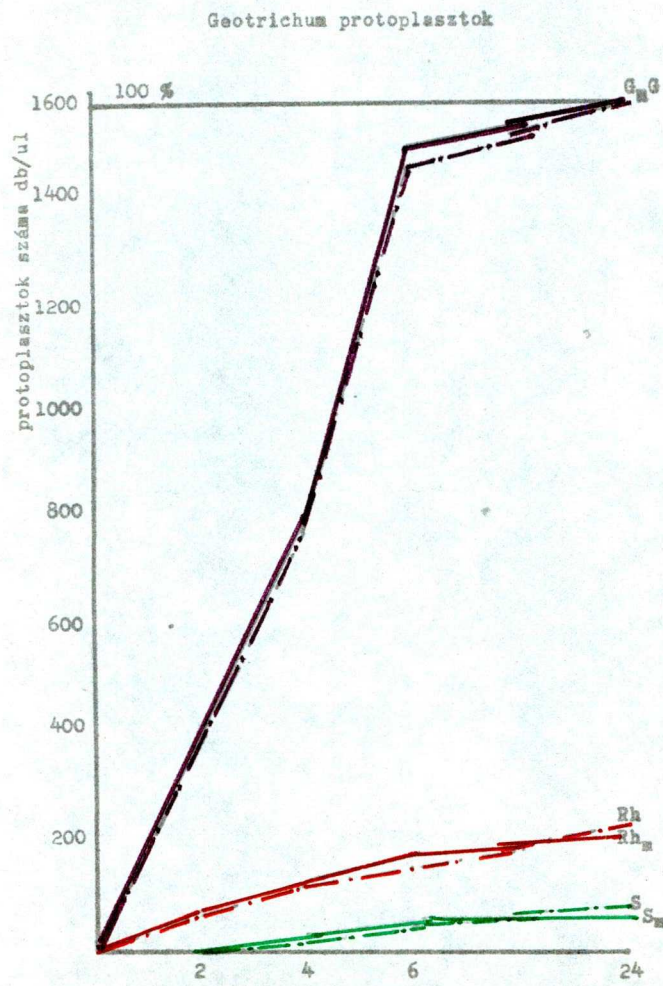
Saccharomyces protoplasztok



Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	38o	79o	146o	158o	o	11o	27o	42o	o	11o	17o	20o
	G _m	40o	81o	150o	159o	o	10o	29o	43o	o	9o	18o	21o
	Rh	7o	13o	16o	24o	o	7o	12o	20o	o	3o	9o	14o
	Rh _m	8o	14o	18o	23o	o	9o	15o	21o	o	4o	12o	16o
	S	o	2o	5o	8o	o	1o	5o	20o	o	o	2o	4o
	S _m	o	3o	6o	7o	o	3o	9o	23o	o	1o	3o	6o
4. nap	G	36o	67o	120o	154o	o	2o	7o	14o	o	7o	10o	12o
	G _m	39o	68o	122o	153o	o	4o	7o	16o	o	8o	13o	13o
	Rh	1o	3o	7o	10o	o	o	3o	10o	o	3o	12o	12o
	Rh _m	2o	4o	9o	11o	o	2o	5o	15o	o	4o	13o	15o
	S	o	o	o	2o	o	o	o	6o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	1o	3o	9o	o	o	1o	6o
2. nap	G	o	o	o	6o	o	o	o	o	o	o	1o	6o
	G _m	o	o	3o	9o	o	o	o	6o	o	o	2o	8o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	8o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	2o	10o
	S	o	o	o	o	o	o	o	2o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Kezdeti csíreszáma:					67o/ul				54o/ul				

18. táblázat: Trichoderma koeningi 51-35/13. 11. törzzsel kapcsolatos vizsgálati eredmények

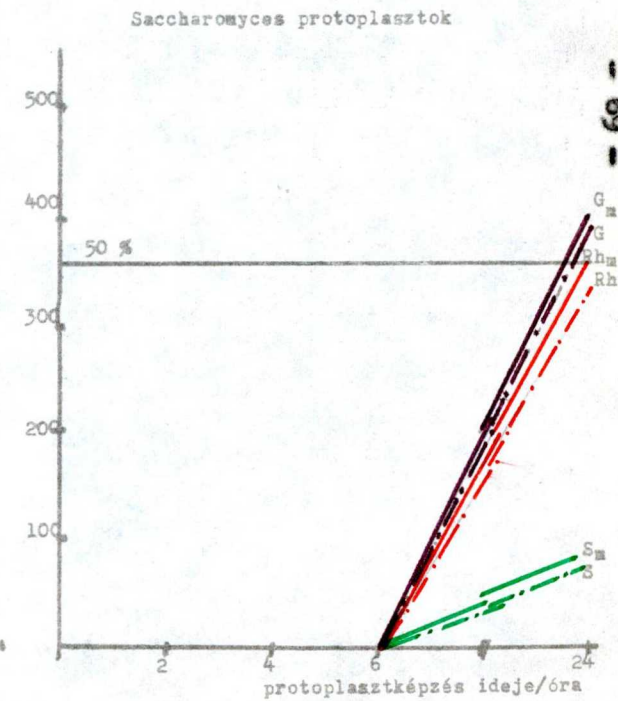
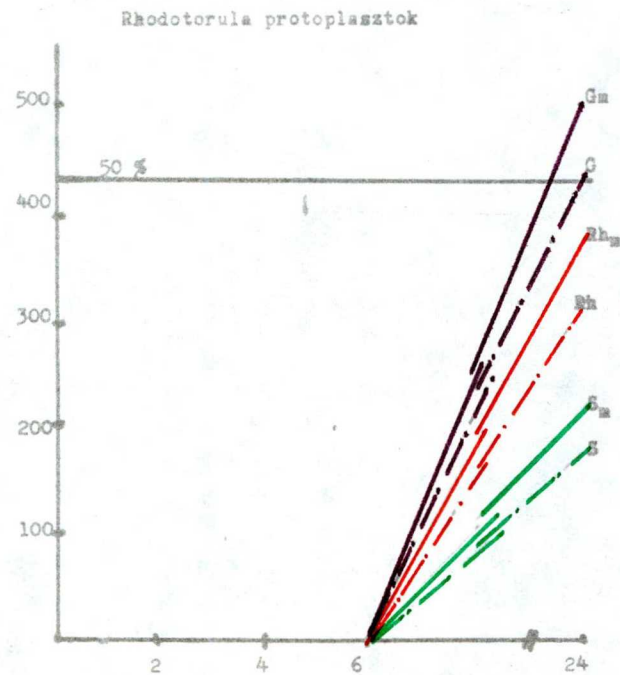
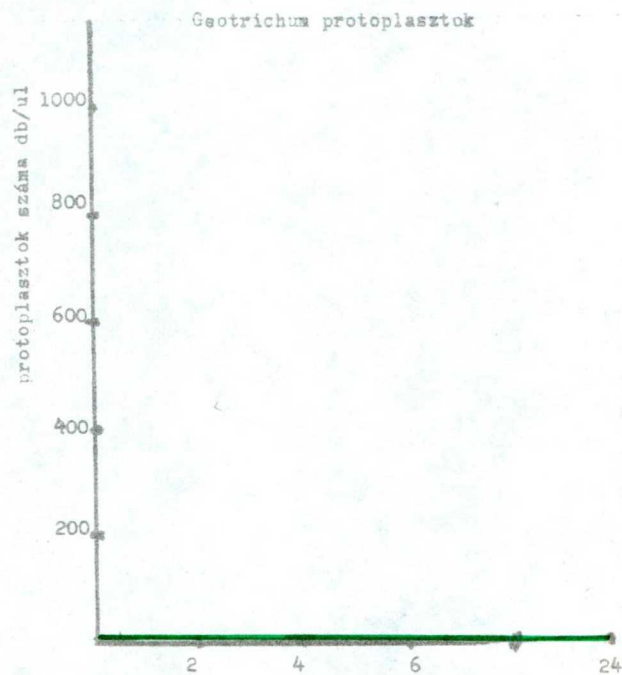
16. grafikon: *Trichoderma koeningi* 51-35/13. 11. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények



Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé szá- ma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	44o	o	o	o	38o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	50o	o	o	o	40o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	32o	o	o	o	34o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	38o	o	o	o	36o
	S	o	o	o	o	o	o	o	18o	o	o	o	8o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	22o	o	o	o	9o
4. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	32o	o	o	o	32o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	34o	o	o	o	33o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	4o	o	o	o	42
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	8o	o	o	o	5o
	S	o	o	o	o	o	o	o	2o	o	o	o	34
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	4o	o	o	o	4o
2. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	32o	o	o	o	34
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	36o	o	o	o	6o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	22
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	3o	o	o	o	3o
	S	o	o	o	o	o	o	o	6o	o	o	o	1o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	8o	o	o	o	2o
Kezdeti csíreszáma:						86o/ul				72o/ul			

19. táblázat: *Trichoderma pseudo koningi* 51-32/1. 9. törzsszel kapcsolatos
vizsgálati eredmények

17. grafikont: *Trichoderma pseudo koningi* 51-32/ 1. 9. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények



Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Kezdeti csíraszám:					82o/ul				68o/ul				

20. táblázat: *Trichoderma pseudo koningi* 61-32/1. 8. törzsszel kapcsolatos
vizsgálati eredmények

Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Kezdeti csiraszáma:						67o/ul				71o/ul			

21. táblázat: Trichoderma koningi komplex koningii típus 23-33/6. 56.

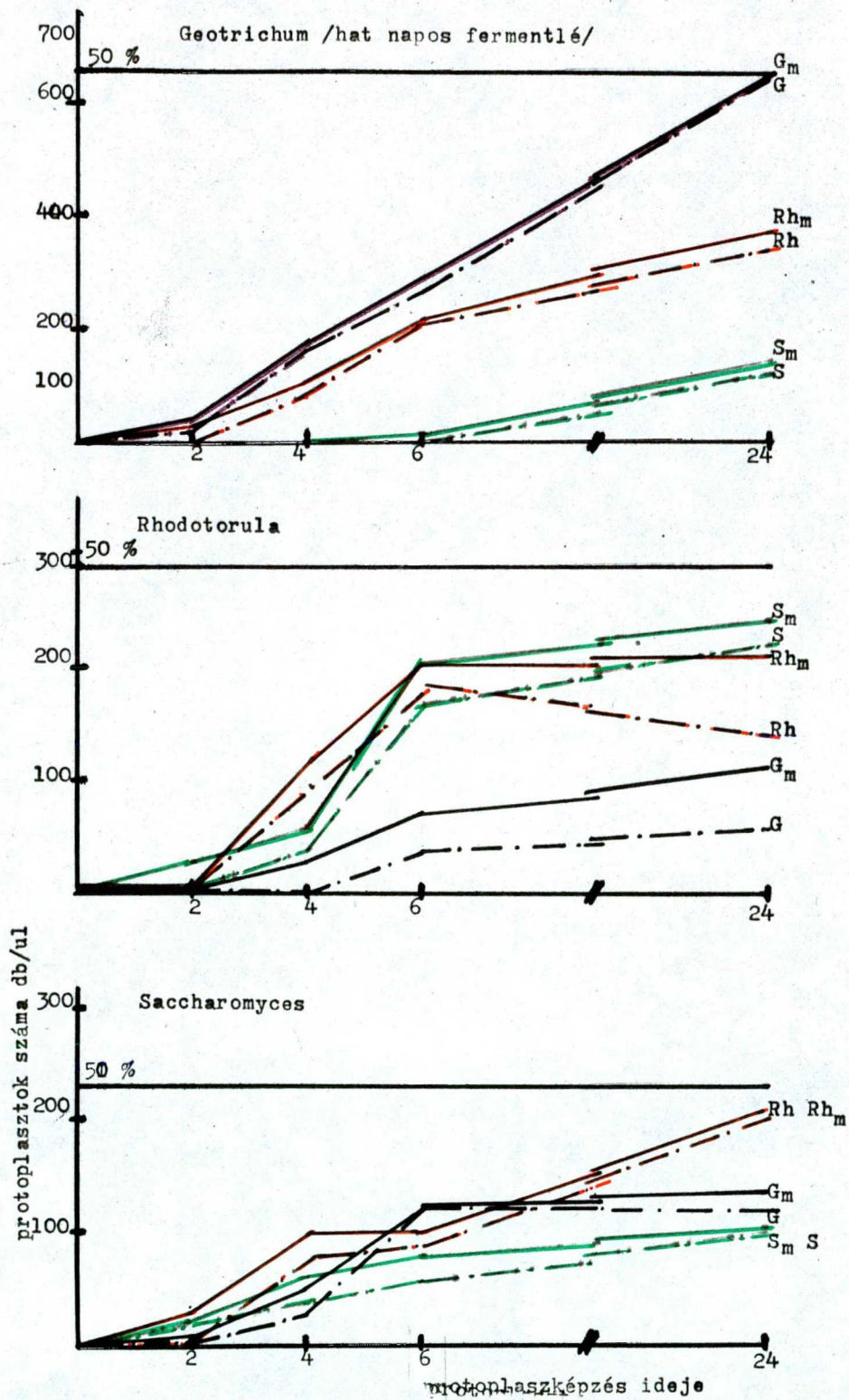
törzzsel kapcsolatos vizsgálati eredmények

Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete ma	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	20	160	270	640	0	0	40	60	0	30	120	120
	G _m	40	180	290	650	0	30	70	110	10	50	120	130
	Rh	0	80	210	350	0	90	180	140	0	90	90	200
	Rh _m	30	100	220	370	0	120	200	210	30	100	100	220
	S	0	0	0	120	0	40	170	220	20	50	50	100
	S _m	0	0	20	140	30	60	200	240	20	60	80	100
4. nap	G	0	90	170	420	0	30	110	160	30	70	110	120
	G _m	10	100	180	450	0	40	120	150	40	90	130	140
	Rh	0	0	0	160	0	20	120	200	10	30	60	100
	Rh _m	0	0	30	190	0	50	170	210	20	50	80	110
	S	0	0	0	100	0	0	0	20	10	40	80	80
	S _m	0	0	50	120	0	0	30	50	30	40	90	110
2. nap	G	0	50	120	370	0	10	60	80	0	0	40	60
	G _m	30	80	130	370	0	20	80	90	0	10	30	70
	Rh	0	0	0	120	0	50	100	200	0	0	50	60
	Rh _m	0	0	60	140	0	60	120	200	0	20	50	80
	S	0	0	60	140	0	60	120	200	0	20	50	80
	S _m	0	0	10	80	0	0	0	0	0	10	30	30
Kezdeti csiraszáma:						580/ul				460/ul			

22. táblázat: Trichoderma koening komplex koningii típus 23-32/1. 49.

törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények

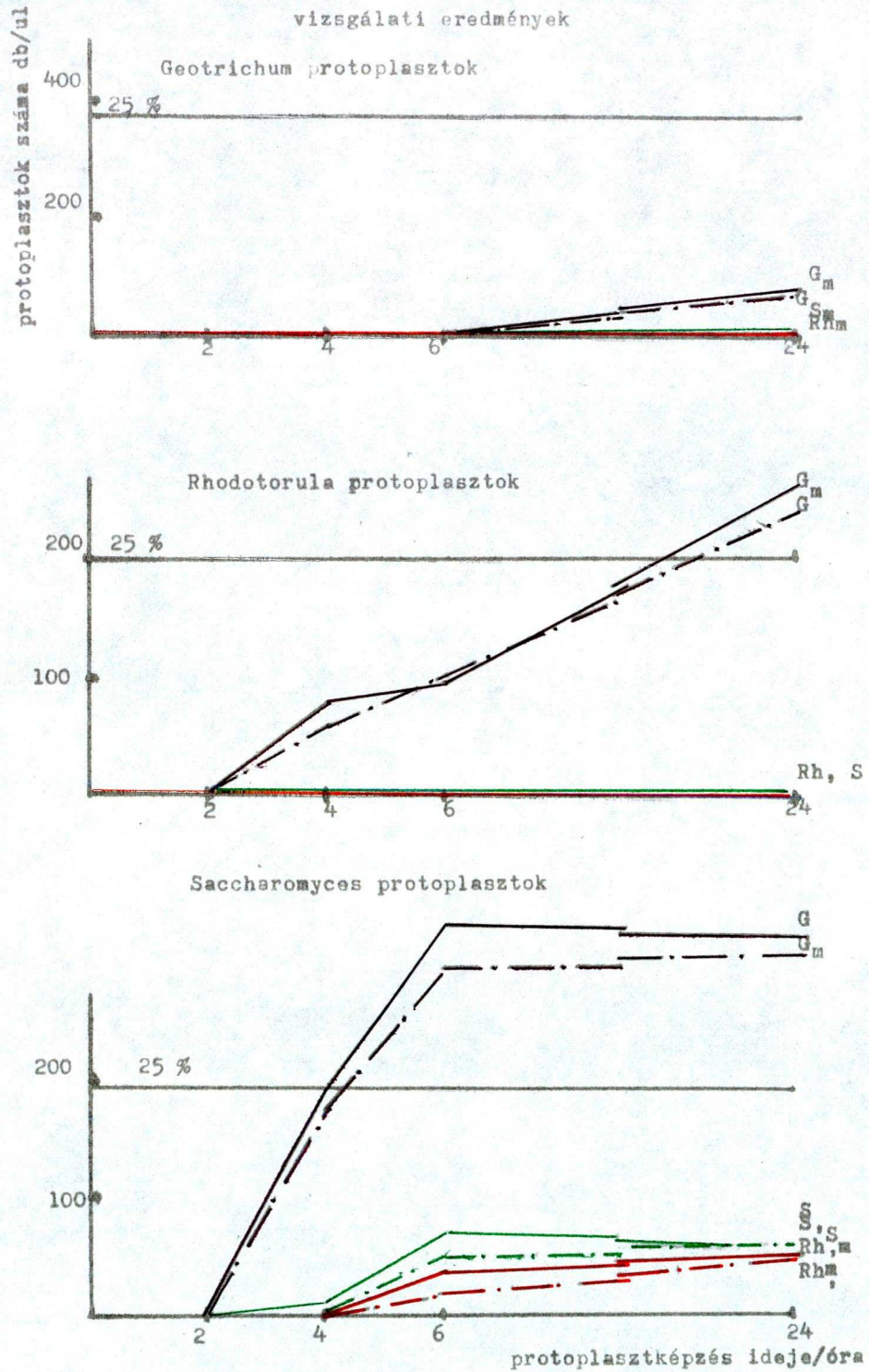
19. grafikon: Trichoderma koningi komplex koningii típus
23-32/1. 59. törzsszel kapcsolatos vizsgál-
lati eredmények



Fermentlé kora	proto- plazmok fermentlé száma eredete ma	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	0	0	0	70	0	60	100	250	0	180	300	310
	G _m	0	0	0	80	0	80	100	270	0	200	340	330
	Rh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	50
	Rh _m	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	40	50
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	60
	S _m	0	0	0	20	0	0	0	0	0	10	70	50
4. nap	G	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	G _m	0	0	0	50	0	0	0	20	0	0	10	30
	Rh	0	0	0	30	0	0	10	50	0	0	20	30
	Rh _m	0	0	0	30	0	20	30	100	0	20	40	60
	S	0	0	0	0	0	0	10	30	0	50	60	90
	S _m	0	0	0	20	0	10	40	60	0	70	110	90
2. nap	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	Rh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rh _m	0	0	0	0	0	0	0	70	0	0	0	10
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
Kezdeti csíreszáma:						820/ul				770/ul			

23. táblázat: *Trichoderma hamatum* 51-35/13. 10 törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

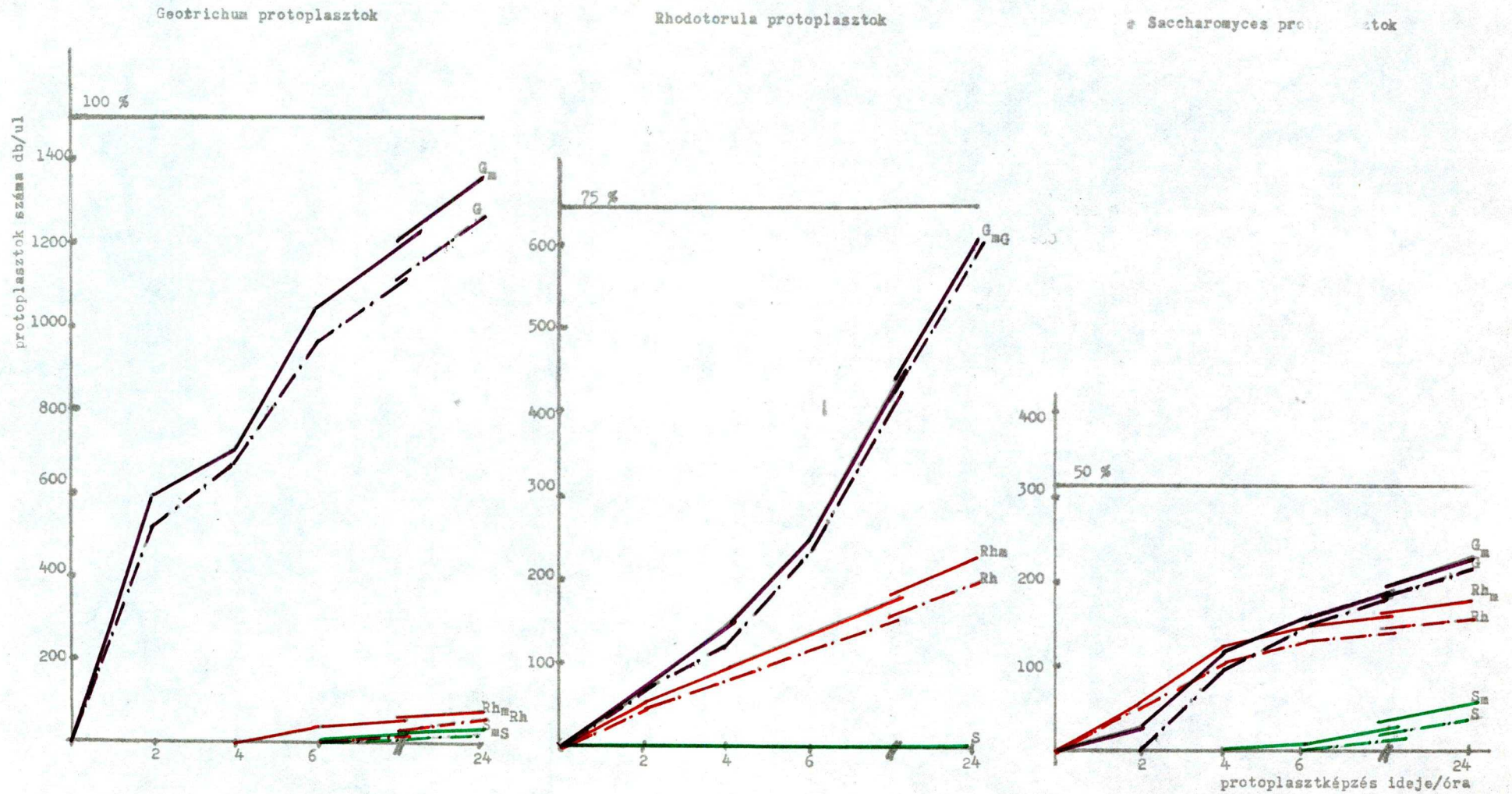
20.grafikon: *Trichoderma hamatum* 51-35/13.10 törzsszel kapcsolatos
vizsgálati eredmények



Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	250	370	420	760	0	30	70	100	0	30	70	100
	G _m	270	400	480	800	70	150	50	120	10	40	100	120
	Rh	0	0	0	70	0	0	50	120	0	0	50	80
	Rh _m	0	0	50	90	0	20	80	140	0	30	70	100
	S	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0	30	30
	S _m	0	0	0	30	0	0	30	90	0	10	50	80
4. nap	G	530	680	970	1280	70	130	240	600	0	100	150	220
	G _m	600	720	1050	1360	70	150	280	610	30	120	160	230
	Rh	0	0	0	60	50	80	120	200	50	110	130	160
	Rh _m	0	0	20	80	60	100	140	230	60	130	150	180
	S	0	0	0	30	10	120	150	170	0	0	0	40
	S _m	0	0	10	40	10	100	160	180	0	0	10	60
2. nap	G	0	50	100	180	30	120	180	220	0	0	0	60
	G _m	30	50	150	200	40	130	170	200	0	0	20	70
	Rh	0	0	80	160	0	70	90	140	0	30	80	200
	Rh _m	0	20	100	150	30	60	100	120	10	30	90	180
	S	0	0	0	60	10	50	110	160	0	0	0	10
	S _m	0	0	0	50	20	70	100	140	0	0	0	10
Kezdeti csiraszáma:						840/ul				630/ul			

