

KATARZYNA JANDA, JOACHIM FALKOWSKI, ANNA STOLARSKA

ZDOLNOŚĆ SZCZEPÓW TERMOFILNEGO GRZYBA *THERMOMYCES LANUGINOSUS* (SYN. *HUMICOLA LANUGINOSA*) DO HYDROLIZY OLEJU SŁONECZNIKOWEGO

Streszczenie

Celem niniejszej pracy była ocena zdolności szczepów termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* (syn. *Humicola lanuginosa*) do biosyntezy kompleksu egzoenzymów lipolitycznych. Materiał badawczy stanowiły 144 szczepy tego gatunku wyodrębnione z biohumusu, podłoża pieczarkowego, kompostu liściowego, kompostu ogrodowego, łuskanych orzechów laskowych oraz z surowego ziarna kawy. Hodowle prowadzono w temp. 55°C, na podłożu stałym z dodatkiem oleju słonecznikowego w ilości 1,5%. Jako indeks aktywności lipolitycznej przyjęto obliczony stosunek średnicy strefy hydrolizy do średnicy kolonii badanego szczepu (współczynnik R).

Badania dowiodły, że wszystkie szczepy wykazywały zdolność do hydrolizy oleju słonecznikowego. Najwyższą aktywnością lipolityczną charakteryzowały się szczepy wyodrębnione z biohumusu i surowego ziarna kawy, najniższą – szczepy pochodzące z kompostu liściowego i z łuskanych orzechów laskowych. Różnice te były statystycznie istotne. W przypadku szczepów o najwyższej aktywności lipolitycznej stwierdzono istotną ujemną korelację pomiędzy wielkościami kolonii tych szczepów, a ich aktywnością lipolityczną.

Słowa kluczowe: grzyby termofilne, *Thermomyces lanuginosus*, aktywność lipolityczna, olej słonecznikowy.

Wprowadzenie

Według ogólnie przyjętej definicji, grzyby termofilne są mikroorganizmami, których temperatura wzrostu i rozwoju zawiera się w przedziale od 20 do 50°C [3, 4]. Są to drobnoustroje, które wzbudziły zainteresowanie badaczy około 40 lat temu, głównie z powodu odkrycia ich zdolności do biosyntezy wielu egzoenzymów hydrolitycznych. [3, 4, 9, 10, 11].

Termostabilne enzymy znalazły zastosowanie w różnych procesach przemysłowych [2].

Ksylanazy stosuje się do biokonwersji materiałów lignocelulozowych, w produkcji rozpuszczalnych pulp oraz w procesie przygotowania pulp do wzmocnienia efektu bielienia w produkcji papieru [5, 17]. Amylazy stosowane są w produkcji żywności w procesach biotechnologicznych z wykorzystaniem skrobi [2, 14]. Lipazy mikrobiologiczne wykorzystuje się natomiast do otrzymywania wolnych kwasów tłuszczowych z naturalnych trójglicerydów, które z kolei znajdują zastosowanie jako preparaty w medycynie i przemyśle, a także dodawane są do pasz dla zwierząt [2, 16]. Enzymy lipolityczne znajdują również zastosowanie w utylizacji odpadów przemysłu tłuszczowego oraz są dodawane do detergentów [1, 2, 5, 7, 14].

Jednym z najczęściej występujących grzybów termofilnych jest *Thermomyces lanuginosus* (syn. *Humicola lanuginosa*). Szczepy tego gatunku charakteryzują się najwyższą wśród grzybów maksymalną temp. wzrostu, wynoszącą 60°C. Ich występowanie stwierdzono m.in. w glebach różnych stref klimatycznych, kompostowanej materii organicznej, w powietrzu oraz ziarnach zbóż, kukurydzy, orzechach i nasionach. Charakterystyka tego gatunku obejmująca jego występowanie oraz właściwości biochemiczne znajduje się w opracowaniu Jandy i Falkowskiego [9].