24. táblázat: *Trichoderma hamatum* 23-35/13. 34. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

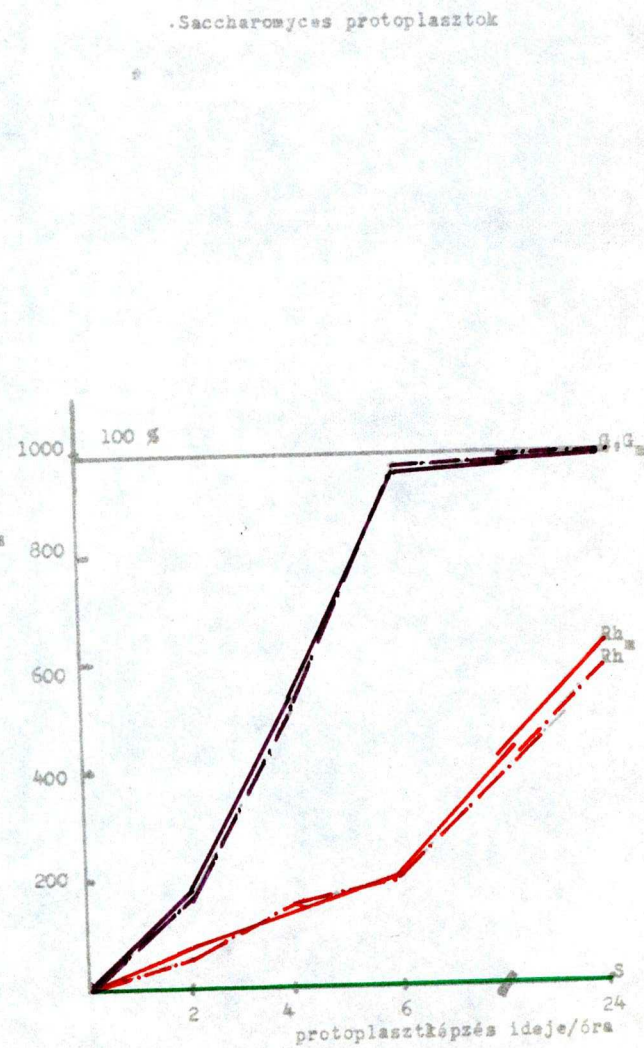
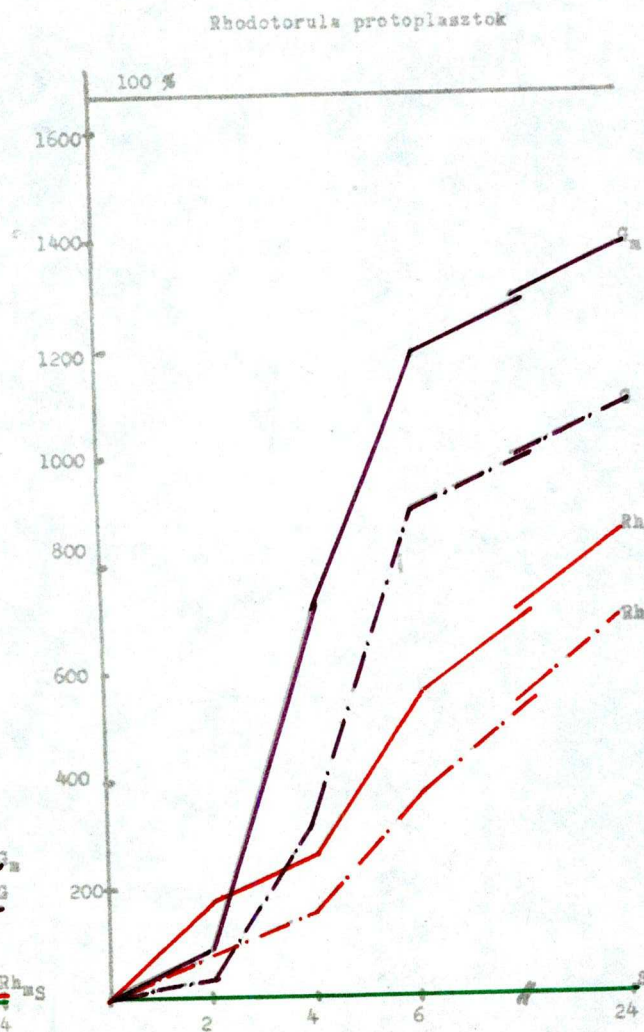
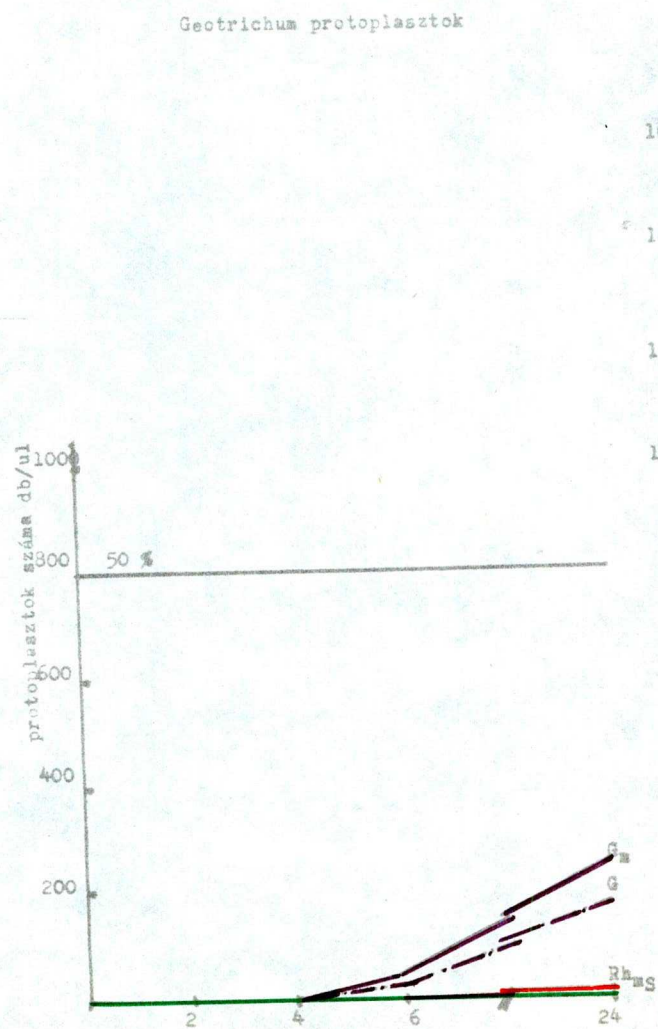
21. grafikon: *Trichoderma hamatum* 23-35/13. 34. törzzsel kapcsolatos vizsgálati eredmények.



Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete ma	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	o	3o	18o	3o	32o	9oo	11oo	17o	53o	97o	98o
	G _m	o	o	4o	26o	9o	71o	119o	139o	18o	54o	96o	99o
	Rh	o	o	o	o	7o	16o	38o	71o	7o	16o	2oo	6oo
	Rh _m	o	o	o	1o	18o	27o	56o	86o	8o	15o	21o	64o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4. nap	G	o	o	2o	46o	9o	47o	51o	83o	9o	3oo	48o	61o
	G _m	o	2o	5o	55o	17o	55o	6oo	96o	11o	36o	5oo	63o
	Rh	o	o	o	o	16o	29o	43o	57o	5o	24o	34o	36o
	Rh _m	o	o	o	o	17o	38o	51o	66o	6o	27o	33o	36o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2. nap	G	o	o	5o	5oo	o	3o	19o	58o	2o	37	46o	57o
	G _m	o	3o	8o	58o	4o	5o	32o	78o	4o	39o	47o	58o
	Rh	o	o	o	o	o	o	1o	6o	o	28o	34o	5oo
	Rh _m	o	o	o	o	2o	2o	4o	9o	1o	32o	35o	54o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Kezdeti csíreszáma:						1675/ul				98o/ul			

25. táblázat: *Trichoderma hamatum* 23-32/1. 37. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

22. grafikon: *Trichoderma hamatum* 23-32/1. 37. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények



Fermentlé- kora	proto- plasztok fer- mentlé- eredete ma	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Kezdeti csíraszám:						520/u1				450/u1			

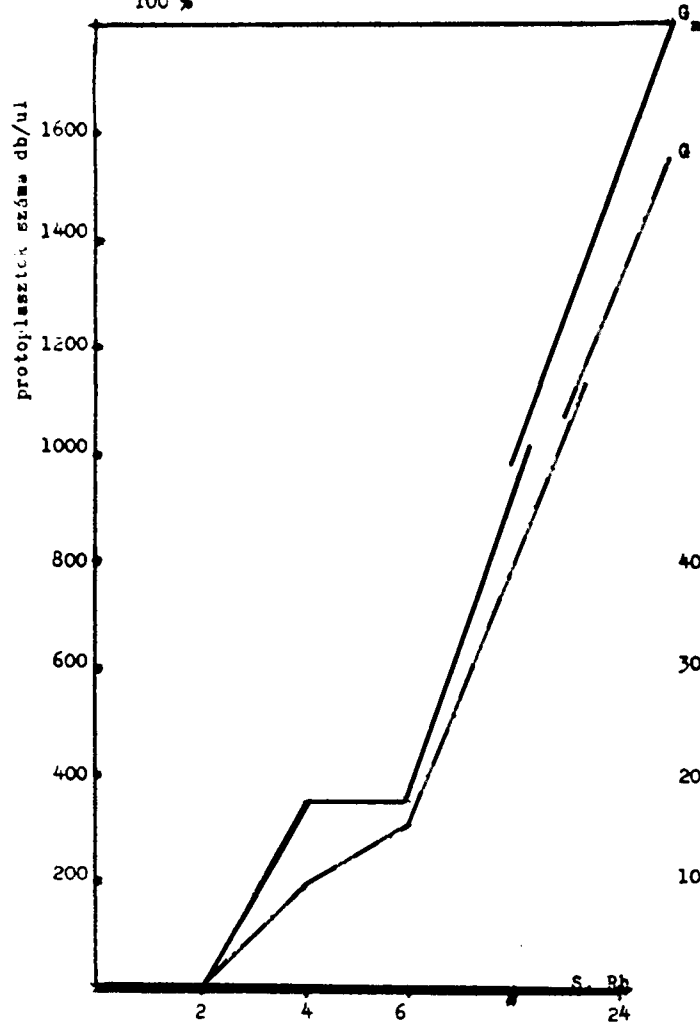
26. táblázat: *Trichoderma hamatum* 23-38/46. törzssel kapcsolatos vizsgál-
lati eredmények

Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	24o	32o	6oo	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	36o	36o	138o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4. nap	G	o	2oo	32o	156o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	24o	36o	182o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	3o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Kezdeti csiraszáma:					64o/ul				53o/ul				

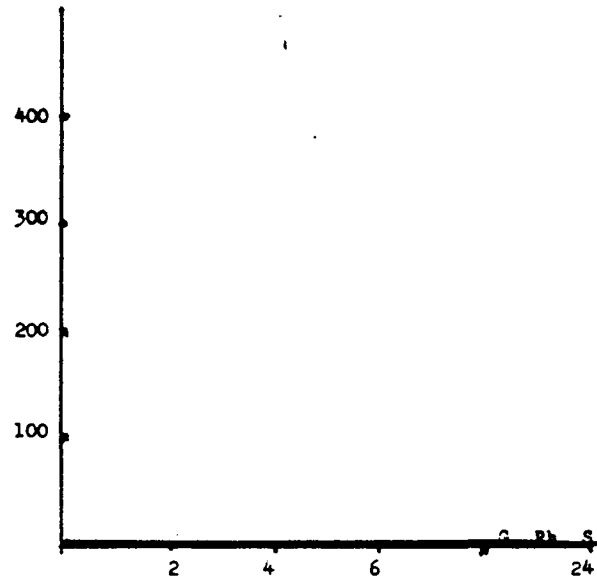
27. táblázat: *Trichoderma hamatum* 23-33/6. 5o. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények

23. grafikon: *Trichoderma hamatum* 23-33/6. 5o. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények

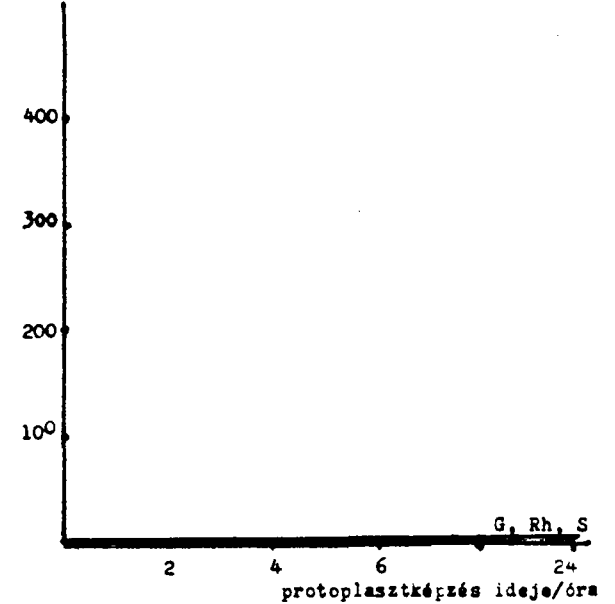
Geotrichum protoplasztok
100 %



Rhodotorula protoplasztok



Saccharomyces protoplasztok

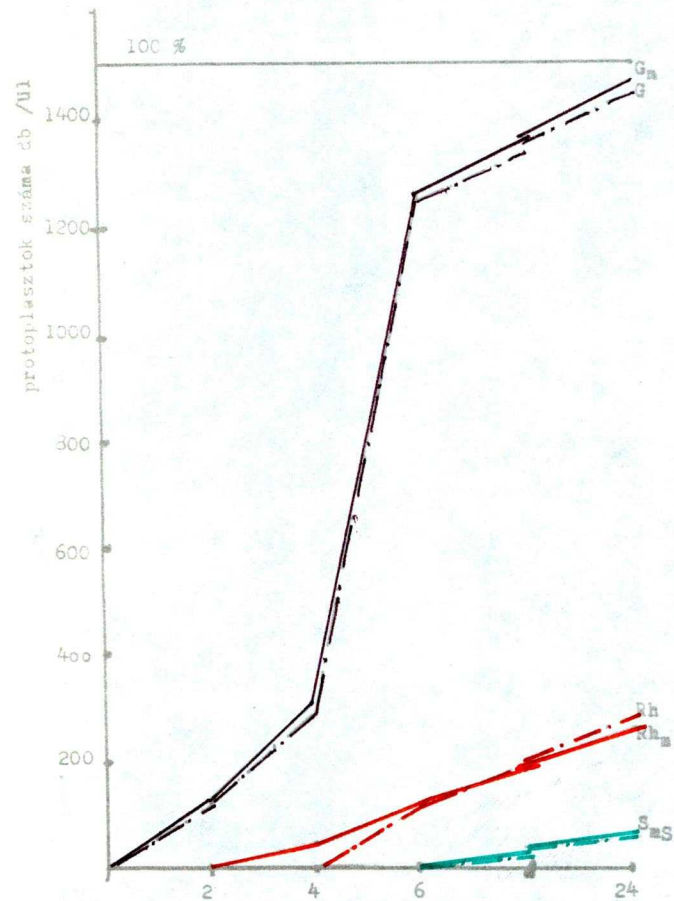


Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	0	60	240	360	0	0	0	280	0	0	0	150
	G _m	10	80	260	380	0	0	70	290	0	0	60	160
	Rh	0	0	110	280	0	0	0	0	0	0	30	160
	Rh _m	0	30	120	290	0	0	0	0	0	20	70	170
	S	0	0	0	80	0	0	0	80	0	30	60	160
	S _m	0	0	20	100	0	0	0	80	0	20	80	240
4. nap	G	120	300	1250	1440	0	0	0	80	0	50	90	200
	G _m	130	320	1270	1460	0	0	0	100	0	80	100	220
	Rh	0	0	120	280	0	0	0	0	0	10	30	140
	Rh _m	0	60	140	270	0	0	0	0	0	30	50	160
	S	0	0	0	60	0	0	0	0	0	10	50	120
	S _m	0	0	10	70	0	0	0	0	0	10	60	140
2. nap	G	40	260	580	1320	0	0	0	80	0	30	70	100
	G _m	60	270	480	1290	0	0	0	90	10	40	50	120
	Rh	0	0	240	560	0	0	0	0	0	10	30	140
	Rh _m	0	0	320	580	0	0	0	0	0	30	50	160
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	60	90
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	40	120
Kezdeti csíraszám:						570/ul				768/ul			

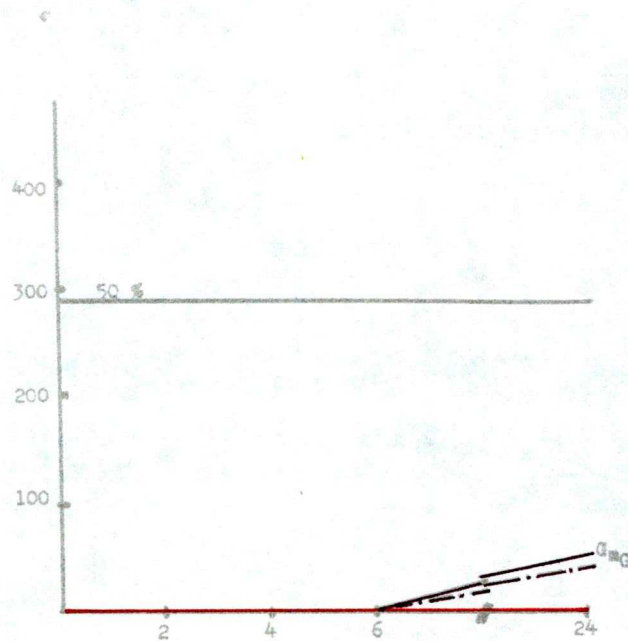
28. táblázat: *Trichoderma hamatum* 55-38/53. törzzsel kapcsolatos vizsgálatok eredménye

24. grafikon: *Trichoderma hamatum* 55-38/53. törzzsel kapcsolatos vizsgálati eredmények

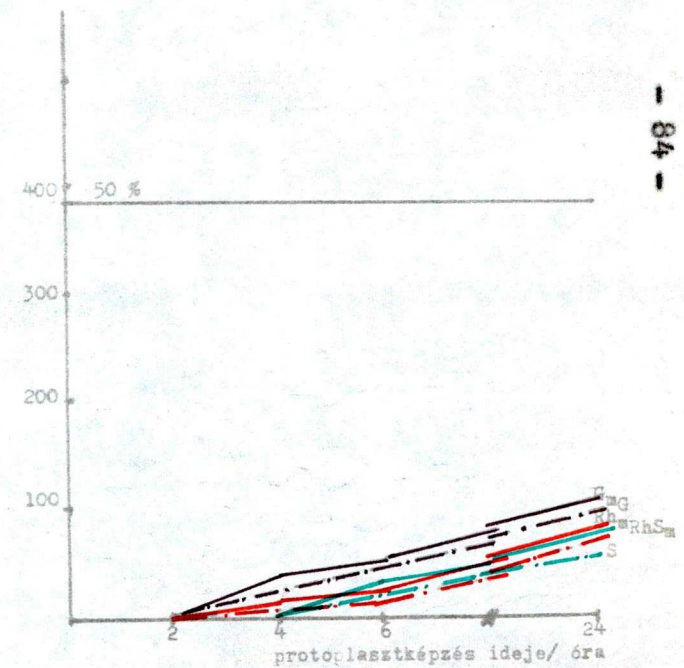
Geotrichum protoplasztok



Rhodotorula protoplasztok



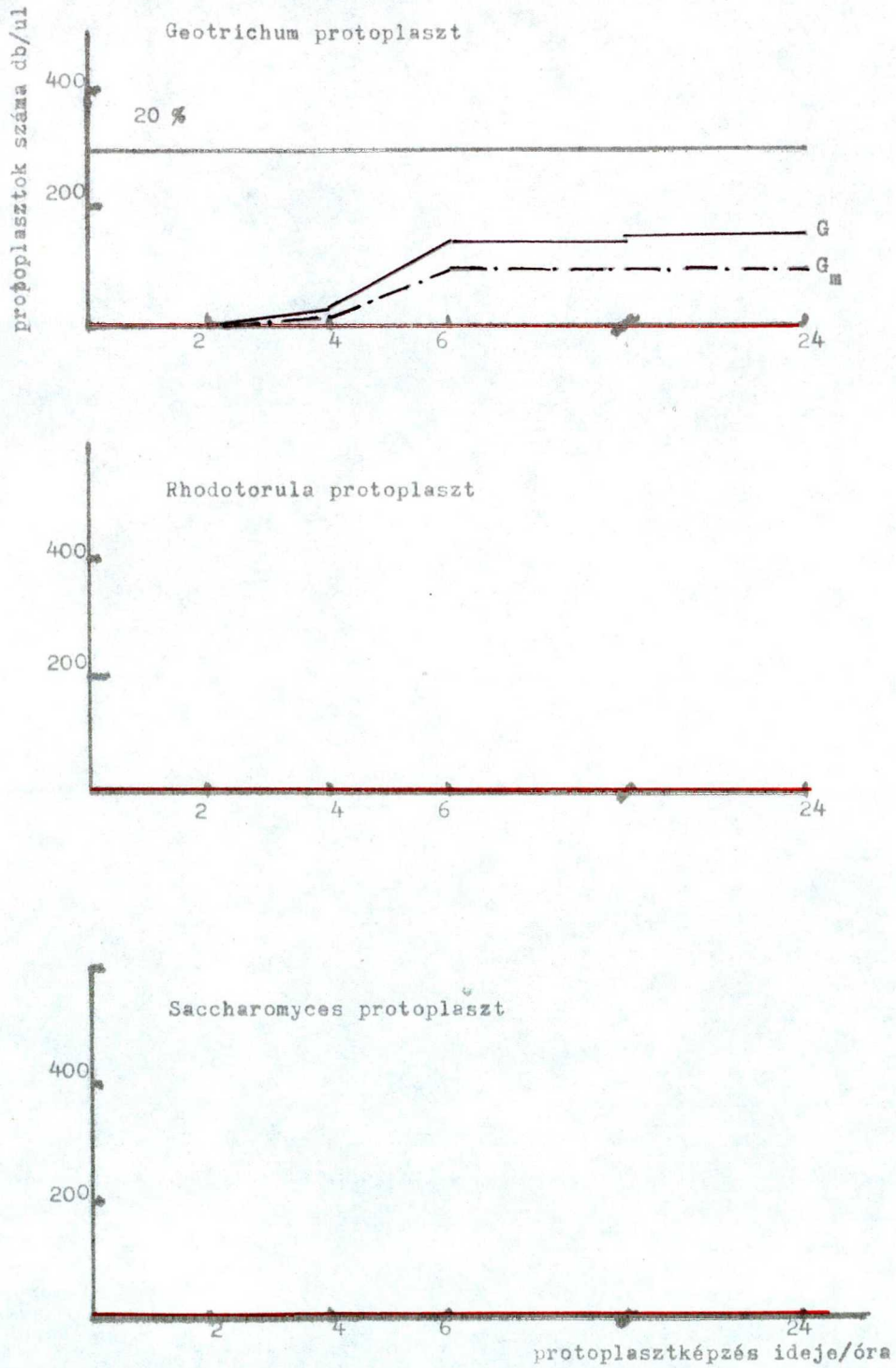
Saccharomyces protoplasztok



Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé eradete szá- ma	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	2o	1oo	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	3o	14o	16o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4. nap	G	o	1o	2o	2o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	4o	3o	4o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2. nap	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	G _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Kezdeti csiraszáma:						64o/ul				72o/ul			

29. táblázat: *Trichoderma harzianum* 23-38. 17. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

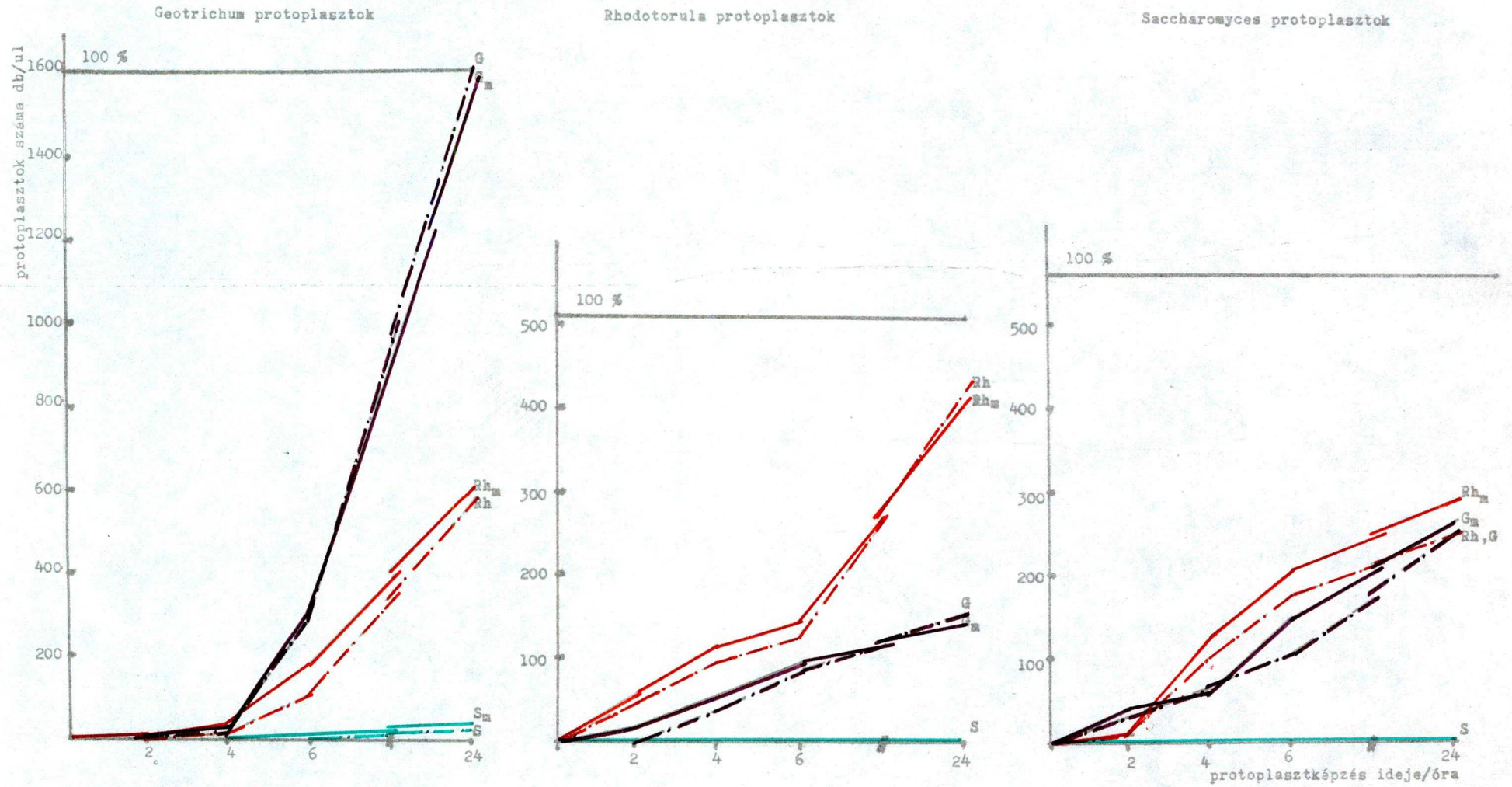
25. grafikon: *Trichoderma harzianum* 23- 38. 17 törzsszel kapcsolatos
vizsgálati eredmények



Fermentlé kora	proto- plasztok- fermentlé szá- ma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	3o	7o	15o	26o	1o	3o	10o	18o	o	3o	6o	9o
	G _m	4o	9o	17o	28o	3o	3o	9o	20o	2o	5o	8o	12o
	Rh	2o	7o	13o	36o	4o	15o	18o	34o	o	3o	7o	15o
	Rh _m	3o	7o	15o	34o	4o	18o	21o	35o	1o	6o	9o	18o
	S	1o	3o	5o	7o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	2o	3o	6o	7o	o	o	o	o	o	o	o	o
4. nap	G	o	2o	29o	159o	o	4o	9o	16o	3o	7o	11o	25o
	G _m	1o	3o	30o	158o	2o	6o	10o	15o	4o	6o	15o	27o
	Rh	o	2o	7o	59o	5o	10o	13o	42o	1o	10o	18o	25o
	Rh _m	o	3o	9o	60o	6o	12o	14o	41o	3o	13o	21o	29o
	S	o	o	1o	3o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	2o	4o	o	o	o	o	o	o	o	o
2. nap	G	o	1o	5o	22o	o	4o	11o	25o	o	3o	10o	19o
	G _m	o	1o	6o	23o	1o	5o	13o	26o	o	5o	15o	21o
	Rh	o	1o	3o	39o	7o	14o	25o	34o	o	7o	14o	20o
	Rh _m	1o	2o	4o	40o	8o	16o	27o	33o	3o	8o	16o	23o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Kezdeti csiraszáma:						51o/ul				56o/ul			

3o. táblázat: *Trichoderma harzianum* 23-33/6. 23. törzsszel kapcsolatos
vizsgálati eredmények

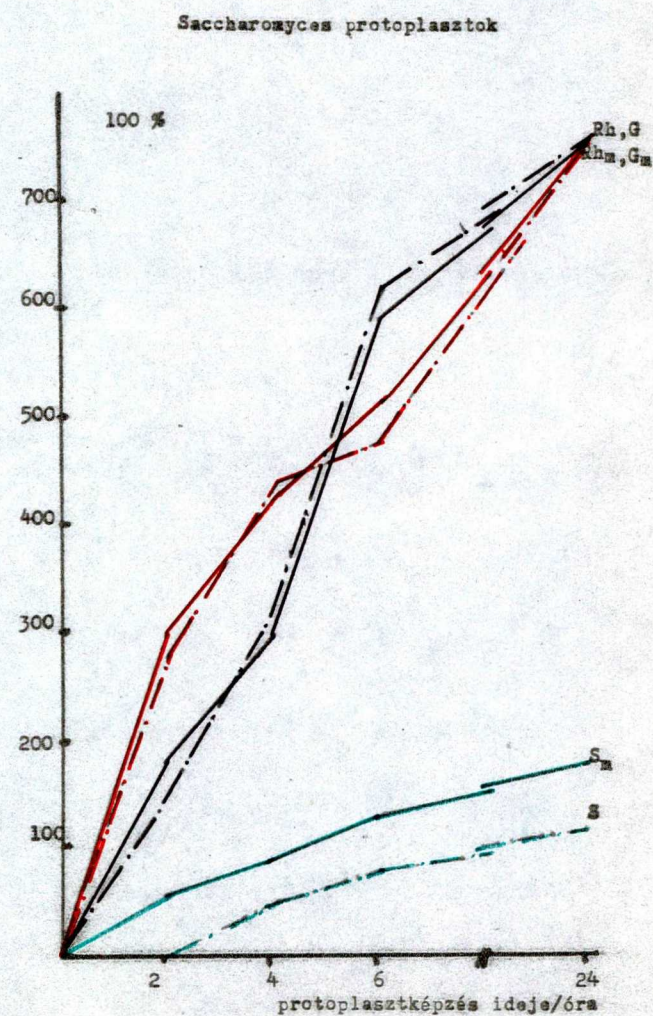
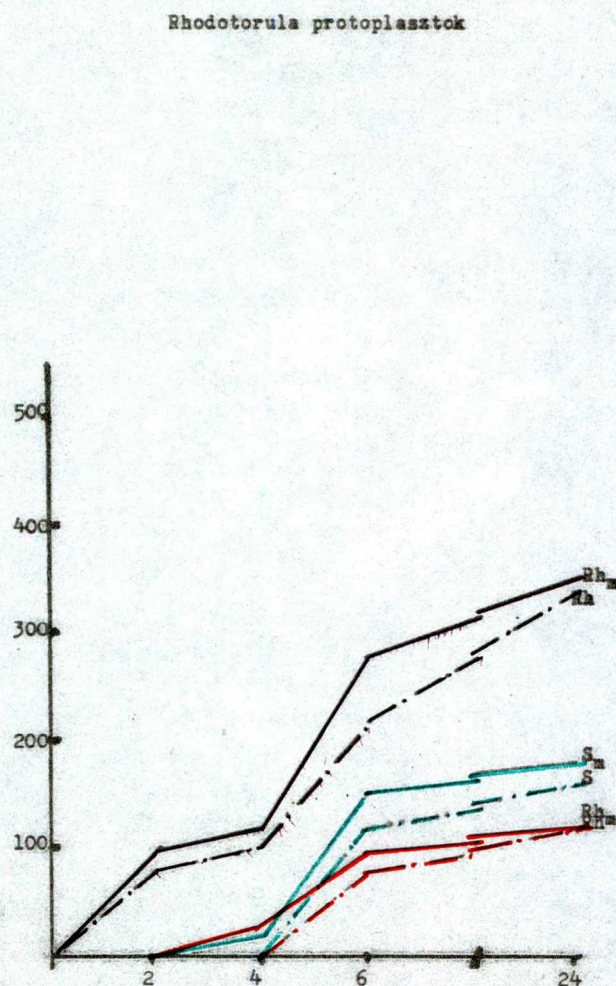
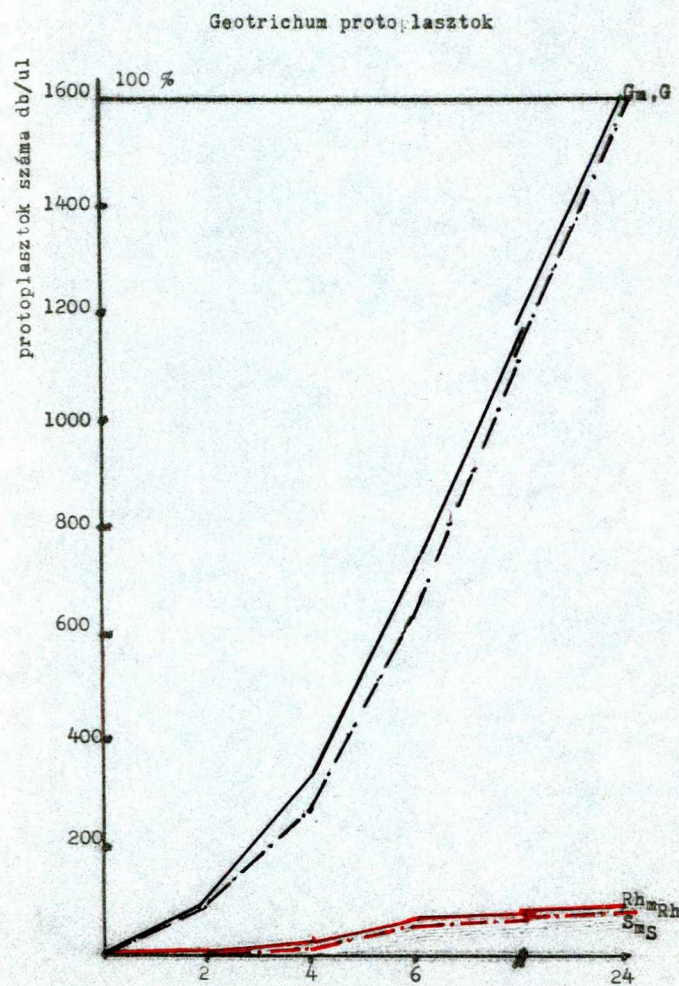
26. grafikon: *Trichoderma harzianum* 23-33/6.23. törzzsel kapcsolatos vizsgálati eredmények



Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	0	30	80	1100	0	0	40	280	150	320	620	760
	G _m	10	80	360	1190	0	20	60	300	180	300	590	760
	Rh	20	50	80	160	0	120	140	300	380	440	480	760
	Rh _m	30	60	90	150	10	130	130	310	300	430	410	760
	S	0	0	30	30	0	0	0	40	0	50	80	120
	S _m	0	10	40	60	0	10	30	50	60	90	130	180
4. nap	G	100	280	640	1580	80	100	220	340	120	200	320	460
	G _m	100	340	720	1590	100	120	280	350	150	230	370	480
	Rh	0	20	60	90	0	0	80	120	100	120	260	300
	Rh _m	10	30	80	100	0	30	100	120	130	150	240	310
	S	0	0	40	60	0	0	120	160	200	250	440	440
	S _m	0	10	50	70	0	20	150	180	200	240	370	430
2. nap	G	90	160	740	1400	0	70	220	380	90	170	360	420
	G _m	120	180	900	1410	30	100	210	370	110	190	350	430
	Rh	0	0	60	120	0	0	0	160	0	0	0	80
	Rh _m	0	10	80	130	0	20	50	150	10	20	70	90
	S	0	0	80	100	1	1	60	160	0	0	0	280
	S _m	0	30	100	120	0	10	70	160	10	30	90	270
Kezdeti csíraszám:						780/ul				760/ul			

31. táblázat: *Trichoderma harzianum* 23-38/65. törzssel kapcsolatos vizsgál-
lati eredmények

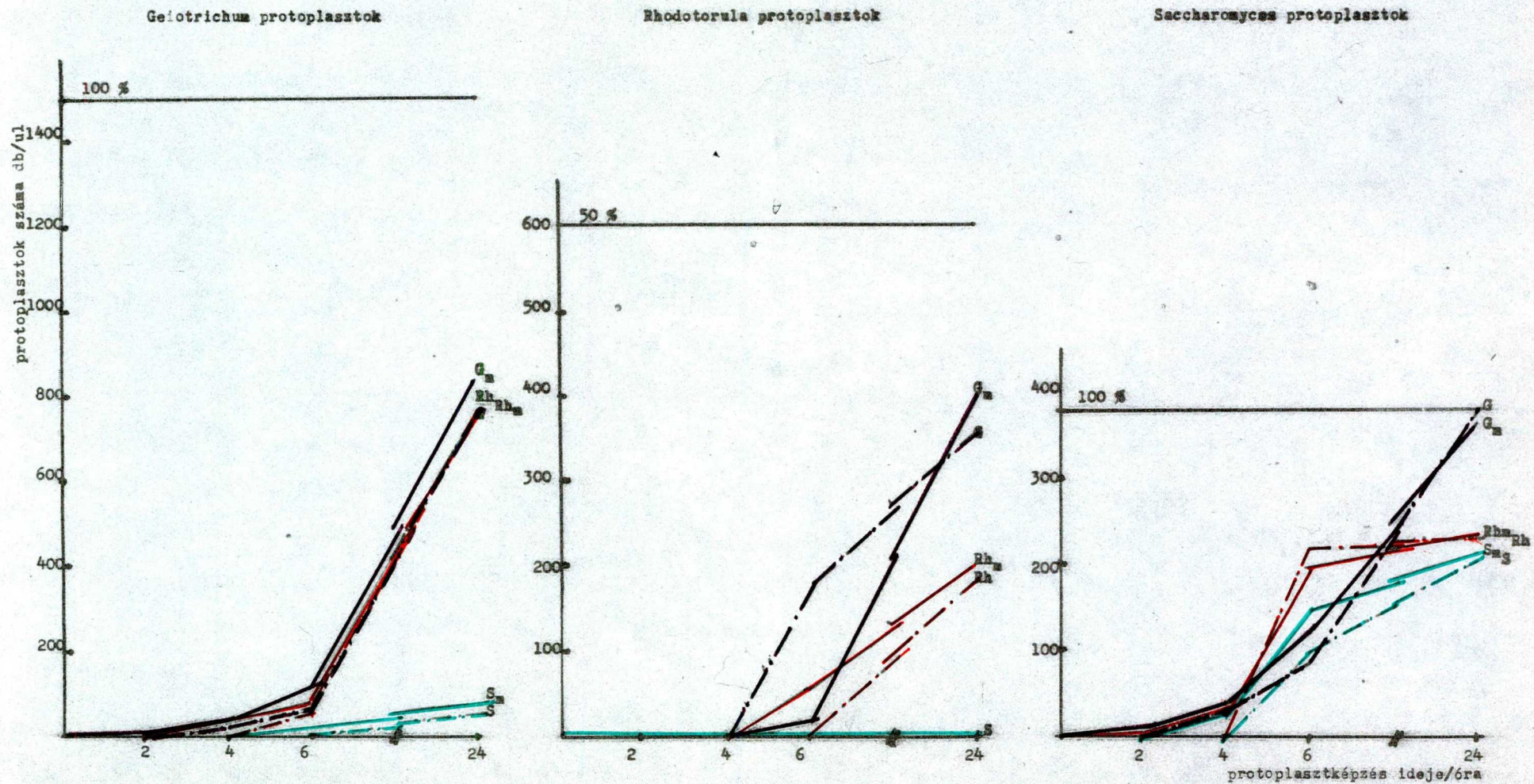
27. grafikon: *Trichoderma harzianum* 23-38/65. 4. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények



Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé eradete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	o	6o	76o	o	o	18o	36o	o	3o	9o	38o
	G _m	o	4o	12o	84o	o	o	2o	4o	1o	4o	12o	37o
	Rh	o	3o	8o	78o	o	o	o	18o	o	o	22o	23o
	Rh _m	1o	5o	9o	77o	o	o	6o	2o	o	3o	2o	23o
	S	o	o	1o	6o	o	o	o	o	o	o	1o	2o
	S _m	o	o	3o	9o	o	o	o	o	o	3o	15o	21o
4. nap	G	o	o	5o	6o	o	o	o	6o	o	o	2o	22o
	G _m	o	2o	6o	1o	o	o	1o	7o	9	1o	15o	2o
	Rh	o	o	4o	6o	o	o	2o	7o	o	o	1o	34o
	Rh _m	o	1o	5o	7o	o	o	3o	7o	1o	3o	12o	3o
	S	o	o	o	o	o	o	o	2o	o	o	6o	2o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	3o	o	1o	7o	18o
2. nap	G	o	o	o	o	o	o	2o	2o	o	o	2o	2o
	G _m	o	o	3o	8o	o	o	2o	3o	o	o	2o	18o
	Rh	o	o	o	3o	o	o	o	o	o	o	14o	16o
	Rh _m	o	o	2o	1o	o	o	o	o	o	1o	15o	17o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	6o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	2o	7o
Kezdeti csiraszáma:						12o0/ul				38o/ul			

32. táblázat: *Trichoderma konigii* komplex 23-35/13. 19. törzzsel kapcsolatos vizsgálati eredmények

28. grafikon: *Trichoderma koningii* komplex 23-35/13. 19. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

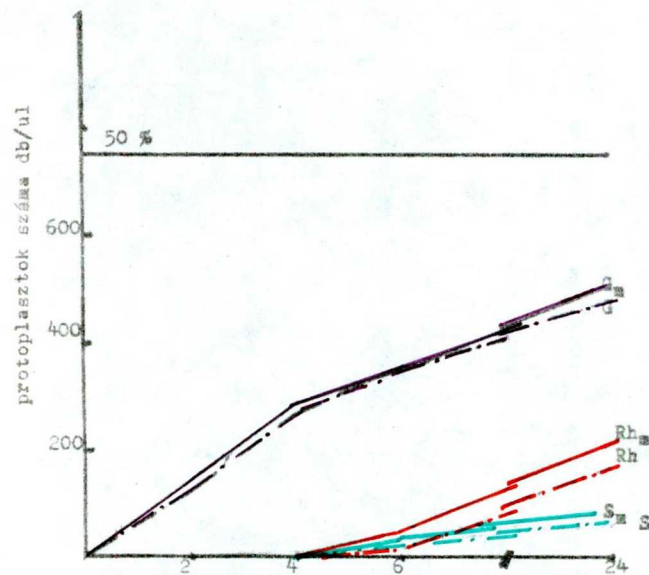


Fermentálé kora	proto- mentis eredete	Protoklasztálás ideje / óra											
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
6. nap	G	130	270	360	480	0	0	0	160	0	0	140	160
	G _m	150	290	350	500	0	0	50	180	0	30	160	200
	Rh	0	0	0	180	0	0	20	360	0	0	0	140
	Rh _m	0	0	50	210	0	30	50	380	0	20	60	150
	S	0	0	0	40	0	0	0	200	0	0	0	80
4. nap	S _m	0	0	10	50	0	0	30	220	0	0	10	90
	G	0	110	130	240	0	0	280	480	0	0	0	120
	G _m	30	130	150	260	0	50	310	460	0	0	90	130
	Rh	0	0	20	20	0	0	400	540	0	0	0	0
	Rh _m	0	0	10	30	0	140	420	520	0	0	0	0
2. nap	S	0	0	40	60	0	0	80	160	0	0	0	60
	S _m	0	10	50	80	0	40	100	170	0	20	30	80
	G	0	0	0	30	0	0	0	100	0	0	0	0
	G _m	0	0	10	30	0	0	30	110	0	0	0	0
	Rh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kézeteti csíraszám:		1200/nl				840/nl							

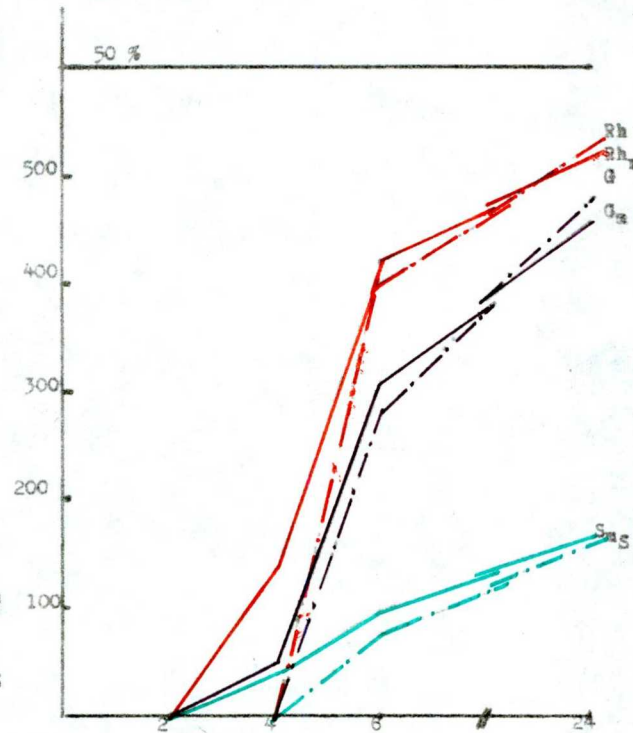
33. táblázat: Trichoderma koningii komplex 23-35/13. 20. törzssel kapcsolatosság vizsgálata eredmények

29. grafikon: Trichoderma koningii komplex 23-35/13. 20. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények

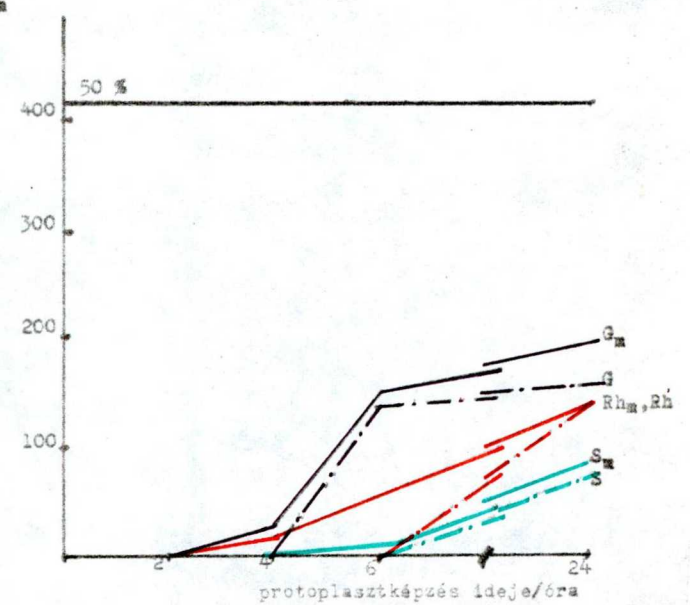
Geotrichum protoplasztok



Rhodotorula protoplasztok



Saccharomyces protoplasztok

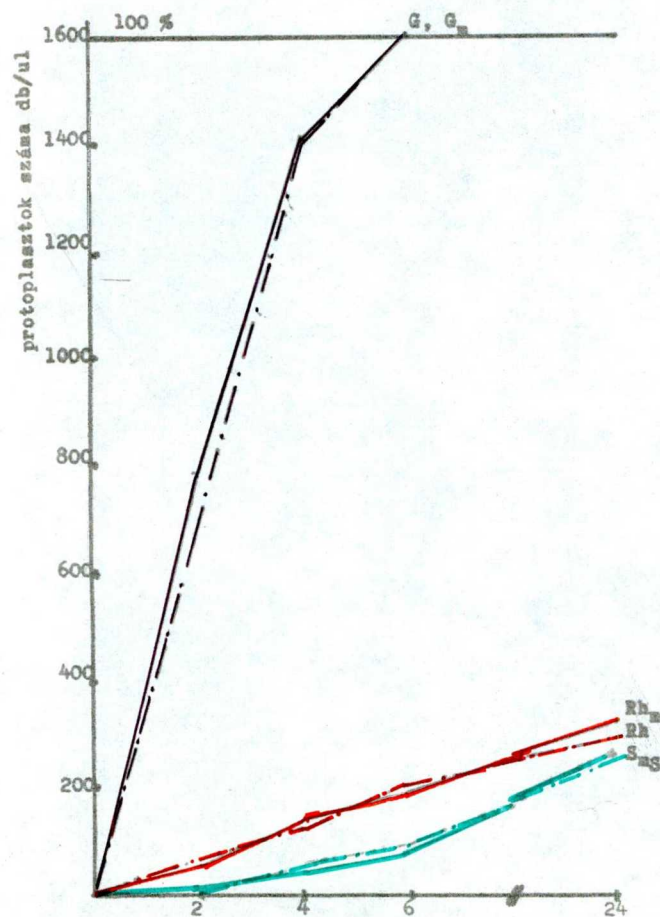


Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	67o	14o	159o	159o	o	o	11o	18o	24o	28o	65o	7oo
	G _m	78o	139o	159o	159o	o	o	13o	2oo	26o	3oo	61o	74o
	Rh	7o	13o	21o	3oo	o	1oo	32o	4oo	9o	31o	5oo	67o
	Rh _m	6o	14o	2oo	33o	o	7o	23o	44o	7o	29o	54o	64o
	S	1o	6o	1oo	17o	o	o	o	o	5o	19o	3oo	3oo
	S _m	2o	5o	9o	18o	o	o	o	o	11o	17o	27o	32o
4. nap	G	2oo	48o	62o	69o	o	o	o	o	13o	2oo	35o	52o
	G _m	21o	43o	61o	68o	o	o	o	o	15o	27o	46o	64o
	Rh	o	o	o	1oo	o	o	6o	15o	4o	9o	1oo	21o
	Rh _m	o	o	4o	12o	o	o	7o	2oo	3o	5o	11o	2oo
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	8	o	o	o	o	o	o	o	o
2. nap	G	o	5o	19o	2oo	o	o	o	o	o	o	o	5o
	G _m	o	3o	17o	24o	o	o	o	o	o	3o	6o	1oo
	Rh	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Rh _m	o	o	o	4o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	S _m	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Kezdeti csíreszáma:						64o/ul				74o/ul			

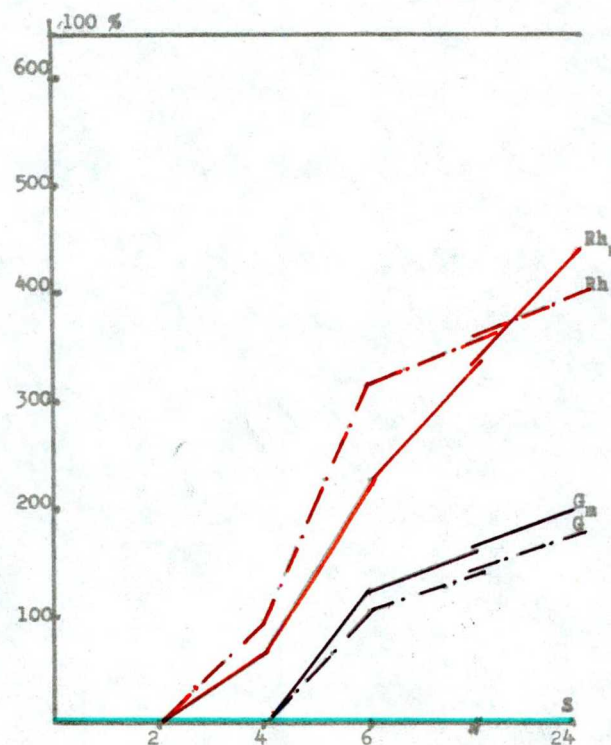
34. táblázat: Trichoderma koningii komplex 23-35/13. 21. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

30. grafikon: *Trichoderma koningii* komplex 23-35/13. 21. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

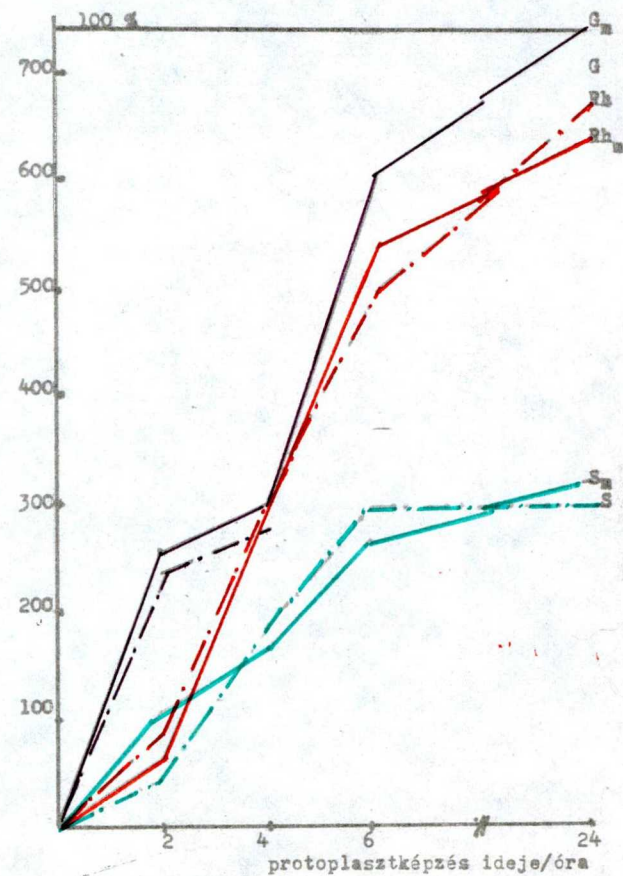
Geotrichum protoplasztok



Rhodotorula protoplasztok



Saccharomyces protoplasztok

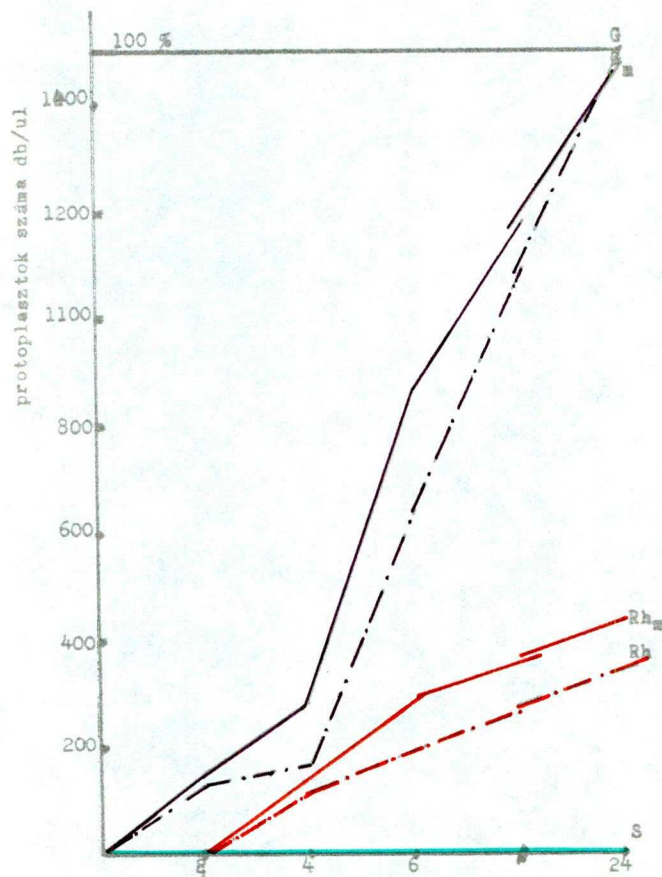


Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	10	220	300	640	0	30	50	70	0	0	30	180
	G _m	50	190	350	700	0	20	70	100	0	50	110	230
	Rh	30	200	250	220	0	90	150	400	0	0	0	0
	Rh _m	30	210	270	280	0	100	130	410	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. nap	G	90	320	620	1200	10	60	110	250	0	30	90	170
	G _m	80	280	540	1140	0	70	90	270	30	50	100	160
	Rh	120	210	290	380	30	170	200	300	0	0	0	0
	Rh _m	130	150	270	450	0	220	230	600	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. nap	G	140	170	640	1500	0	10	30	70	10	170	200	300
	G _m	160	290	870	1470	0	40	50	90	30	150	260	310
	Rh	0	120	200	350	60	180	270	490	0	0	0	0
	Rh _m	1	150	300	340	0	300	310	670	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kezdeti csiraszáma:						1240/ul				780/ul			

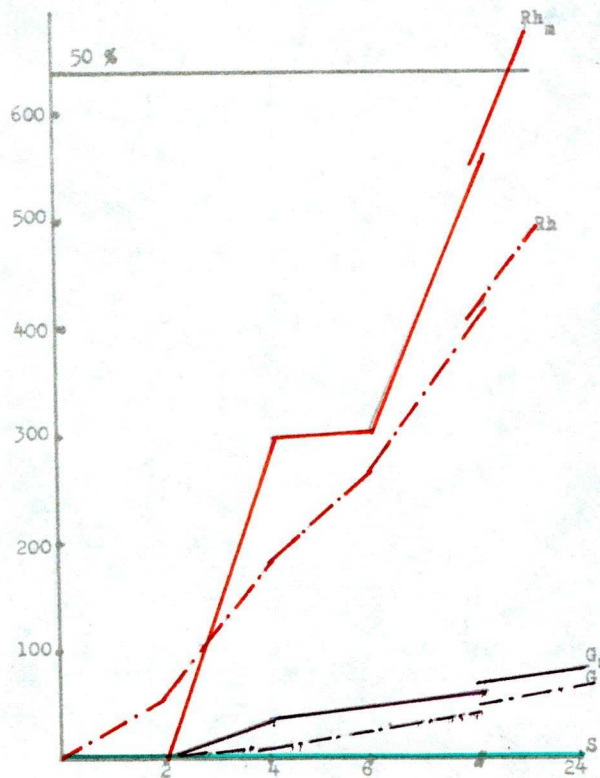
35. táblázat: Trichoderma koningii komplex 23-33/6. 24. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

31. grafikon: *Trichoderma koningii* komplex 23-33/6. 24. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények

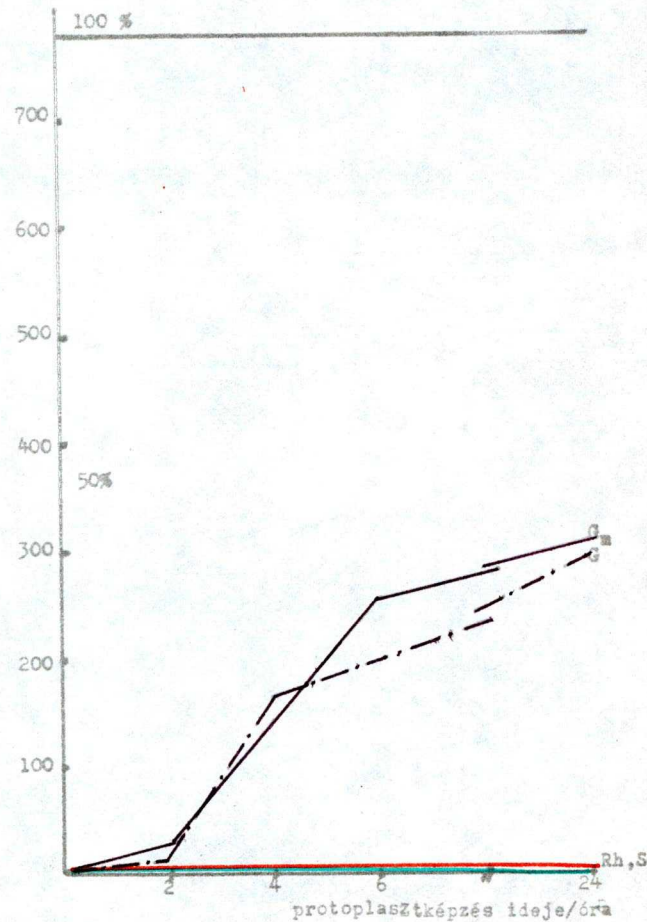
Geotrichum protoplasztok



Rhodotorula protoplasztok



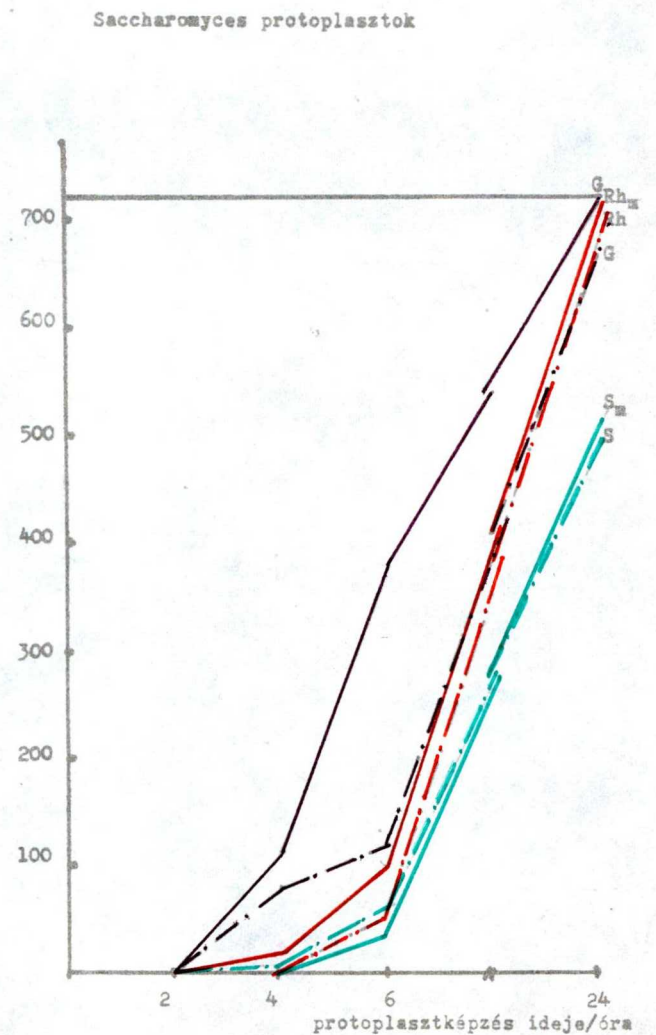
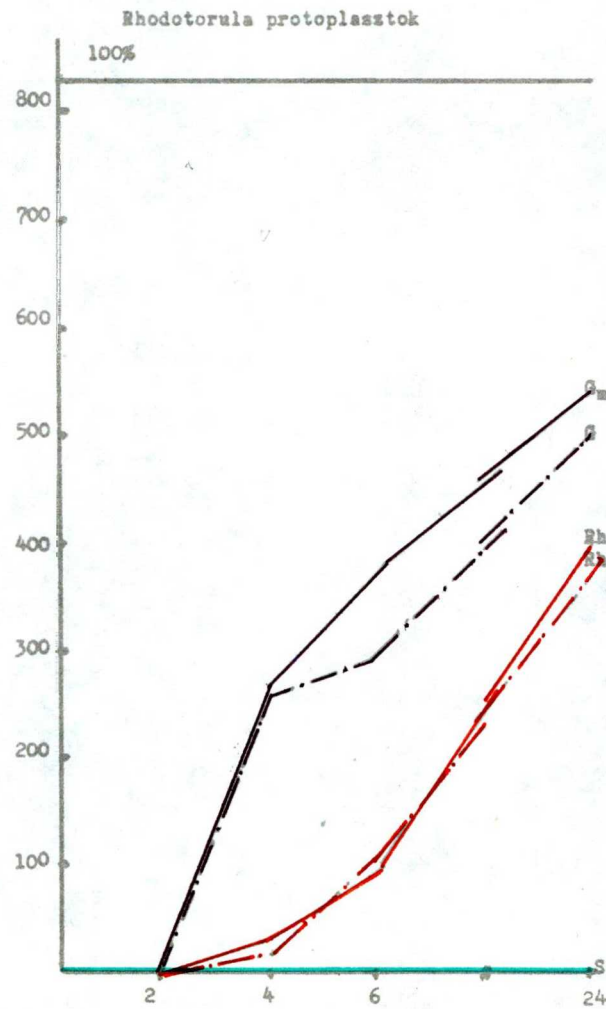
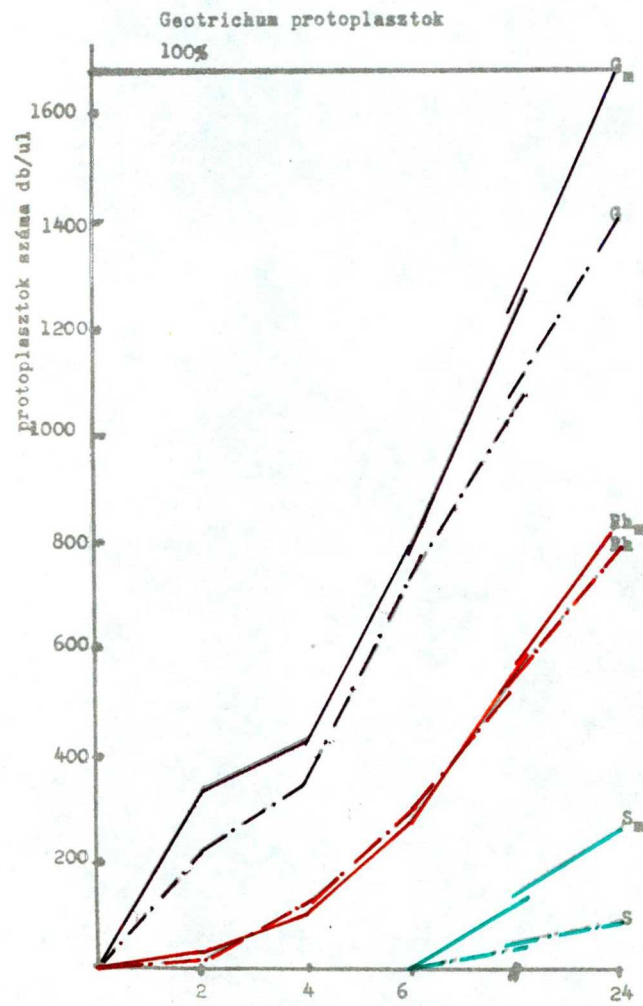
Saccharomyces protoplasztok



Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	o	13o	28o	8oo	o	13o	3oo	34o	o	11o	27o	3oo
	G _m	o	14o	28o	82o	o	18o	32o	38o	o	14o	28o	32o
	Rh	o	5o	12o	6oo	o	o	3o	16o	o	o	5o	6oo
	Rh _m	o	7o	18o	58o	o	o	o	22o	o	3o	8o	7oo
	S	o	o	o	2o	o	o	5o	19o	o	3o	1oo	27o
	S _m	o	o	o	6o	o	o	o	3oo	o	5o	12o	28o
4. nap	G	23o	35o	73o	14oo	o	26o	3oo	5oo	o	8o	12o	67o
	G _m	34o	43o	79o	168o	o	27o	38o	54o	o	12o	38o	72o
	Rh	2o	13o	3oo	8oo	o	2o	11o	37o	o	o	5o	69o
	Rh _m	3o	12o	29o	84o	o	3o	1oo	4oo	o	2o	1oo	72o
	S	o	o	o	1oo	o	o	o	o	o	1o	6o	49o
	S _m	o	o	o	28o	o	o	o	o	o	o	4o	52o
2. nap	G	19o	29o	38o	12oo	o	o	o	19o	o	19o	28o	47o
	G _m	12o	28o	3oo	128o	o	o	2o	24o	o	24o	36o	42o
	Rh	o	3o	7o	11o	o	3o	7o	15o	3o	3oo	42o	52o
	Rh _m	o	5o	7o	12o	o	o	8o	16o	o	37o	42o	52o
	S	o	o	3o	5o	o	o	o	o	o	1oo	18o	25o
	S _m	3o	3o	6o	8o	o	o	o	o	o	13o	24o	32o
Kezdeti csíreszáma:						83o/ul				72o/ul			

36. táblázat: *Trichoderma koningii* komplex 23-33/6. 29. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

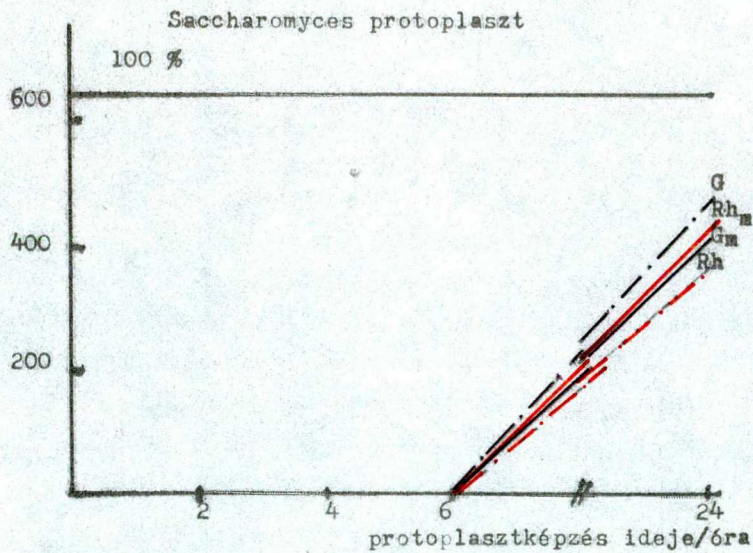
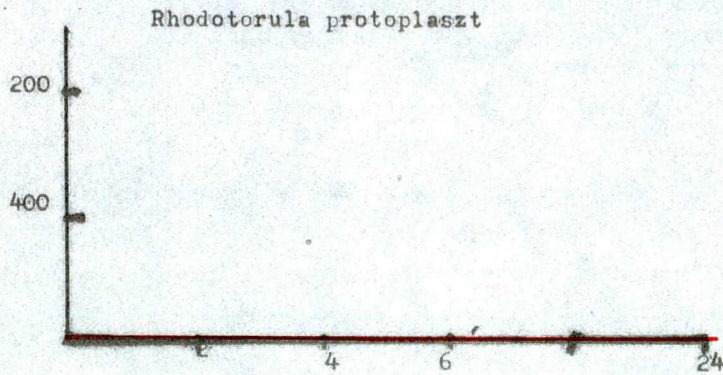
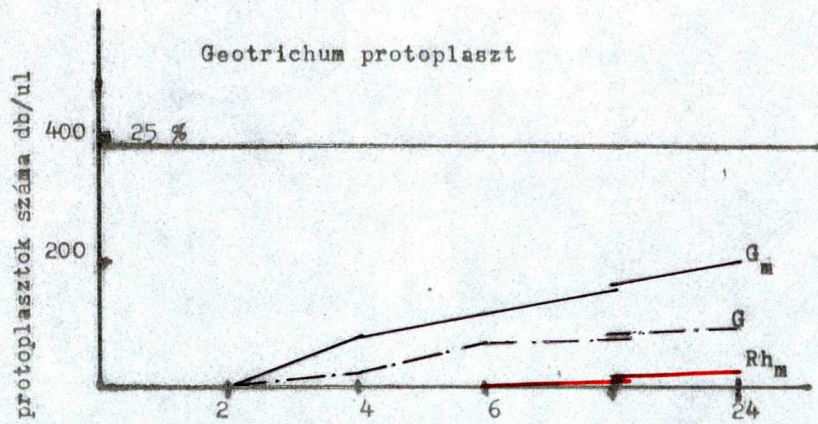
32. grafikon: *Trichoderma koningii* komplex 23-33/6. 29. törzzsel kapcsolatos vizsgálati eredmények