Celem niniejszej pracy była ocena zdolności szczepów *Thermomyces lanuginosus* wyodrębnionych z różnych środowisk do hydrolizy oleju słonecznikowego. Podjęto również próbę określenia, czy istnieją różnice w aktywności lipolitycznej szczepów wynikające z miejsca ich izolacji.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły 144 szczepy termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* wyodrębnione z różnych substratów naturalnych. Do badania aktywności lipolitycznej zastosowano podłoże stałe według Kunert i Lysek [12], do którego dodano 1,5% oleju słonecznikowego. Wartość pH pożywki wynosiła 6,5. Podłoże na płytkach inokulowano fragmentem grzybni powietrznej, pochodzącej z dojrzałej pięciodobowej hodowli i inkubowano w temp. 55°C przez 168 godz. Badania prowadzono w trzech powtórzeniach.

Efekt hydrolizy oleju słonecznikowego przez egzoenzymy lipolityczne badanych szczepów przejawiał się zmianą barwy pożywki wokół kolonii grzyba z zielonkawej na niebiesko-granatową. Przyczyną tego zjawiska były uwolnione przez kompleks enzymów lipolitycznych kwasy tłuszczowe, które obniżały wartość pH środowiska i prowadziły do zmiany zabarwienia podłoża [12, 13]. Jako wskaźnik aktywności lipolitycznej przyjęto współczynnik R – stosunek średnicy strefy hydrolizy, przejawiającej się zmianą zabarwienia podłoża, do średnicy kolonii badanego szczepu [6, 7].

Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji. Do obliczenia najmniejszej istotnej różnicy, przy $p = 0,05$ zastosowano test Tukey'a. Znajomość najmniejszej istotnej różnicy umożliwiła tworzenie grup jednorodnych, w obrębie których znalazły się wartości nieróżniące się między sobą istotnie. Współczynniki korelacji oraz równania regresji wyliczono za pomocą programu statystycznego Statistica.

Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania dowiodły, że wyodrębnione szczepy charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością lipolityczną (tab. 1).

Tabela 1

Wartości indeksu aktywności lipolitycznej szczepów hodowanych na podłożu z dodatkiem oleju słonecznikowego.

Average indices of the lipolytic activity of strains incubated on the medium with sunflower oil added.

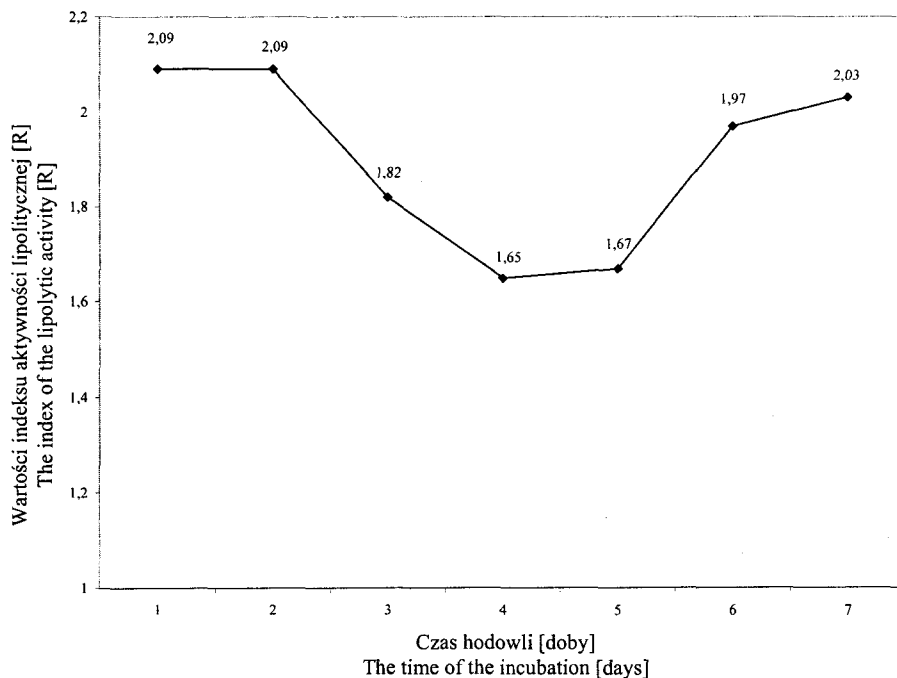
Źródło wyodrębnienia szczepów Source of isolating the strains	Wartość indeksu aktywności lipolitycznej (R) The index of the lipolytic activity (R)	Grupy jednorodne NIR _{0,05} = 0,26 The homogeneous groups
Biohumus Biohumus	2,34	a
Surowe ziarno kawy Raw coffee beans	2,22	a b
Podłoże pieczarkowe Mushroom compost	1,98	b
Kompost ogrodowy Garden compost	1,97	b
Kompost liściowy Leaf compost	1,53	c
Orzechy laskowe Hazelnuts	1,38	c