37. táblázat: Trichoderma koningi komplex 23-32/1. 36. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények

Fermentációs körök	Protokoll	Fermentációs idő / óra	Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
			2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
6. nap	Protokoll	20	70	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	460
	G _m	0	80	120	200	0	0	0	0	0	0	0	0	400
	Rh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	370
	Rh _m	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	410
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. nap	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	340
	G _m	0	20	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	420
	Rh	0	10	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	500
	Rh _m	0	0	20	50	0	0	0	0	0	0	0	0	530
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. nap	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	300
	G _m	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	380
	Rh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	310
	Rh _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400

33. grafikon: *Trichoderma koningii* komplex 23-32/1. 36. törzszel kapcsolatos vizsgálati eredmények



Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé szá- ma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	50	200	490	1300	70	260	370	460	30	100	270	800
	G _m	70	250	680	1500	0	380	420	480	20	20	380	840
	Rh	120	400	650	870	0	140	150	200	30	120	390	820
	Rh _m	150	500	720	920	0	160	200	220	20	50	280	840
	S	0	30	40	50	0	0	70	120	10	100	300	720
	S _m	0	60	70	70	0	0	90	160	30	70	240	780
4. nap	G	50	190	380	590	0	100	230	300	0	30	160	500
	G _m	100	210	470	680	0	190	300	320	20	70	300	600
	Rh	0	70	190	310	0	390	420	440	60	190	310	760
	Rh _m	0	90	240	360	0	440	460	280	0	20	270	800
	S	0	30	100	200	0	0	0	0	0	0	70	420
	S _m	0	70	150	300	0	0	0	80	0	20	190	500
2. nap	G	0	50	120	210	0	0	50	170	60	120	500	800
	G _m	30	120	240	350	0	10	90	220	0	100	340	840
	Rh	0	0	50	70	0	30	70	130	0	0	40	50
	Rh _m	0	30	70	120	0	80	100	200	0	0	80	100
	S	0	60	100	160	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	80	120	180	0	0	0	80	0	0	0	40
Kezdeti csíreszáma:						680/ul				840/ul			

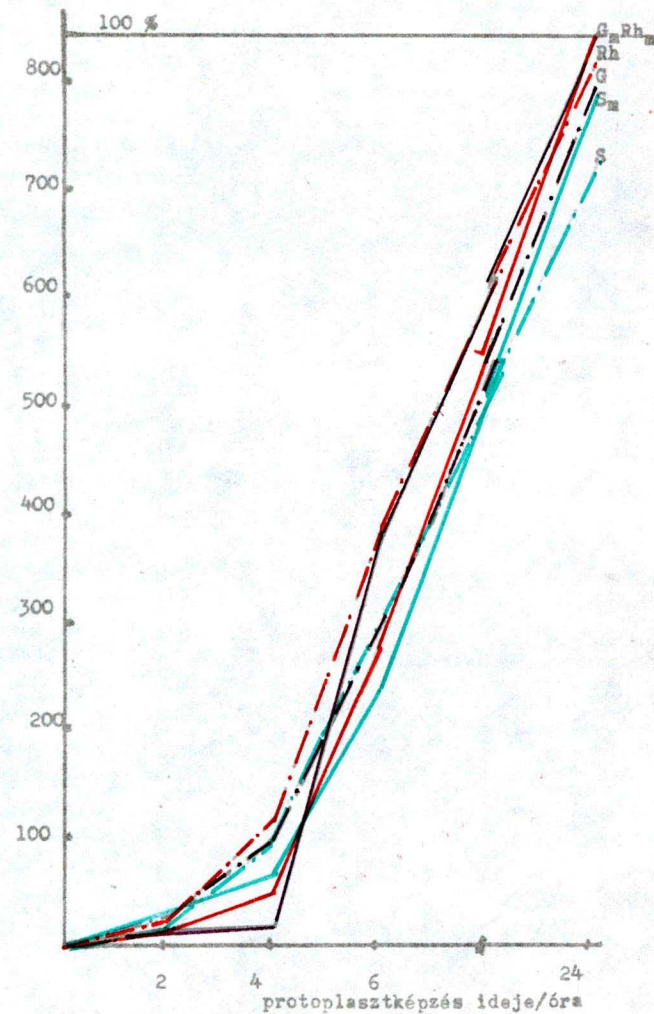
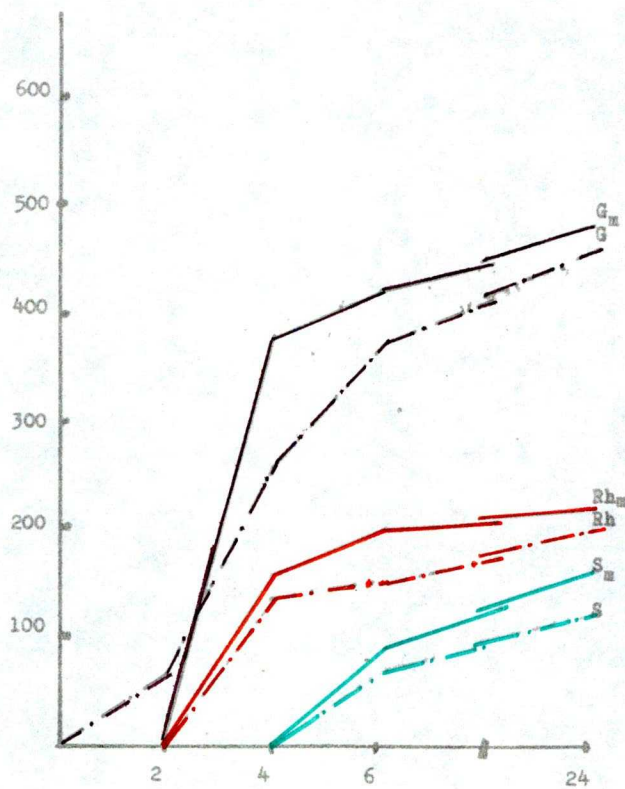
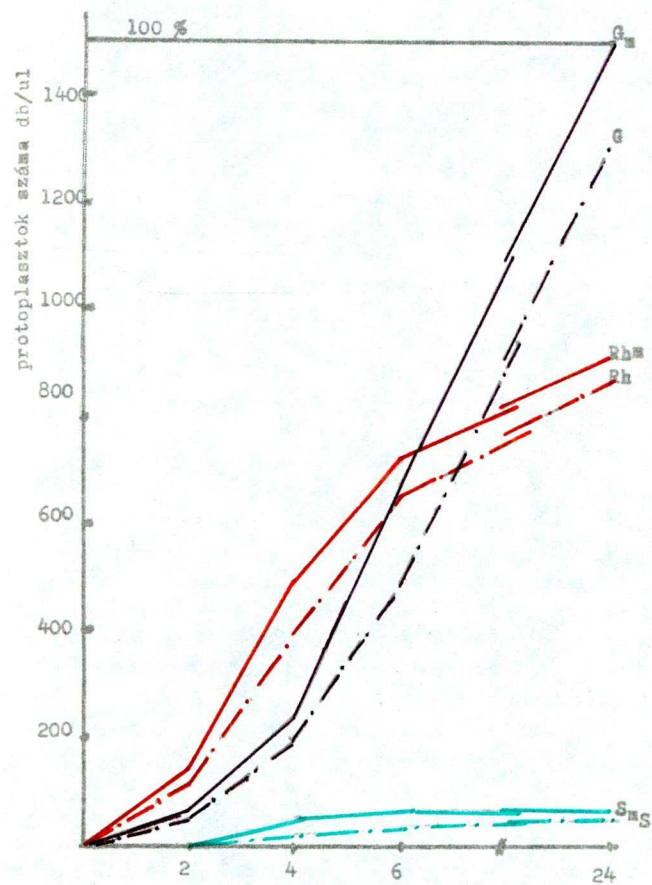
38. táblázat: Trichoderma komplex 23-32/1. 39. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

34. grafikon: *Trichoderma koningii* komplex 23-32/1- 39. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények

Geotrichum protoplasztok

Rhodotorula protoplasztok

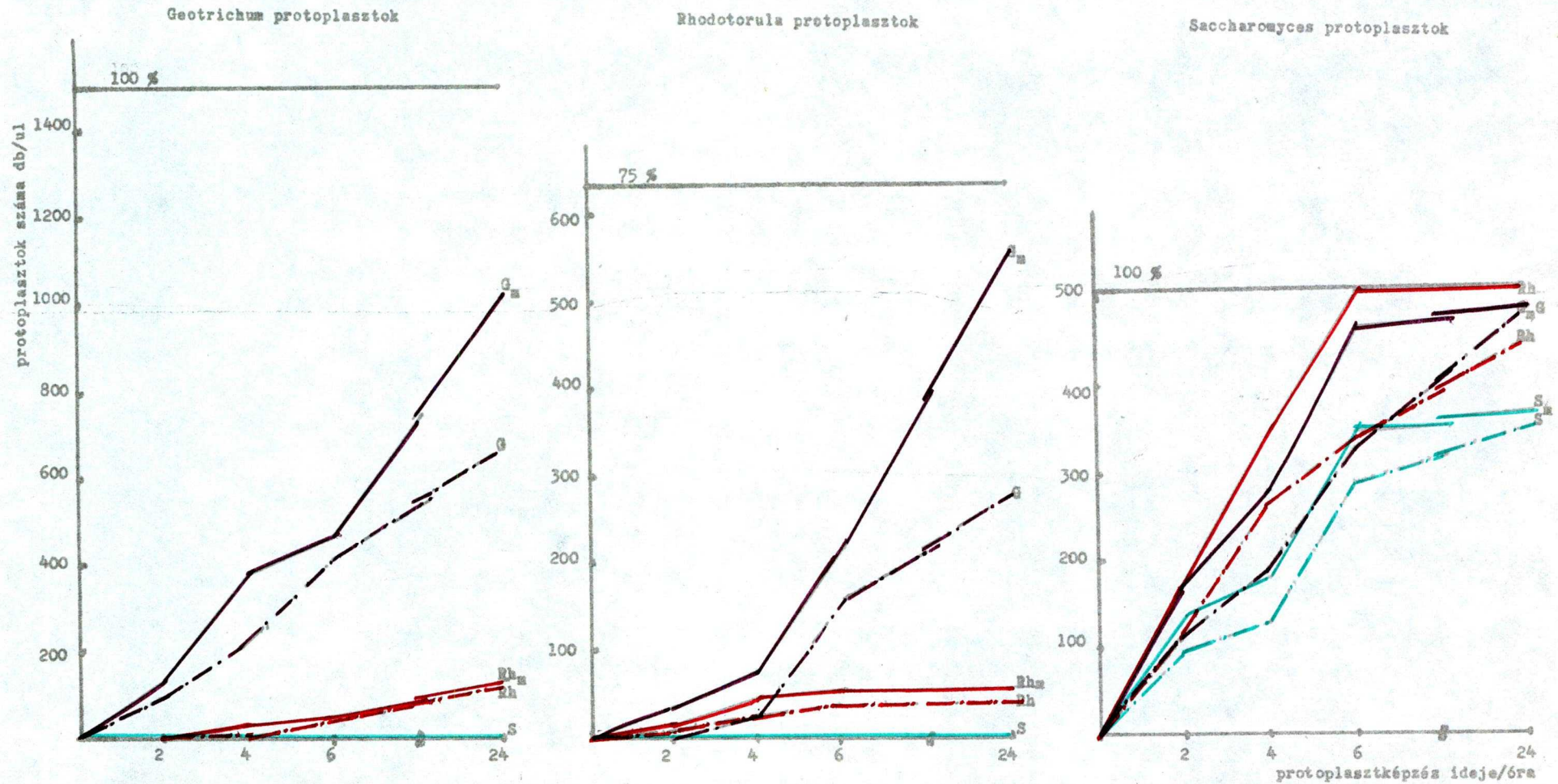
Saccharomyces protoplasztok



Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé eradete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	100	220	420	670	10	30	70	120	120	190	330	490
	G _m	140	380	460	1020	30	40	50	190	180	280	470	510
	Rh	0	10	40	120	0	30	40	40	120	270	380	450
	Rh _m	0	60	60	140	20	50	60	60	180	350	510	510
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	100	130	290	350
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	140	180	340	370
4. nap	G	80	120	260	290	10	30	160	280	150	290	310	460
	G _m	120	200	300	380	40	80	220	560	230	440	480	510
	Rh	60	120	180	190	0	0	50	100	180	270	330	490
	Rh _m	60	150	190	200	0	60	110	330	300	340	360	510
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	200	270	390	470
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	250	320	440	500
2. nap	G	20	120	160	160	0	20	20	120	0	100	190	280
	G _m	160	250	260	260	0	40	60	130	20	190	290	390
	Rh	0	10	70	120	10	30	90	100	50	170	310	450
	Rh _m	0	40	100	180	0	40	120	160	90	330	470	480
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	110	300
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	50	160	280	460
Kezdeti csiraszáma:						850/ul				510/ul			

39. táblázat: *Trichoderma koningii* 23-38/48. törzsszel kapcsolatos vizsgál-
lati eredmények

35. grafikon: *Trichoderma koningii* komplex 23-38/48. törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

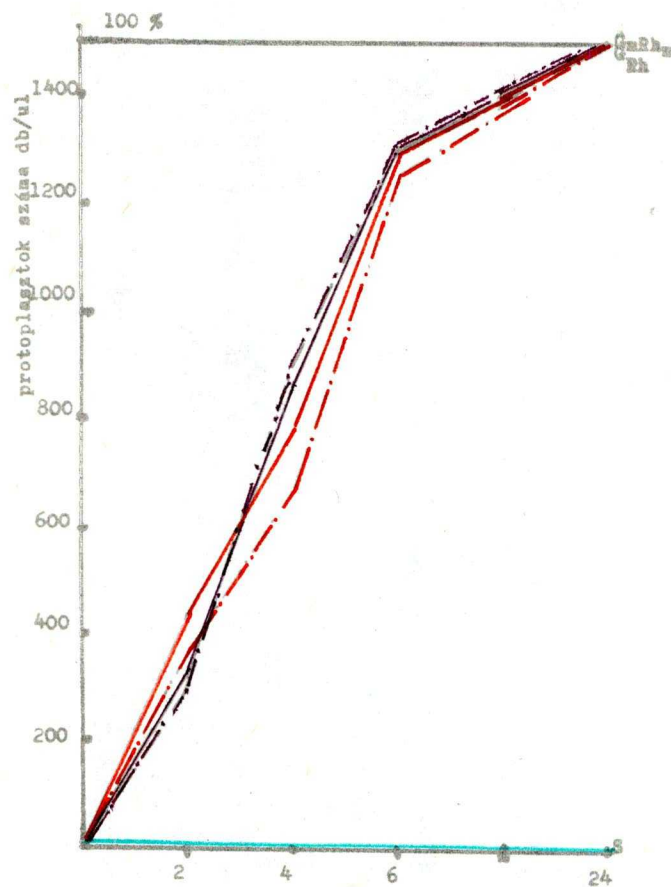


Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	300	900	1290	1480	0	10	70	120	10	260	510	730
	G _m	320	870	1300	1500	0	0	120	180	30	310	670	800
	Rh	370	680	1270	1500	0	0	50	170	40	420	500	710
	Rh _m	440	790	1300	1500	0	0	110	220	70	480	510	800
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	190	500
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	30	120	270	690
4. nap	G	150	410	800	1000	0	0	30	120	100	270	600	780
	G _m	180	370	530	1200	0	0	50	140	140	330	590	800
	Rh	70	120	280	600	0	0	0	100	30	200	270	630
	Rh _m	100	170	310	680	0	0	30	120	60	190	290	610
	S	20	30	60	120	0	0	120	270	150	350	590	780
	S _m	30	50	60	100	0	0	170	320	130	370	610	800
2. nap	G	490	570	1000	1300	0	0	70	150	100	410	670	730
	G _m	680	700	1200	1480	0	0	110	200	120	490	720	800
	Rh	120	130	370	500	0	0	0	100	90	190	280	400
	Rh _m	170	210	500	680	0	0	20	140	110	300	380	600
	S	0	10	80	260	0	0	30	60	10	120	300	610
	S _m	30	50	120	320	0	0	50	80	70	170	340	640
Kezdeti csíraszám:						630/ul				800/ul			

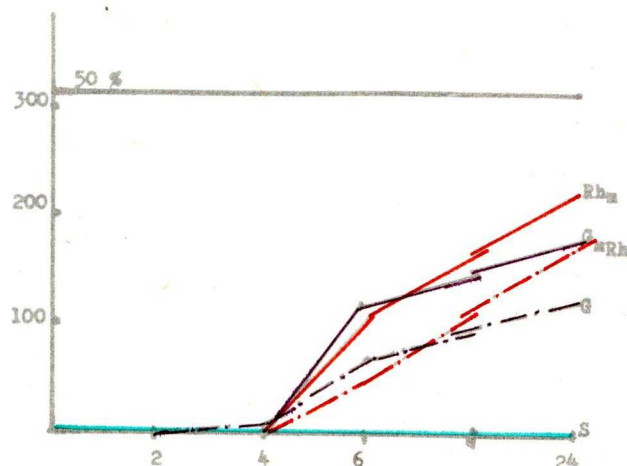
40. táblázat: *Trichoderma koningii* komplex 23-38/49. törzsszel kapcsolatos
vizsgálati eredmények

36. grafikon: Trichoderma koningii komplex 23-48/45. törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények

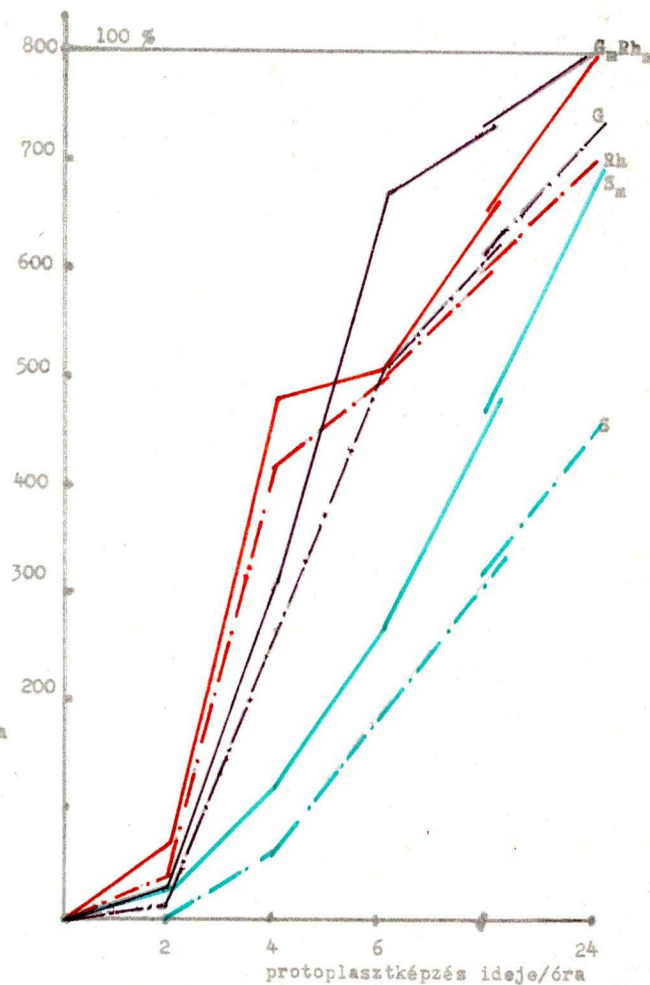
Geotrichum protoplasztok



Rhodotorula protoplasztok



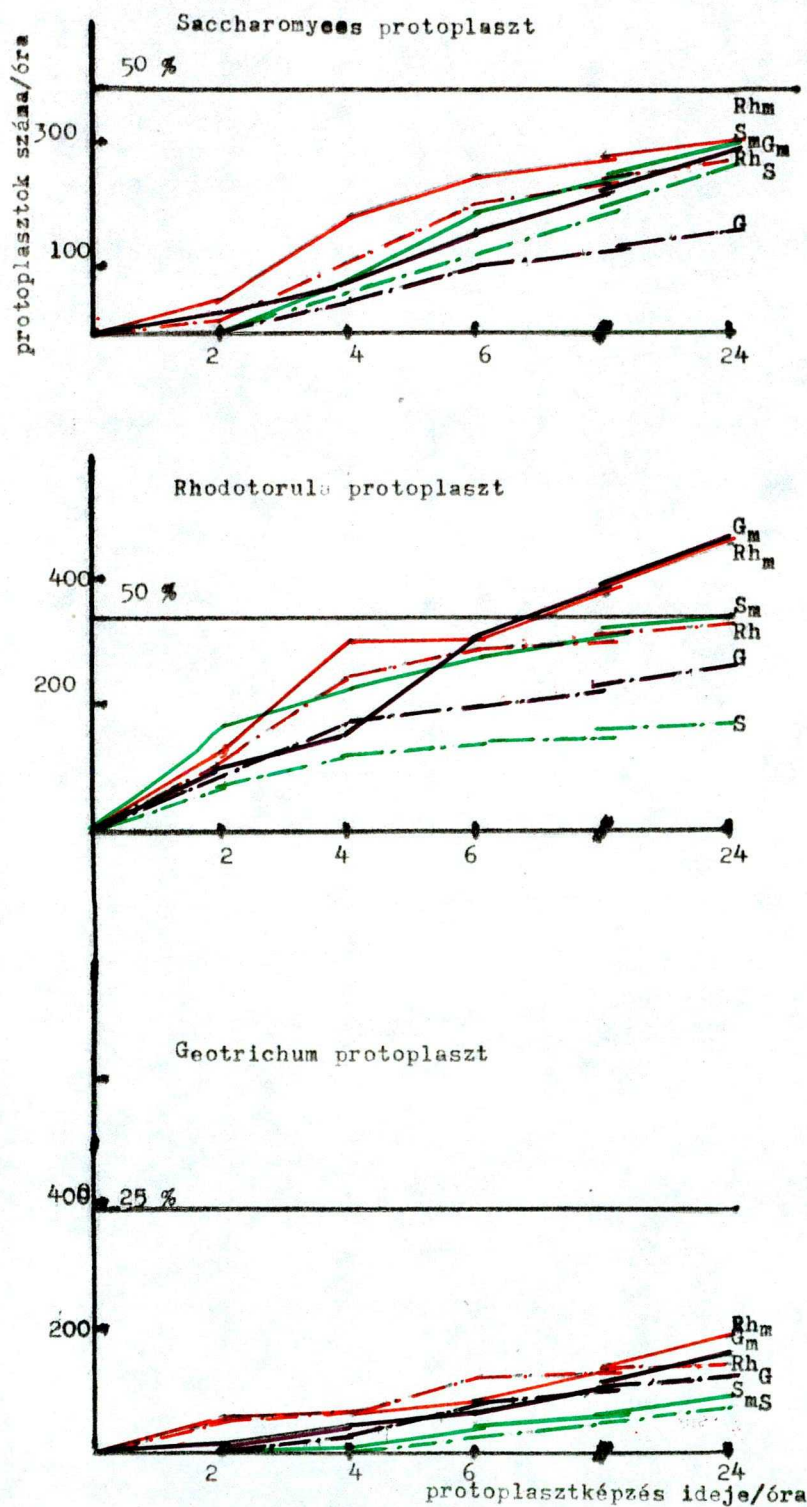
Saccharomyces protoplasztok



Fermentlé kora	proto- plasztok fermentlé száma eredete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	0	30	80	120	90	180	200	270	0	50	100	170
	G _m	20	50	70	160	100	170	310	470	30	80	160	290
	Rh	50	60	120	140	100	250	290	330	20	110	200	280
	Rh _m	60	60	90	180	130	310	300	460	50	190	250	310
	S	0	0	30	70	70	120	140	180	0	70	120	270
	S _m	0	10	50	90	170	240	300	320	10	80	190	300
4. nap	G	20	30	40	60	70	80	90	170	40	90	160	210
	G _m	40	60	80	100	180	230	250	290	30	70	120	180
	Rh	20	100	110	110	60	300	310	330	20	70	100	140
	Rh _m	30	80	110	130	30	280	230	390	50	100	130	190
	S	0	10	50	100	40	180	230	230	0	30	90	140
	S _m	0	30	60	110	90	200	220	240	20	60	120	160
2. nap	G	0	30	70	100	70	230	270	280	10	50	70	120
	G _m	30	50	90	140	90	290	310	370	0	40	100	180
	Rh	0	0	0	30	100	170	300	300	30	100	130	180
	Rh _m	0	10	10	20	120	140	280	390	0	60	150	200
	S	0	0	0	0	20	40	40	60	0	0	0	30
	S _m	0	0	0	10	0	50	90	110	0	0	40	100
Kezdeti csiraszáma:						680/ul				770/ul			

41. táblázat: *Trichoderma glaucum* 0593 törzssel kapcsolatos vizsgálati eredmények

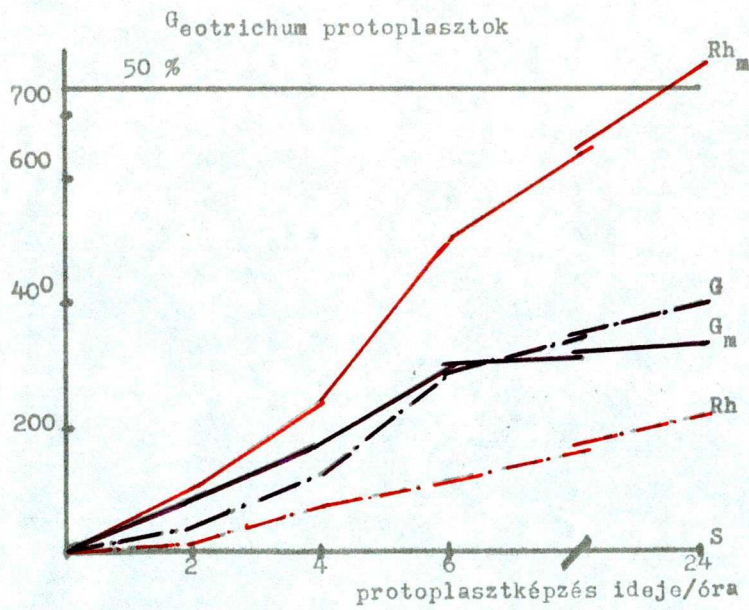
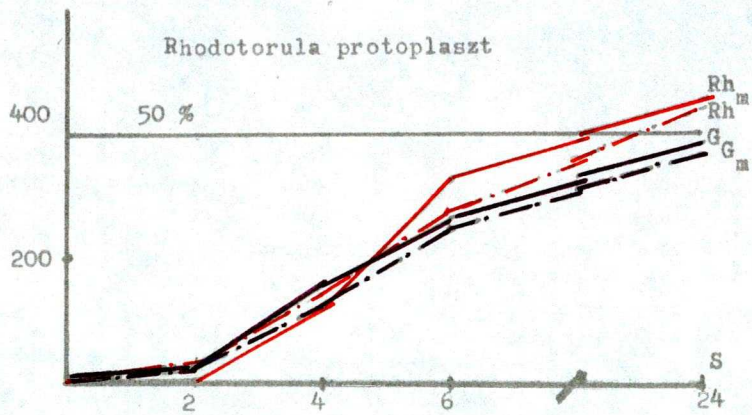
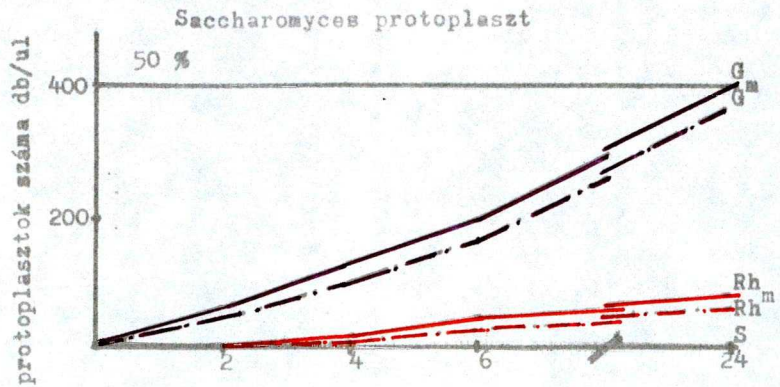
37. grafikon: *Trichoderma glaucum* 0593 törzzsel kapcsolatos vizsgálati eredmények



Fermentlé kora	proto- plasztok fer- mentlé eradete	Protoplasztálás ideje / óra											
		2	4	6	24	2	4	6	24	2	4	6	24
		Geotrichum				Rhodotorula				Saccharomyces			
6. nap	G	10	50	60	120	30	70	260	280	0	70	140	260
	G _m	30	100	140	230	50	100	250	510	20	80	160	370
	Rh	60	210	310	470	50	70	170	260	0	0	10	30
	Rh _m	50	290	480	680	30	80	190	300	0	30	50	90
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. nap	G	40	130	290	400	20	130	250	370	50	100	170	390
	G _m	90	180	300	340	20	160	270	390	60	130	210	420
	Rh	20	80	120	220	30	150	280	440	0	10	30	60
	Rh _m	110	250	510	790	0	130	340	460	0	20	50	80
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. nap	G	0	0	30	100	0	50	190	230	10	50	100	160
	G _m	90	210	290	370	10	30	230	270	30	50	170	210
	Rh	0	0	20	60	0	70	190	240	0	0	0	0
	Rh _m	0	30	100	200	20	100	180	260	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S _m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kezdeti csíreszáma:						800/ul				840/ul			

42. táblázat: Trichoderma sp. 0592 törzsszel kapcsolatos vizsgálati eredmények

38. grafikon: Trichoderma sp. 592 törzzsel kapcsolatos
vizsgálati eredmények



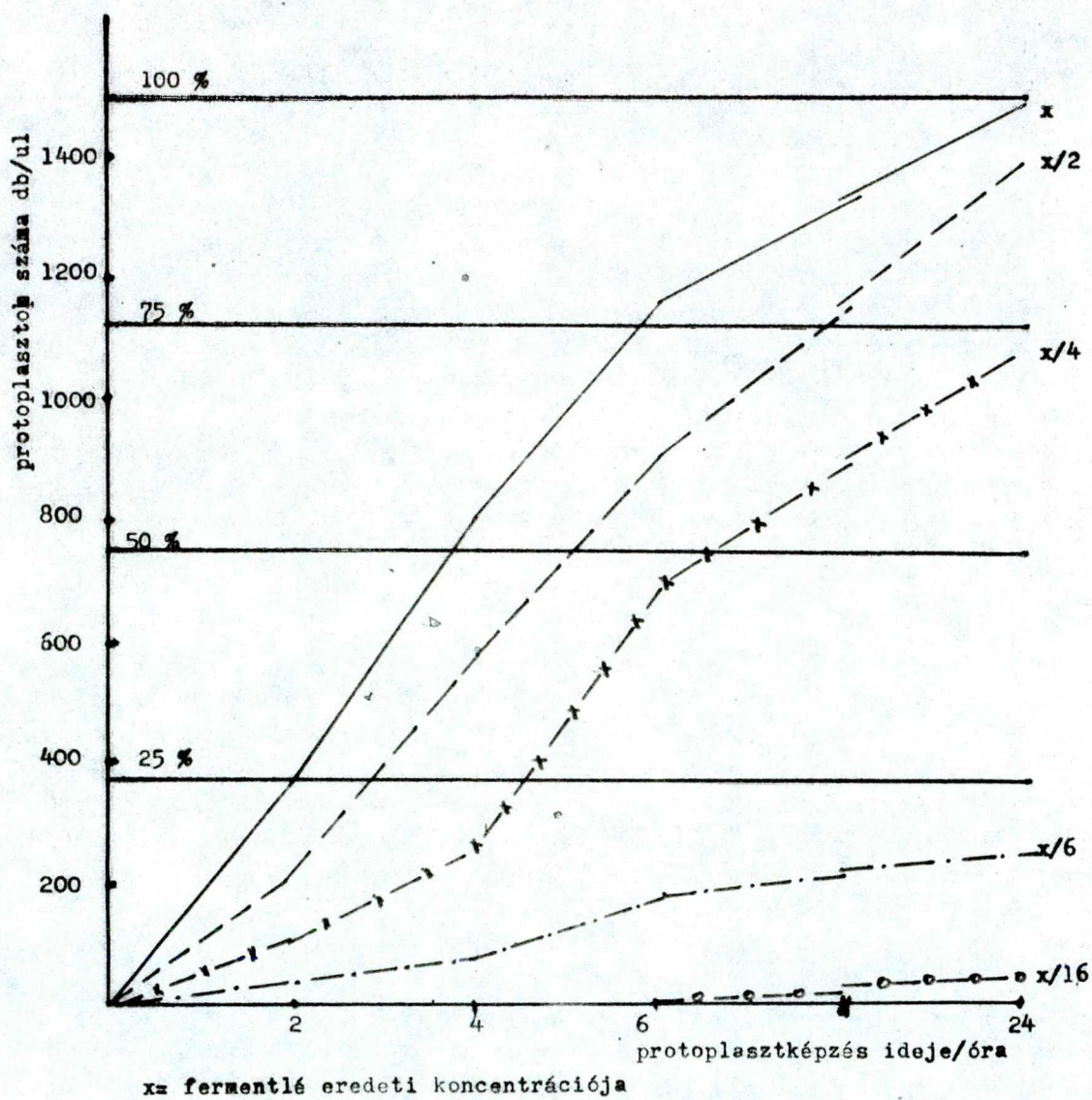
4. Az enzimpreparátum protoplasztikus aktivitásának vizsgálata az enzimekoncentráció függvényében

Vizsgálaton célja annak megállapítása volt, hogy egyes *Trichoderma*-fajoknál termelt fermentlé protoplasztikus aktivitása miként változik a hígítás fokával.

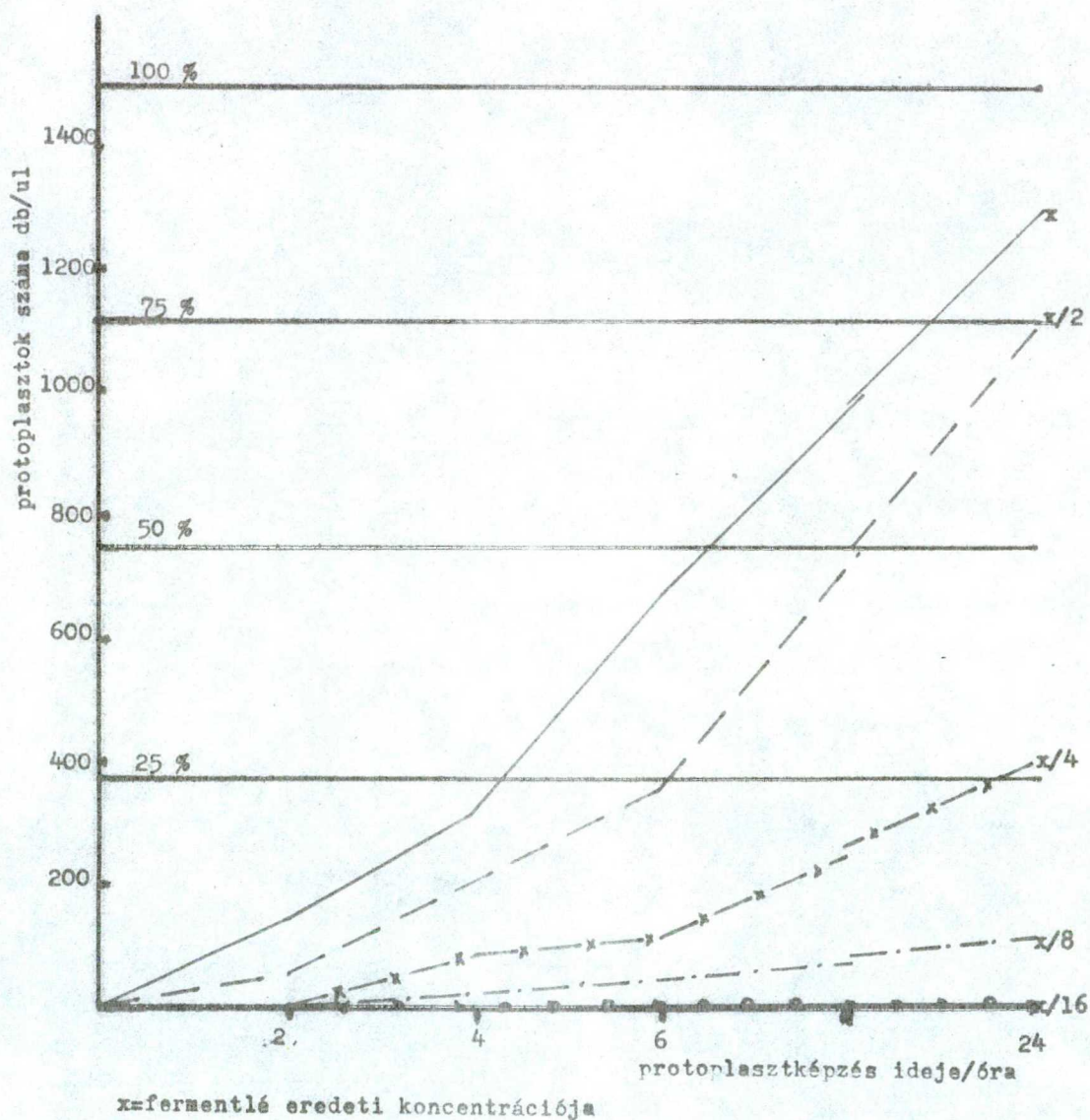
Hatszapos fermentlevet használtam a kísérletekhez, melyet a VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK c. fejezet 5. pontja szerint *Geotrichum*-et tartalmazó minimál tápközegetben állítottam elő. A továbbiakban a fermentléből kivett 2-2 ml-t és ebből négy tagú hígítási sort készítettem felváltva hígítással 0,6 N KCl-al stabilizált csapvízzel. Az így nyert hígítási sor minden tagjához 100-100 mg friss /12 óráig/ *Geotrichum* sejtet adtam, majd 2, 4, 6 és 24 óra múlva protoplasztaszámítást végeztem. Az eredményeket a 43. táblázat és 39-40. grafikon szemlélteti.

Protoplasztok száma/ml fermentlé hígítási foka	Protoplasztaszámítás ideje							
	2	4	6	24	2	4	6	24
	<i>T. viridescens</i> nyert fermentlé				<i>T. 51-35/13. 7.</i> törzssel nyert fermentlé			
eredeti cc.x	370	810	1170	1500	150	320	680	1300
x/2	210	580	910	1400	60	210	390	1100
x/4	110	260	700	1100	0	90	120	400
x/8	0	80	190	350	0	30	50	120
x/16	0	0	0	45	0	0	0	0

39. grafikon: Protoplasztképződés alakulása az enzimkoncentráció függvényében T. viride törzsszel nyert enzimpreparátum esetében



40. grafikon: Protoplasztképződés alakulása az enzimkoncentráció függvényében T. koeningi 51-35/13.7. törzsszel nyert enzimpreparátum esetében



5. Száraz enzimpreparátum előállítása és vizsgálata

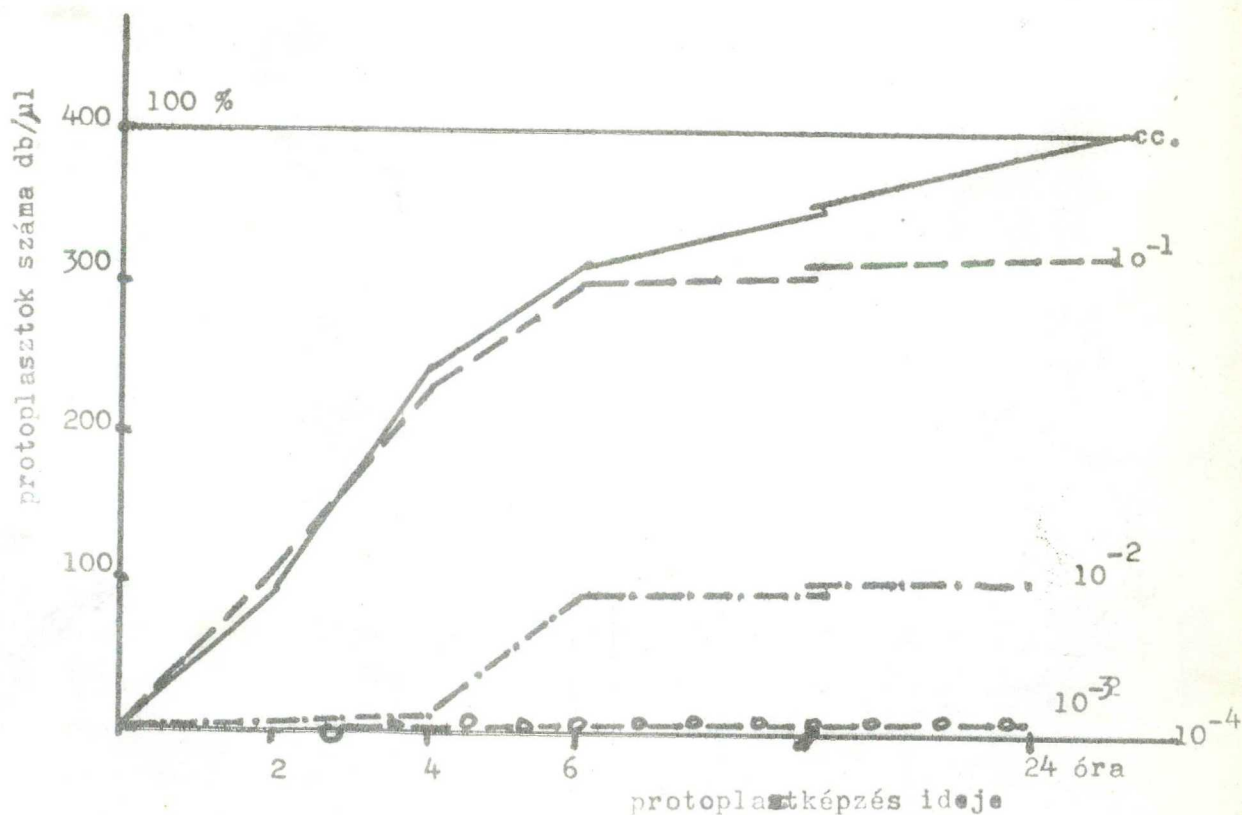
Trichoderma viridé-vel Geotrichumot tartalmazó minimál tápközegen 5 napos fermentlevet állítottam elő. Centrifugálás után kis részletekben $80\% + \text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -t adagoltam hozzá lassú kevergetés mellett, az enzimszuszpenzió kicsapására. 4°C -on 12 órai tárolás után a finom eloszlású csapadékot centrifugálással leválasztottam, s kb. 10 ml-nyi desztillált vízzel felvettem. Ezt dializáló hárttyába töltve 4°C -on desztillált vízbe ágyaztam, állandó keverés mellett a vizet kezdetben 1/2 óránként /6 órán keresztül/, majd óránként cseréltem. További 12 órai állás után az oldatot liofilizáltam.

A száraz enzimpreparátumból 1 mg/ml töménységű alapszuszpenziót, ebből tízes léptékű 4 tagú hígítási sort készítettem 0,6 M KCl-es pufferezelt közegben.

Az így elkészített hígítási sorba vittem 100-100 mg friss Geotrichum sejtet, s figyeltem a protoplasztképződés alakulását. Az eredményeket a táblázat és grafikon szemlélteti.

Hígítás konc.foka	Protoplasztszámlálás ideje			
	2	4	6	24
y	90	240	310	400
$\frac{y}{10}$	100	230	300	320
$\frac{y}{100}$	5	10	90	100
$\frac{y}{1000}$	0	2	5	10
$\frac{y}{10000}$	0	0	0	0

44. táblázat: Geotrichum protoplasztok számának alakulása
a száraz enzimpreparátum konc. függvényében

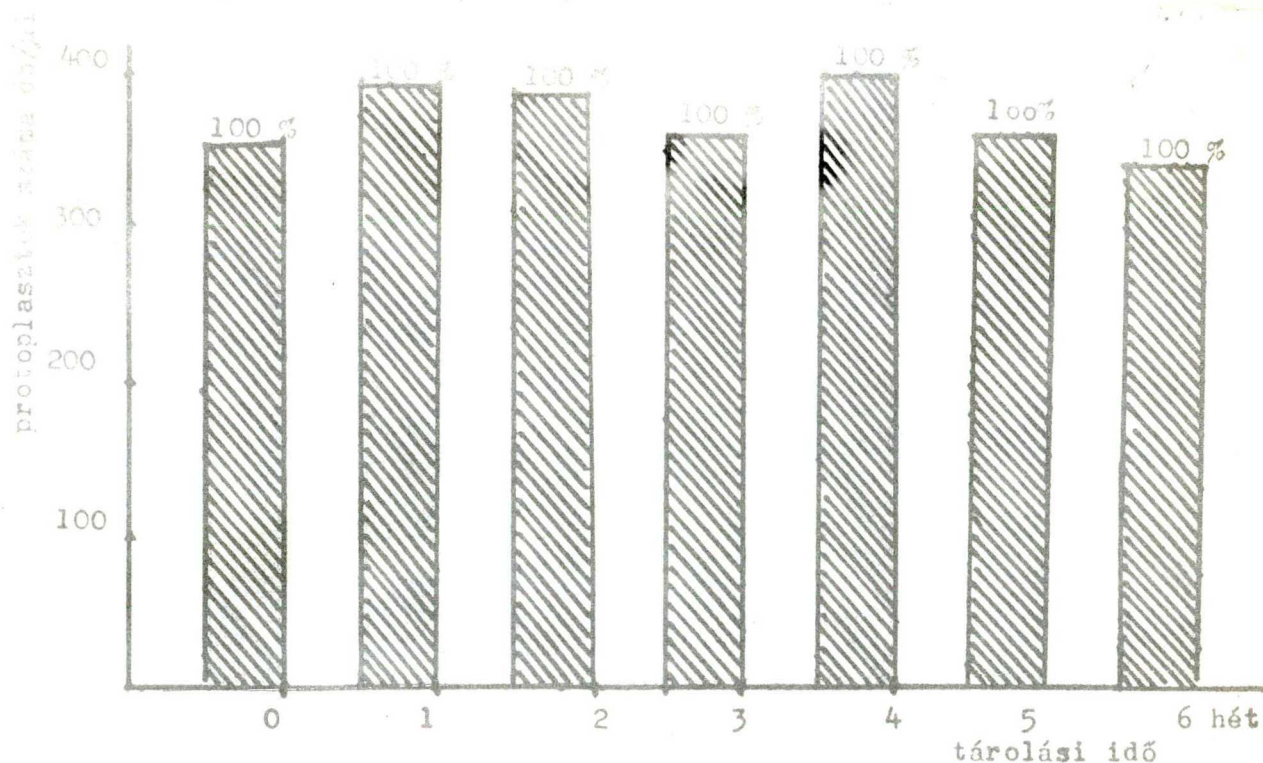


41. grafikon: Száraz enzimpreparátum protoplasztképző hatás
különböző koncentráció esetén

**6. Ezsimpreparátum aktivitásának vizsgálata fagyasztva törté-
nő tárolás során**

Az előző pontban leírtak szerint megtermelt ferment-
levet steril kőcsövekbe 5 ml-ként szétadagolva hűtőszek-
rény mélyhűtő részébe helyeztem, s hetenként 1-1 csövet ki-
olvasztva vizsgáltam hatását, *Geotrichum candidum*-ból való
protoplasztképzés alapján. A protoplasztképződés eredményét
a 24. óra után rögzítettem.

Idő	0	1 hét	2 hét	3 hét	4 hét
Pp	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
számolt	360	400	390	370	



**• grafikon: Ezsimpreparátum aktivitásának változása - 16°C-
on történő tárolás során**

A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

1. Trichoderma fajokkal kapcsolatos vizsgálatok értékelése

A *Trichoderma viride*-vel kapcsolatos vizsgálati eredményeket a VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK c. fejezetben részletesen elemestem.