W badaniach wykazano, że najwyższą wartość indeksu aktywności lipolitycznej w czasie hodowli na podłożu z olejem słonecznikowym równą 2,34 osiągnęły szczepy wyodrębnione z biohumusu. Zbliżoną wartością równą 2,22 charakteryzowały się szczepy pochodzące z surowego ziarna kawy. Wartości te stanowiły grupę jednorodną i nie stwierdzono między nimi statystycznie istotnych różnic.

Najmniejszą wartość indeksu aktywności lipolitycznej równą 1,38 osiągnęły szczepy pochodzące z orzechów laskowych. Szczepy wyodrębnione z kompostu liściowego charakteryzowały się wartością indeksu aktywności lipolitycznej równą 1,53. Obie te wartości stanowiły grupę jednorodną. Pośrednie wartości indeksu aktyw-

ności lipolitycznej, wynoszące 1,98 i 1,97, uzyskały odpowiednio szczepy pochodzące z podłoża pieczarkowego oraz szczepy wyizolowane z kompostu ogrodowego i wspólnie z wartością charakteryzującą aktywność lipolityczną szczepów wyodrębnionych z surowego ziarna kawy stanowiły grupę jednorodną.

Zmiany wartości indeksu aktywności lipolitycznej wyodrębnionych szczepów w czasie siedmiodobowej hodowli na pożywce z olejem słonecznikowym przedstawiono za pomocą krzywej na rys. 1.



Rys. 1. Zmiany wartości indeksu aktywności lipolitycznej szczepów *Thermomyces lanuginosus* w czasie hodowli na podłożu z dodatkiem oleju słonecznikowego.

Fig. 1. Changes in the indices of the lipolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* strains incubated on the medium with sunflower oil added

Niezależnie od pochodzenia szczepów krzywe miały zbliżony charakter, dlatego też tendencję tę przedstawiono w postaci jednej krzywej. Wartości na niej przedstawione są reprezentatywne dla badanej populacji *Thermomyces lanuginosus*.

Najwyższe wartości indeksu aktywności lipolitycznej badane szczepy osiągnęły w pierwszej i drugiej dobie hodowli, najniższe – w czwartej dobie. Różnica między tymi wartościami była statystycznie istotna.

W czasie hodowli na podłożu z dodatkiem oleju słonecznikowego badane szczepy tworzyły kolonie o zróżnicowanych średnicach (tab. 2).

Tabela 2

Średnice kolonii tworzonych przez badane szczepy w czasie hodowli na podłożu z dodatkiem oleju słonecznikowego.

The diameters of the colonies formed by the investigated strains on the medium with sunflower oil.

Źródło wyodrębnienia szczepów Source of isolating the strains	Średnice kolonii [mm] Diameters of colonies [mm]	Grupy jednorodne NIR _{0,05} = 2,0 Homogeneous groups LSD _{0,05} = 2,0
Orzechy laskowe Hazelnuts	29,79	a
Surowe ziarno kawy Raw coffee beans	17,60	b
Podłoże pieczarkowe Mushroom compost	17,28	b
Kompost liściowy Leaf compost	17,36	b
Biohumus Biohumus	16,31	b
Kompost ogrodowy Garden compost	13,68	c

Na podstawie badań wykazano, że kolonie o największych średnicach, wynoszących średnio 29,79 mm, osiągnęły szczepy wyodrębnione z orzechów laskowych. Wartość ta różniła się istotnie od wielkości kolonii tworzonych przez pozostałe szczepy.