T. koenigi 51-35/13. 3. - a fermentlével *Saccharomyces cerevisiae*-ből és *Rhodotorula rubra*-ból csak minimális mennyiségű protoplasztot sikerült nyerni, s azt is csupán *Geotrichum*os indukció esetén. Ez utóbbi enzimpreparátummal a *Geotrichum* sejteknek kb. 50 %-a alakult át a 24. óra végére protoplasztá. Lényegesen kevesebb protoplaszt képződött 2-merkaptoetanolt nem tartalmazó fermentlében.

T. koenigi 51-35/13. 4. - *Rhodotorula rubra* esetében volt a legjobb a protoplasztképződés, de itt sem haladta meg az 50 %-ot. Számottevő különbség nem mutatkozott a *Geotrichum*mal és *Rhodotorula*-val indukált enzimpreparátum esetében. *Saccharomyces*szel indukálva az enzintermelést *Rhodotorula*-ból nem kaptam protoplasztot. A három különböző módon előállított fermentlével *Saccharomyces* sejteknek mindössze 15-20 %-a alakult protoplasztá.

Geotrichum-ból csak Geotrichumos tápközegen termelt enzimpreparátum esetében volt kb. 15 %-os protoplasztképződés.

T. keeningi 51-35/13. 5. - Geotrichumból Geotrichum-mal indukált enzimpreparátummal 2-merkaptoetanol adagolással 100 %-os protoplasztképződést értünk el. Lényegesen gyengébb volt az enzimaktivitás 2-merkaptóetanol hiányába /20 %/. Rhodotorulával és Saccharomycessel indukálva mindössze 5 %-ban képződött protoplaszt.

Rhodotorula sejteknek 65 %-a alakult protoplasztá a 4 napos Geotrichum-mal indukált fermentlé esetén hat óra elteltével. Érdekes módon a 24. órára a protoplasztok száma csökkenést mutatott. Feltehetően valamilyen metodikai hiba következtében.

Rhodotorulás indukció esetén 50 %-os protoplasztképződést mutattam ki, Saccharomyceses indukció mellett kb. 30 % volt az eredmény. Saccharomyces sejteknek 10-20 %-a alakult protoplasztá. Jelentős különbség nem mutatkozott a különböző módon előállított fermentlé esetén.

T. keeningi 51-35/13. 6.

Geotrichumból egyetlen fermentlé esetében sem kaptam protoplasztot.

Rhodotorula-ból minimális protoplaszt keletkezett a 24. órára, az első hat órában itt sem kaptam eredményt.

Saccharomyces-re vonatkozóan a Rhodotorulával indukált preparátum volt a legaktívabb /50 %/, ezt megküszülítette a Saccharomycessel indukált enzimpreparátum, s a Geotrichumos indukcióval kaptam általában kisebb mennyiségű protoplasztot.

T. koeningi 51-35/13. 7.

Geotrichum-ból a 6 és 4 napos fermentlevekkel kaptam protoplasztot. Kiugró eredményt a Geotrichummal indukált fermentlé adott, merkaptoetanol adagolással megküszülítően 100 %-os volt a protoplasztképződés. Rhodotorulával indukálva a 4 napos fermentlé aktívabb volt, de itt is csak 25 % volt a maximális protoplasztmennyiség. Saccharomyceses tápoldaton nem termelődött olyan enzimrendszer, amely a Geotrichum sejtfalat bontotta.

Rhodotorula-ból a 6 és 4 napos Geotrichummal indukált fermentlevekkel kb. 50 %-os protoplasztképződést tapasztaltam. Hasonló aktivitást mutatott a 2 és 4 napos Rhodotorulával indukált enzimpreparátum. Saccharomycesszel indukálva az enzim szintézist, jóval gyengébb volt az aktivitás /15 %/.

Saccharomyces sejteknek mindössze kb. 40 %-a alakult protoplaszttá a Geotrichumos és Rhodotorulás tápközegen indukált fermentlével. A Saccharomyces indukció ennél rosszabb eredményhez vezetett /20-25 %/.

T. koeningi 51-35/13. 11.

Geotrichum-ból a Geotrichum-mal indukált fermentlével /4 és 6 napos/ 100 %-os volt a protoplasztképződés.

A másik két indukciós tápközeggel csak minimális mennyiségű protoplaszt szabadult ki.

Rhodotorula esetében a hatnapos Geotrichum-on termeltetett enzimpreparátummal a sejtek 60 %-a alakult protoplaszttá. A Rhodotorulás és Saccharomyces-szel történő indukció ennél jóval gyengébb aktivitást /20 % / mutatott.

A Geotrichum-os tápközegen előállított fermentlével a Saccharomyces sejteknek kb. 35 %-a alakult protoplaszttá. A Rhodotorulás és Saccharomyces-szel történő indukcióval nem értük el ezt az eredményt /10-20 %/.

T. pseudo koeningi 51-32/1. 9.

Geotrichum sejtekből való protoplasztképzésre alkalmas enzimpreparátumot a gomba nem termelt.

Hat óra alatt a Saccharomyces és Rhodotorula sejtekből sem szabadultak ki protoplasztok. 24 óra elteltével a sejteknek 50 %-a átalakult protoplaszttá mindkét élesztőnél. A Rhodotorulás indukció a hatnapos fermentlé esetében megközelítő eredményt adott. Saccharomyces-en termelt preparátum alig mutatott aktivitást.

T. pseudo koningi 51-32/1. 8.

A gomba protoplasztképzésre alkalmas enzimpreparátumot-a vizsgált három tesztorganizmus vonatkozásában - nem termelt.

T. konigikomplex koningii 23-32/1. 59.

Geotrichumból a legtöbb protoplasztot /50 %/ a Geotrichummal indukált fermentlével nyertem. A Rhodotorulát tartalmazó tápközegen előállított 6 napos enzimpreparátummal csupán 25 % volt a protoplasztok száma. A fiatalabb /4 és 2 napos/, valamint a Saccharomyces-en termelt preparátumok még ennél is gyengébb aktivitást mutattak.

Rhodotorulából való protoplasztképzés különböző indukció esetén igen ellentmondó eredményeket mutatott. A hatnapos Saccharomyces-es indukció adta a legjobb eredményt, de ez sem érte el az 50 %-ot. Ezzel azonos hatásfokú volt a három különböző korú Rhodotorulán termelt fermentlé. A Geotrichummal indukált enzim fejtette ki a leggyengébb hatást.

Saccharomyces sejtekből igen kisszámú protoplasztot nyertem az indukciótól függetlenül. Egyedül a hatnapos Rh-S minimálisan előállított preparátum segítségével kaptam kb. 40 %-os eredményt.

T. hamatum 51-35/13. 10.

A fermentlével /G, Rh, S/ Geotrichum-ból protoplasztot gyakorlatilag alig sikerült nyerni.

Rhodotorula és Saccharomyces esetében a hatnapos Geotrichum minimálisan indukált preparátummal a sejtek 30-40 %-ából képződött protoplaszt. Egyéb feltételek mellett jelentéktelen mennyiségű protoplaszt szabadt ki.

T. hamatum 23-35/13. 34.

Geotrichum fonalakból a 4 napos Geotrichum minimálisan termelt fermentlével közel 100 %-ban képződött protoplaszt. Ugyanezzel a Rhodotorula rubra sejtjei kb. 65 %-ban alakultak ozmotikusan labilis plasztá. A Saccharomyces sejteknél mindössze 30 %-os protoplasztképzést mutatott.

A többi fermentlé függetlenül az indukciós közegtől és időtől kis hatásfokának bizonyult.

T. hamatum 23-32/1. 37.

Geotrichum - sejtfai bontásra alkalmas enzimpreparátumot csak Geotrichum indukcióval kaptam, de ez is csak igen kis hatású volt. Ugyanezzel a Rhodotorula sejteknek mintegy 80 %-a protoplasztá alakul 2-mer-kapocstanolt adva a közegbe, Saccharomyceséknél 100 %-os volt a protoplasztok mennyisége. Kb. 50 %-os protoplasztképződést tapasztaltam Rhodotorulanál indukált fermentlé esetén a Rhodotorula sejtekből.

Saccharomyces sejtek 70 %-ából képződött ebben a közegben protoplaszt. Saccharomycesszel indukálva az enzintermelést sejtfalbontást nem tapasztaltam.

T. hamatum 23-38/46.

Az alkalmazott fermentációs körülmények között sejtfalbontó enzimet nem képzett.

T. hamatum 23-33/6. 50.

Kizárólag Geotrichum-tartalmú tápközegen szaporítva termelt olyan enzimet, amellyel Geotrichum-ból protoplasztot lehetett előállítani. A négynapos fermentálással 2-merkaptostanol jelenlétében a fonalak 100 %-ban protoplaszttá alakultak. A hatnapos preparátum már kisebb hatásfokúnak bizonyult.

T. hamatum 55-38/53.

Geotrichummal indukált enzimrendszere Geotrichum esetében 100 %-os protoplasztképződést eredményezett. Az enzimmel Rhodotorula és Saccharomyces sejtekből is kaptam protoplasztot, de csak igen kis százalékban /15-20/. Egyéb körülmények között sem jutottam említésre méltó eredményhez.

T. hirsutum 23-38. 17.

A Rhodotorula és Saccharomyces-tartalmú minimálisan a gomba szaporodást nem mutatott.

A Geotrichumos tápközegen minimális szaporodás után a négy- és hatnapos fermentlé mutatott egész kis méretű sejtfalbontó tulajdonságot, de csak Geotrichum candidumnál.

T. harzianum 23-33/6. 23.

A négynapos Geotrichumon indukált fermentlével 100 %-os protoplasztképződést tapasztaltam Geotrichum esetében. Ezen gombából Rhodotorulával indukált közegben a sejteknek kb. 35 %-a alakult plasztá. Saccharomycesszel végezve az indukciót alig képződött protoplaszt.

Rhodotorula rubra-ból Rhodotorulás minimálisan végezve az indukciót kaptam a legjobb eredményt /85 %/ az eddigiektől eltérően. Hasonlóképpen Saccharomyces esetében is ezzel a preparátummal volt a legjobb a sejtfalbontás /50 %/. Ez megközelítő eredményt adott a Geotrichumos indukcióval a nevezett gomba esetében.

Minden esetben a négynapos fermentlé volt a legaktívabb.

T. harzianum 23-38/65. 4.

Kiemelkedő protoplasztképző tulajdonságot mutatott a Geotrichumos minimál közegben termelt fermentlé, melyel Geotrichum és Saccharomyces gombáknál 100 %-os sejtfalbontást sikerült elérni. Ugyancsak jó hatással bírt a hatnapos Rhodotorulán előállított fermentlé Saccharomyces esetében.

Rhodotorula sejtekből maximálisan 50 %-os eredményt kaptam a Geotrichumos indukcióval.

T. konigii komplex 23-35/13. 19.

Geotrichum candidum esetében mintegy 50 %-os sejtfalbontás mutatkozott a hatnapos Geotrichumot és Rhodotorulát tartalmazó minimálisan termeltetett enzimrendszerrel. Ugyanezzel a Rhodotorula sejtek 30 %-ban a Saccharomyces sejtek 100 %-ban protoplasztá alakultak. A Rhodotorulával és Saccharomycessel való indukció kevésbé aktív enzimpreparátumot eredményezett az utóbbi két gombánál.

T. konigii komplex 23-35/13. 20.

A gombával minden indukciós tápközegen képződött sejtfalbontó enzim. Ezek aktivitása kismérvű. Geotrichum sejtekből a legjobb feltételeket figyelembe véve /Geotrichumos indukció/ is csak 30 %-os eredményt kaptam. Rhodotorula-ra vonatkozóan azonos indukcióval /Rhodotorulás/ mutatkozott a legjobb eredményt, majdnem 50 %-os protoplasztiképződés.

Saccharomycesekből egyetlen esetben sem kaptam számottevő eredményt /ül-ként 840 sejtől 200 plasztot számoltam/.

T. konigii komplex 23-35/13. 20.

Hat órai protoplasztálás után a Geotrichum sejttömeg teljes egészében legömbölyödött formát mutatott a Geotrichumos indukcióval nyert fermentációban.

Ugyancsak 100 %-os protoplasztképződést eredményezett ezen rendszer Saccharomyces sejtekből, de csak 24 ó-ra múlva. Ezen gombánál Rhodotorulás indukcióval nyert hatnapos fermentlé is jól bontotta a sejtfalet /80 %/. Rhodotorula sejtekből a hatnapos Rhodotorulát tartalmazó közegben termelődött enzimmel kb. 60 %-ban képződött ozmotikusan érzékeny gőmbtest.

Minden esetben ugrásszerűen csökkent a fermentlé hatásfoka az indukciós idővel.

T. koningii komplex 23-33/6. 24.

Igen érdekesen az eddigiektől eltérő módon a két napig tartó indukcióval termelődött a leghatékonyabb enzimrendszer, Geotrichum esetében a Geotrichumos tápközegben, Rhodotorulára vonatkozóan a Rhodotorulás tápközegben. Geotrichumból 100 %, Rhodotorulából valamivel több mint 50 % protoplaszt képződött.

Saccharomyces sejteknél csupán a Geotrichumon termelt enzim rendelkezett sejtfaletbontó tulajdonsággal, de csak jelentéktelen mértékben.

Saccharomycessel indukálva hatékony preparátumot nem kaptam.

T. koningii komplex 23-33/6. 29.

A törzs igen jó sejtfaletbontó enzinkomplexumot termelt elsősorban Geotrichummal indukálva. Az így előállított 4 napos fermentlével a Geotrichum és Saccharomyces sejtek 100 %-ban, a Rhodotorula sejtek 70 %-ban protoplasztá alakultak.

Rhodotorulával végezve az indukciót *Saccharomyces*-nél 100 %-os *Geotrichum*-nál és *Rhodotorula*-nál 50 %-os protoplasztképződést tapasztaltam. A legkisebb aktivitású a *Saccharomyces*es minimálisan nyert közeg volt, kivételt a *Saccharomyces* sejtek plasztálásánál mutatott, ahol ezen esetben is kb. 70 %-os volt a sejtfalbontás.

T. koningii komplex 23-32/1. 36.

A kísérleti eredmények szerint *Rhodotorula* sejtek falának bontására alkalmas enzintermelést nem mutatott. *Saccharomyces cerevisiae*enél a *Geotrichum*ot és *Rhodotorula*t tartalmazó indukciós tápközeg esetén 6 óra után indult meg a sejtfalbontás, a 24 óra alatt a sejteknek mintegy 50 %-a gömbölyödött le. Ezzel a fermentlével *Geotrichum* sejtekből is minimális mennyiségű protoplaszt képződött.

T. koningii komplex 23-32/1. 39.

A vizsgált faj az indukciós közegtől függetlenül igen nagy sejtfalbontó hatással rendelkező enzimerendszer termelt *Saccharomyces* sejtek vonatkozásában. A protoplasztek kiszabadulása lassan indult meg, de 24 óra elteltével csaknem minden esetben 100 %-os volt. *Geotrichum*-ból is 100 %-os eredményt kaptam, de csak a 6 napos azonos fajjal /*Geotrichum*/ indukált fermentlével. Ugyanezzel a rendszerrel *Rhodotorula*-nál kb. 80 %-os eredmény mutatkozott. Az egyéb indukciós kö-

rülmények mellett ezen két faj esetében kevésbé hatékony enzim képződött.

T. koningi 23-38/48.

Az előbbihez hasonlóan jó intenzitással működő enzimet termelt a Saccharomyces-sejttel bontására a Rhodotorulát és Geotrichumot tartalmazó tápközegen. Saccharomycessel indukálva az enzimszintézist kevesebb számú protoplaszt képződött, de ez is elérte a 80 %-ot.

A Geotrichumos közegben termelt 6 napos fermentlével a Geotrichum sejtek 70 %-a alakult plasztá. A hasonlóan indukált 4 napos fermentlé mutatta Rhodotorula protoplasztálásánál a legnagyobb aktivitást. A másik két fermentációs út nagyon kis aktivitású enzimet adott.

T. koningii komplex 23-38/49.

A törzset Geotrichumot tartalmazó tápközegen nevelve 6 nap után a Geotrichum és Saccharomyces sejtekből 100 %-os protoplasztképződést mutató enzimpreparátumhoz jutottam. Ez a fermentlé Rhodotorula sejtfalának bontására csak kis teljesítménnyel /20 %/ használható, ugyanugy mint a Rhodotorulás indukcióval nyert fermentlé, amely a Rhodotorula sejteknek 25 %-ából képezett protoplasztot, ezzel szemben Geotrichum és Saccharomyces esetén 100 %-ot ért el.

Saccharomycessel indukálva gyakorlatilag csak a Saccharomyces sejtek falának emésztésére kaptam jó hatású közeget.

T. glaucum 0593

Geotrichum sejtek protoplasztálására függetlenül az indukció körülményeitől - gyenge hatású fermentlé szintetizálódott. 24 óra múlva is alig volt protoplaszt.

Ugyanezen fermentlevekkel 2-merkaptotanol jelenlétében 50 %-os protoplasztképződést tapasztaltam Rhodotorula esetében. Saccharomycesre vonatkozóan a háromféle módon előállított enzimpreparátum közel azonos eredményt mutatott, de ez nem érte el az 50 %-ot.

T. species 0592

Saccharomycessel végezve az indukciót hatásos enzimkomplexum nem képződött.

Mind Geotrichum mind Rhodotorula esetében a legtöbb protoplasztot a Rhodotorulával indukált fermentlében számoltam, de ez is alig haladta meg az 50 %-ot. Geotrichumos tápközegben tenyésztve a Trichodermat a képződött enzimrendszer egyedül Saccharomycesre vonatkozóan mutatott jobb sejtfalbontó tulajdonságot, mint az előzőek.

2. Enzimkoncentrációtól függő protoplasztképzés értékelése

T. viride-ből nyert fermentlé 100 %-os protoplasztképződést eredményezett.

Ezt kétszeresére higitva még közel azonos hatásfokot tudtam kimutatni. A következő higitási léptékben /4x/ a protoplasztképződés 25 %-os csökkenést adott. Nyolcszeresére higitva a fermentlevet a sejteknek mindössze 20 %-a alakult protoplasztá. 6x higitás gyakorlatilag hatástalan volt.

T. koenigi 51-35/13. 7. törzssel előállított enzimpreparátum ennél is gyengébb eredményeket adott. Már a kétszeres higitásnál is valamivel 75 % alá esett a protoplasztképződés mértékénél a négyszeres higitás fermentlével a *Geotrichum* sejteknek mindössze 25 %-ából sikerült protoplasztot kapni, és ezt is csak 24 óra múlva. A további higitásban még volt kismértékű protoplasztképződés, de a 16x higitás teljesen inaktívnak mutatkozott.

3. Száraz enzimpreparátummal kapcsolatos vizsgálati eredmények értékelése

A *T. viride*vel előállított fermentléből liofilizálás után viszonylag kis mennyiségű szárazenzimet sikerült nyerni. Ennek 1 mg/ml töménységű oldata 100 %-os aktivitást mutatott. 10-szeres higitás esetén 80 %-ra 100x-ra higitva 25 %-ra csökkent a protoplasztképző intenzitás. 1000x higitásban 24 óra múlva már alig volt protoplaszt.

4. Enzimpreparátum fagyasztva történő tárolásával kapcsolatos
kísérletek értékelése

A friss fermentlével *Geotrichum* sejtekből 100 %-ban kaptam protoplasztokat. Egy hét múlva is hasonló eredményt kaptam, sőt még a 4. hét végére sem csökkent a fermentlé aktivitása.

ÖSSZEFOGLALÁS

Tekintve a protoplasztképzés elméleti és gyakorlati jelentőségét, harminc *Trichoderma* törzset vizsgáltam meg - három gombafajból való protoplasztképzésre alkalmas - enzimszintézis tekintetében.

Az enzintermeltetést három különböző összetételű indukciós tápközegen végeztem. A tápoldatok egyedüli szénforrásként *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* sejtek preparátumát tartalmazták.

Figyeltem az enzimszintézis alakulását az indukció idejének függvényében, 2, 4, 6 napon keresztül. A különböző tápközegen termelődött fermentlé enzimaktivitását 2^h , 4^h , 6^h és 24^h elteltével 2-merkaptotanol jelenlétében és a nélkül a *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula rubra* és *Saccharomyces cerevisiae* /12 óránál nem idősebb/ sejtekből képződő protoplasztok számlálásával ellenőriztem.

Megvizsgáltam a *Trichoderma viride* és *T. koningi* 51-35/13. 7. törzsekből nyert fermentlevek aktivitásának változását a koncentráció függvényében /öttagú felezőhígítás sor/, valamint az enzimaktivitás változását, -16°C -on való tárolás mellett a tárolási idő függvényében.

Végezetül a *T. viride* fermentléből nyert száraz enzimp preparátum hatékonyságát ellenőriztem. Vizsgálati eredményeimet az alábbiakban összegzem:

1. A 30 *Trichoderma* törzs közül a *T. pseudo-koningi* 51-32/1. 9., a *T. koningi* komplex *koningi* 23-33/6. 56. és a *T. hamatum* 23-38/46. törzsekből sejtfalbontó enzimp preparátumot nem kaptam.

13 törzs termelt olyan enzimet, amely Geotrichum sejtekből 100 % protoplasztot adott /T. viride, T. koeningi 51-35/13.5., T. koeningi 51-35/13. 7., 51-35/13. 11., T. hamatum 23-35/13. 34., 23-33/6. 50., 55-38. 53., T. harzianum 23-38/65., T. koningii komplex 23-33/6. 24., 23-35/13. 21., 23-33/6. 29., 23-32/1. 39., 23-38/49. /. Hat törzs közepes aktivitást mutatott.

Rhodotorula rubra-ból protoplasztot nem sikerült nyerni hat törzs által termelt enzimpreparátummal. Kilenc törzs - T. viride, T. koeningi 51-35/13. 11., T. hamatum 23-35/13. 34., 23-32/1. 37., T. harzianum 23-33/6. 23., T. koningii komplex 23-35/13. 21., 23-33/. 29., 23-32/1. 39., 23-38/19. - enzimpreparátumával 60 %-ot meghaladó sejtfalbontást érttem el, de egyik esetben sem kaptam 80 %-nál jobb eredményt. A többi törzsszel elállított fermentáló közepesnél /20-30 %/ gyengébb aktivitású volt.

Saccharomyces cerevisiae sejtekből 9 törzs enzimeivel - T. viride, T. hamatum 23-32/1. 37., T. harzianum 23-38/65., T. koningii komplex 23-35/13. 19., 23-35/13. 21., 23-33/6. 29., 23-32/1. 39., 23-38/48., 23-38/49. - 100 %-os volt a protoplasztok aránya, öt törzs negatív eredményt adott, a többi kisebb hatékonyságú enzimeket termelt.

T. viridevel összehasonlítva megállapítható, hogy a harminc törzs közül 10-12 termelt hasonló aktivitású enzimeket.

2. Az indukcióhoz felhasznált tápközegek közül általában a *Geotrichum* sejteket tartalmazó minimál tápoldatban termelődött enzim volt a legaktívabb mind a három gomba esetében. A legkevesebb protoplasztot *Saccharomyces*-szel történő indukcióval kaptam.

Geotrichum sejtekből való protoplasztképzésre csak egy törzs esetében kaptam *Rhodotorulás* indukciós rendszerben olyan enzimeveréket, amely 100 %-os aktivitású volt, ebben az esetben *Geotrichum*mal való indukció *Geotrichum* sejtekből nem eredményezett 100 %-os protoplasztképződést. *Rhodotorula* esetében 4 törzssel kaptam jobb eredményt a *Rhodotorulá*-val indukált tápközegen, mint a *Geotrichum*mal történő indukció esetén /*T. harzianum* 23-33/6. 23., *T. koningii* komplex 23-35/13. 20., 23-35/13. 21., 23-35/13. 24./.

*Saccharomyces*nél a három különböző módon termelt enzimpreparátum a legtöbb esetben azonos vagy hasonló hatású volt.

A *T. koningii* komplex 23-32/1. 36. volt az egyedüli olyan törzs, amelynél a fermentlével *Geotrichum*ból nem kaptam protoplasztot, amíg *Rhodotorulából* 80 %-os és *Saccharomyces*nél 100 %-osnak mutatkozott a plasztképződés.

3. Igen sok esetben a négynapos fermentlé protoplasztképző aktivitása volt a legjobb szemben a 2 és 6 napossal.

4. A protoplasztok száma a kezelési idővel fokozatosan emelkedett.

Néhány esetben - Geotrichumnál - már a 6. óra után megközelítette a 100 %-ot /T. koeningi 51-35/13. 5., 51-35/13. 7., 51-35/13. 11., T. koeningi komplex 23-35/13. 21., 23-38/49., T. hamatum 55-38/53./.

5. A 2-merkaptotetanol általában csak kis mértékben fokozta a protoplasztképződést, kivételt a T. koeningi 51-35/13. 5. törzsnél tapasztaltam, Geotrichumból 2-merkaptotetanol jelenlétében 100 %, a nélkül 25 % volt a protoplasztok mennyisége. Rhodotorula-nál a T. koeningi komplex 23-38/48-as törzssel 2-merkaptotetanol jelenlétében a pl 850/ul sejtből 560/ul alakult protoplaszttá, ellenkező esetben 280/ul.

6. Az enzimaktivitás a fermentlé 2x hígításával nem mutatott jelentős csökkenést, T. viride esetében még a 4x hígítás is 75 %-os aktivitású volt, a másik törzsnél ilyen hígítás mellett már csupán 25 % volt a protoplasztok mennyisége. További hígítással már alig bontotta a sejtfalat.

7. Négy hét után - -16°C -on való tárolás mellett - az enzimaktivitás még 100 % volt.

8. T. viride fermentléből fagyaszta szárítással előállított, szárazenzimpreparátum 1 mg/ml, valamint 0,1 mg/ml-es töménységben 100 %-os aktivitással oldotta a Geotrichum sejtfalát, 0,01 mg/ml esetén már jelentéktelen volt a protoplasztképződés.

IRODALOMJEGYZÉK

- Abrams, A. /1959/: J. biol. Chem. 234, 383-387.
- Anderson, F.B. /1967/: In "Symposium Über Hefe-Protoplasten, Jena 1965" /Ed.R.Müller/ p. 65. Akademie-Verlag, Berlin
- Bachmann, B.J., and Bonner, D.M. /1959/: J. Bact. 78. 550-556.
- Bartnicki-Garcia, S., and Lippman, E. /1966/: J. gen. Microbiol., 42, 411-416.
- Bartnicki-Garcia, S. /1968/: Ann. Rev. Microbiol., 22. 87-108.
- Bartnicki-Garcia, S., and Lippman, E. /1969/: Science, 165. 302-304.
- Boulton, A.A. /1965/: Exptl. Cell. Res., 37. 343-359.
- Brenner, S., Dark, F.A., Gerhardt, P., Joynes, M.H., Kandler, O., Kellenberger, E., Klieneberger-Nobel, E., Mc Quillen, K., Rubio-Huertos, K., Salton, M.R.J., Strange, R.E., Tomcsik, J., and Weibull, C. /1958/: Nature, 181. 1713.
- Brock, T.D. /1961/: J. gen. Microbiol., 26, 487-497.
- Darling, S., Theilade, J., and Birch-Anderson, A. /1969/: J. Bact., 98. 797-810.
- Duell, E.A., Inowe, S., and Utter, M.F. /1964/: J. Bact., 88. 1962-1773.
- Eddy, A.A. /1959/: Expt. Cell. Res., 17, 447-464.
- Elorza, M.V. and Sentendreu /1969/: Biochim. Biophys. Research Com., 35. 741-747.
- Emerson, S., Emerson, M.R. /1958/: Proc. Natn. Acad. Sci. USA., 44. 669.
- Ferenczy, L., Keveri, F., Zsolt, J., Téren, J. and Berecz, I. /1970/: Act. Facult. Med. Univ. Brunensis 37. 95-99.

- Ferenczy, L., Sipiczki, K., Szegedi, M. /1975/: *Nature*, 253, 3.
- Ferenczy, L., Kevei, F., Zsolt, J. /1974/: *Nature*, 5451, 793.
- Fukui, S. /1960/: *J. gen. Appl. Microbiol.*, Tokyo, 6, 270.
- Garcia Mendoza, C., and Villanueva, J.R. /1967/: *Biochem. Biophys. Acta.*, 135, 189-197.
- Garcia Mendoza, C., Gacia López, M.D. Uruburu, F. and Villanueva J.R. /1968/: *J. Bact.*, 95, 2393-2398.
- Gascón, S. and Villanueva, J.R. /1965/: *Nature*, 205, 822-823.
- Gupta, J.K., Das, N.B., Gupta, Y.P. /1972/: *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1961-1968.
- Gupta, J.K., Y.P. Gupta and Das, N.B. /1973/: *Agr. Biol. Chem.*, 37, /11/ 2657-2662.
- Halliwel, and Griffin M. /1973/: *Biochem. J.*, 135, 587-594.
- Javelkova, M., /1972/: *Protoplasma*, 75, 405-419.
- Hereida, C.F., Sols, A. and de la Fuente, G. /1968/: *Eur. J. Biochem.*, 5, 321-329.
- Heerter, H., Ottolenghi, P. /1960/: *C.R.Trav.Lab.Carlsberg.*, 31, 409-422.
- Kevei, F., Zsolt, J. and Ferenczy, L. /1972/: *Int. Symp. Yeast Protoplasts, Salamance, /1972/*
- Kinsky, S.C. /1963/: *Arch. Biochem. Biophys.*, 102, 180-188.
- Kuo, S.C. and Lampen, J.O. /1971/: *J. Bacteriol.*, 106, 183-191.
- Lampen, J.O., Arnow, P.M., Borowska, U. and Laskin, A.I. /1962/: *J. Bact.*, 84, 1152.
- Lillehoj, E.B., and Ottolenghi, P. /1967/: In "Symposium über Hefe-Protoplasten, Jena, 1965" /Ed.R.Müller/ p. 15. Akademie-Verlag, Berlin

- López-Salmonete, F., García Acha, I., and Villanueva, J.R.
/1966/: Gen. Microbiol., 44, 222-229.
- Mandels, M. and Reese, E.T. /1957/: J. Bact., 73, 269-276.
- Mandels, M. and Reese, E.T. /1960/: J. Bact., 79, 816.
- Mandels, M., Miller, G.L. and Slater, R.W. /1960/: Arch. Biochem.
Biophys., 91, 115.
- Mary Mandels, Weber, J., Parzen, R. /1971/: Appl. Micro. 152-154.
- Matile, Ph. /1969/: In "Symposium on Membranes, Structure
and Function" 4th FEBS Meeting, Madrid, 1969. /Eds. J.R.
Villanueva and Ponz., F./ Academic Press, London.
- Necas, O. and Havelkova, M. /1967/: In "Symposium Uber Reife-
Protoplasten, Jena, 1965" /Ed. R. Müller/, p. 55. Akademie-
Verlag, Berlin.
- Nickerson, W.J., and Falcone, G. /1956/: Science, 124, 722.
- Nisizawa, T. /1971/: J. Biochem., 70, 375-385.
- Nisizawa, T. /1971 B/: J. Biochem., 384-393.
- Novacz-Ledieu, M. and C. García Mendoza /1970/: J. Gen. Microbi-
ol., 61, 335-342.
- Reese, E.T., Parrish, F.W. and Mandels, M., /1961/: Canad. J.
Microbiol., 7, 309.
- Reese, E.T., Parrish, F.W. and Mandels, M. /1962/: Canad. J.
Microbiol., 8, 327.
- Rodríguez Aguirre, M.N. García Acha, I. and Villanueva, J.R.
/1964/: Antonie van Leeuwenhoek, 30, 33.
- Sentandreu, R., and Northcote, D.H. /1969/: J. gen. Micro-
biol., 55, 393-399.

- Sietsma, J.H. and W.R. de Boer /1973/: J.Gen.Microbiol. 74.
211-217.
- Strunk, Ch. /1966/: In "Symposium über Hefe-Protoplasten.
Jena, 1965" /Ed.R.Müller/.p. 213. Akademie-Verlag, Berlin.
- Suminane, K., and Duckmo, H. /1963/: J. Gen.Microbiol. 9.
243-345.
- Svihla, G., Schlenk, F. and Dainko, J.L. /1961/: J. Bact. 82.
808-814.
- Svihla, G. and Schlenk, F. /1967/: In "Symposium über Hefe-
Protoplasten, Jena, 1965" /Ed.R.Müller/.p. 15. Akademie-
Verlag, Berlin
- Svoboda, A., Farkas, V. and Baner, S. /1969/: Antonie van
Leeuwenhoek 35. 311.
- Villanueva, J.R. /1966/: In "The Fungi /Edit by Ainsworth,
G., C. and Sussmann, A.S./ Vol. 11. p. 3. /Akademic-Press,
London and New-York.
- Villanueva, J.R., Elorza, M.V., Monreal, J., and Uruburu, F.
/1969/: In "II. Symposium on Yeasts". Bratislava, 1966.
p. 203. /Ed. A. Kockova-Kratodhvilová /Vydavatelstvo Slo-
venskej Akademick-Vied.
- Villanueva, J.R. and Garcia Acha I. In "Methods in Microbio-
logy /Edit by Booth, C./ Vol. 4. 665. /Academic-Press, Lon-
don and New York, /1971/.
- de Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H. /1972/: J. of Gen. Mic-
robiol., 73. 13-22.
- de Vries, O.M.H. and Wessel, J.G.H. /1973/: J. of Gen. Micro-
biol., 76. 319-330.

de Vries, O.M.H. and Vessels, J.G.H. /1973/: *Antonie van
Leenwenhoek*, 39, 397-400.

de Vries, O.K.H.: Formation and cell wall regeneration of
Protoplasts from *Schizophyllum communis*. Proefschrift
/1974/

Weilbull, C. /1953/: *J. Bacteriol.*, 66, 688-695.

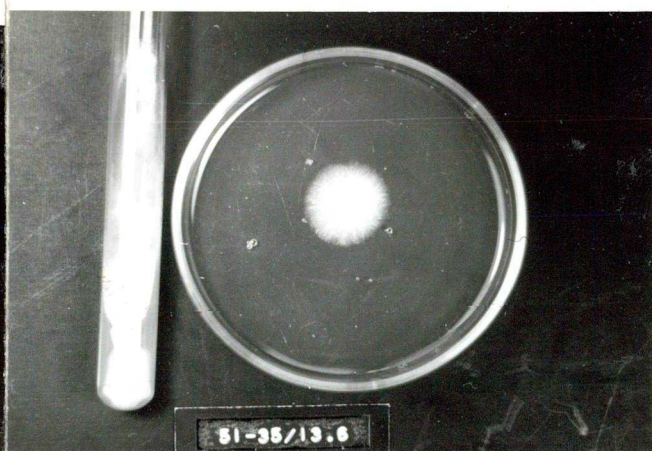
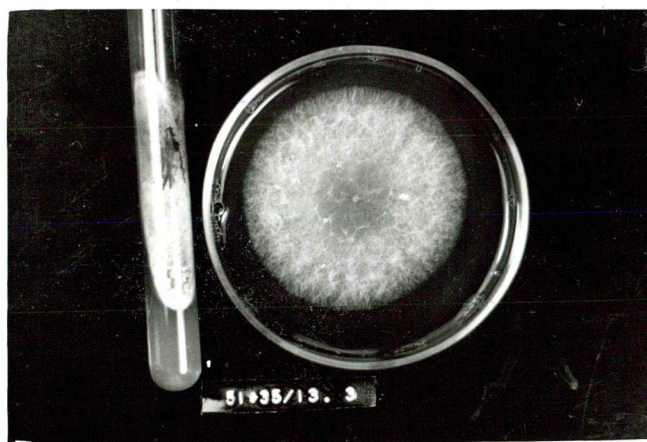
Köszönetet szeretnék mondani dr. Ferenczy Lajos egyetemi docensnek, a biológiai tudományok kandidátusának a kijelölt témaért, elméleti és gyakorlati vonatkozású tanácsaiért, a témavezetés során nyújtott messzemenő segítségért.

Negköszönöm a JATE, valamint az Élelmiszeripari Főiskola Mikrobiológia Tanszék kollektívájának támogatását.

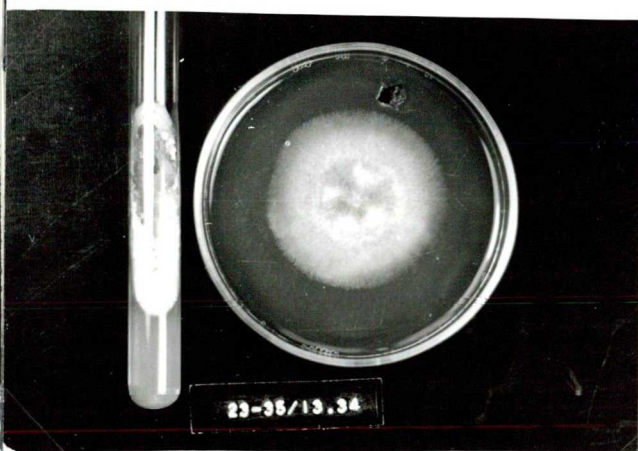
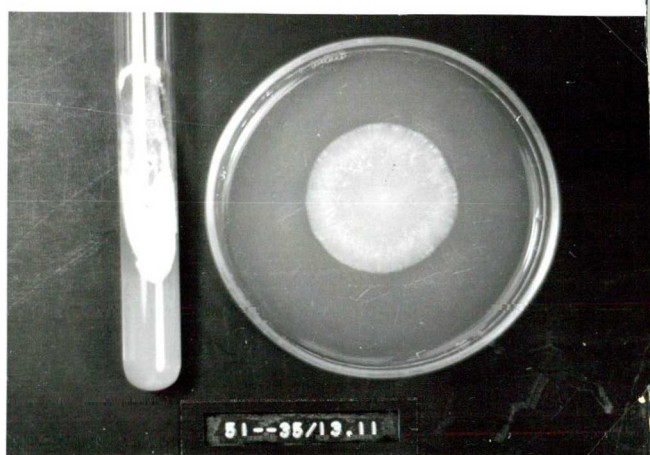
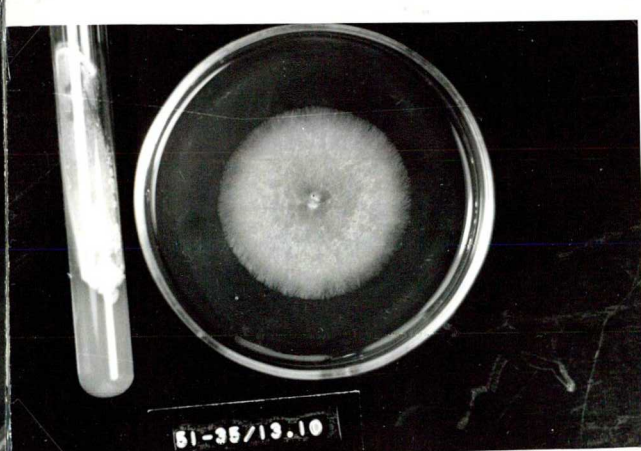
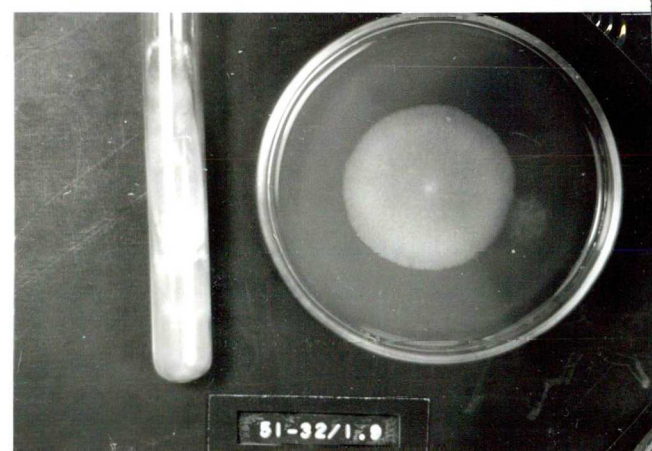
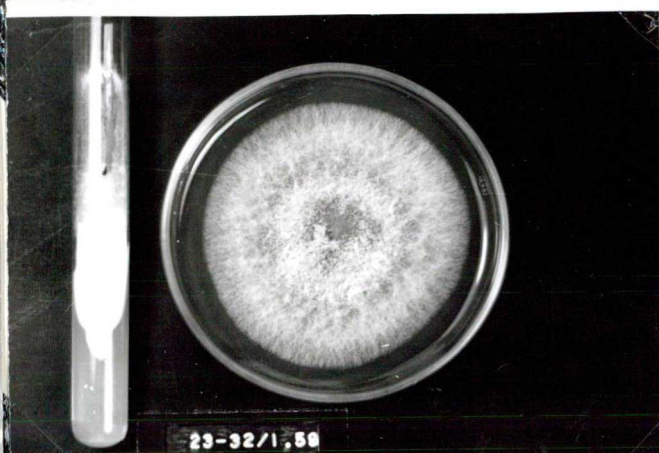
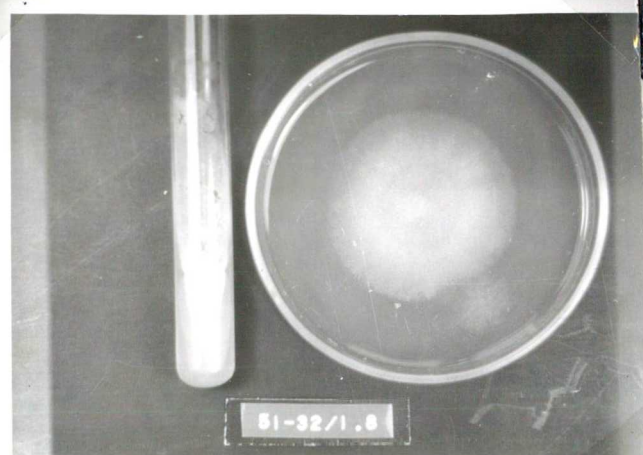


M E L L É K L E T E K

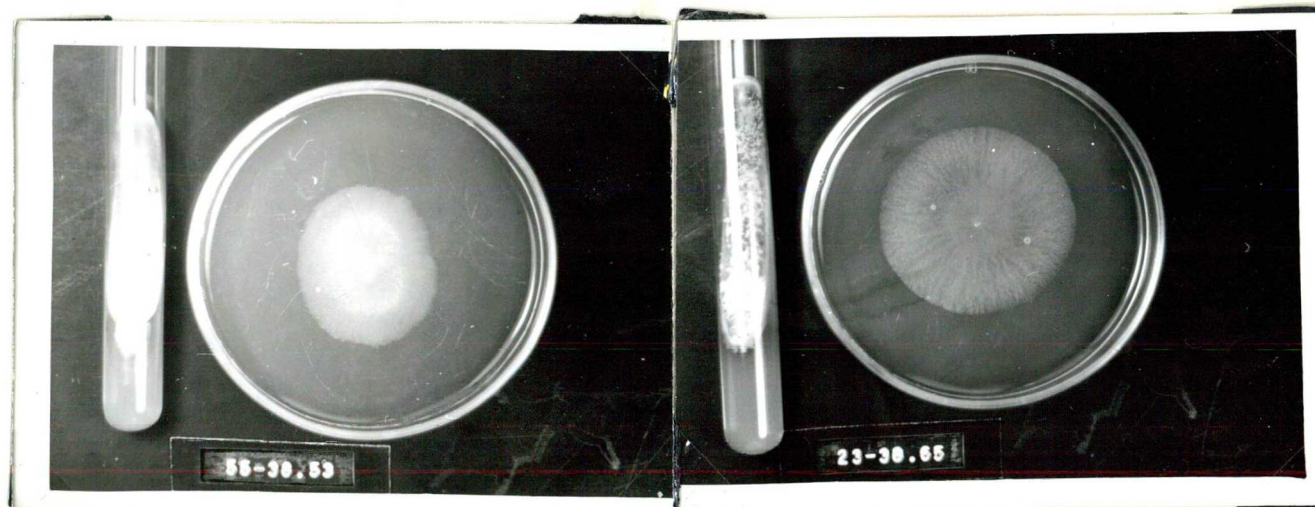
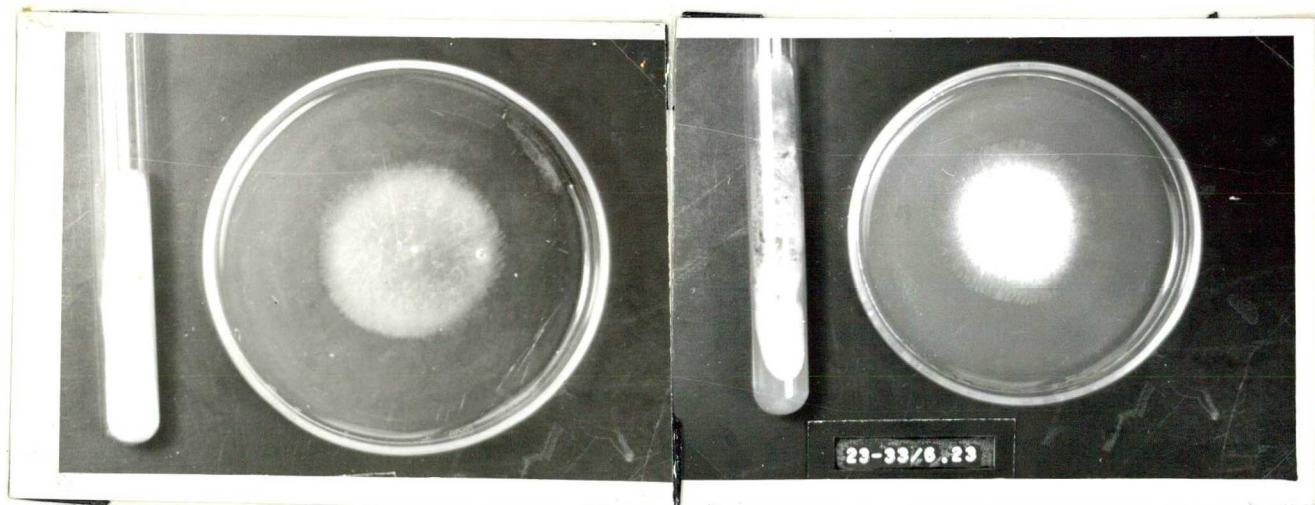
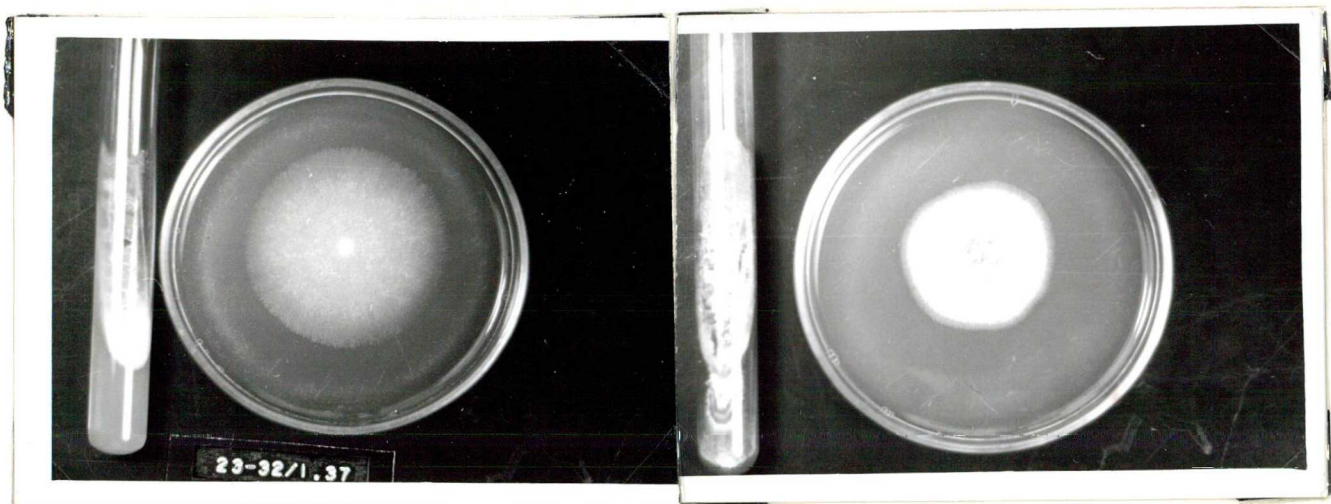
I. sz. melléklet



II. sz. melléklet



III. sz. melléklet



IV. sz. melléklet