Najmniejsze kolonie o średnicy 13,68 mm tworzyły szczepy wyizolowane z kompostu ogrodowego. Ta wartość także różniła się istotnie od wielkości kolonii charakteryzujących pozostałe szczepy. Wartości pośrednie, stanowiące grupę jednorodną, uzyskały szczepy wyodrębnione z ziarna kawy, które tworzyły kolonie o średnicy 17,60 mm, szczepy pochodzące z kompostu liściowego, osiągające kolonie o średnicy 17,36 mm, szczepy wyizolowane z podłoża pieczarkowego, osiągające wielkość kolonii 17,28 mm oraz szczepy wyodrębnione z biohumusu, które tworzyły kolonie o średnicy 16,31 mm.

Tylko w trzech przypadkach stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy wielkością kolonii badanych szczepów a ich aktywnością lipolityczną (tab. 3). Warto również podkreślić, że tylko w jednym przypadku, dotyczącym szczepów pochodzących z kompostu ogrodowego, stwierdzono istotną i dodatnią korelację.

W przypadku szczepów wyodrębnionych z biohumusu oraz z surowego ziarna kawy korelacja była istotna, lecz ujemna, co oznacza, że im średnice kolonii były większe, tym aktywność lipolityczna tych szczepów była mniejsza.

Tabela 3

Zależności między wielkością kolonii badanych szczepów (y) a wartościami indeksu aktywności lipolitycznej (x) oraz obliczone współczynniki korelacji (r).

Correlation between the diameters of the colonies (y) and the index of the lipolytic activity (x).

Źródło wyodrębnienia szczepów Source of isolating the strains	Równanie regresji Regression equation	Współczynnik korelacji Correlation factor
Biohumus Biohumus	$y = -0,0252 x + 2,7557$	$r = -0,51^*$
Surowe ziarno kawy Raw coffee beans	$y = -0,0636 x + 3,3390$	$r = -0,65^*$
Podłoże pieczarkowe Mushroom compost	$y = 0,00501 x + 1,8907$	$r = 0,13$
Kompost ogrodowy Garden compost	$y = 0,03328 x + 1,5104$	$r = 0,52^*$
Kompost liściowy Leaf compost	$y = 0,1399 x + 1,2890$	$r = 0,34$
Orzechy laskowe Hazelnuts	$y = -0,0055 x + 1,5429$	$r = -0,15$

* – współczynniki korelacji istotne na poziomie $\alpha \leq 0,05$;

* – Regressions factor appearing significant at a level of $\alpha \leq 0.05$.

Badania te są potwierdzeniem doniesień literatury, wskazujących na to, że nie można na podstawie wielkości kolonii wnioskować o aktywności enzymatycznej szczepów [6, 7].

Wnioski

1. Wszystkie wyodrębnione szczepy *Thermomyces lanuginosus* zdolne były do hydrolizy oleju słonecznikowego w temp. 55°C.
2. Najwyższą aktywnością lipolityczną charakteryzowały się szczepy wyodrębnione z biohumusu i z surowego ziarna kawy.
3. Stwierdzono różnice w aktywności lipolitycznej szczepów termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* wynikające z ich pochodzenia.
4. Niezależnie od źródła wyodrębnienia, badane szczepy osiągały maksymalne wartości indeksu aktywności lipolitycznej w pierwszej i drugiej dobie hodowli.
5. Tylko w trzech przypadkach stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy wielkością kolonii badanych szczepów a ich aktywnością lipolityczną. W odniesieniu do szczepów, które osiągały najwyższe wartości indeksu aktywności lipolitycznej stwierdzono korelację istotną, lecz ujemną.

Literatura

- [1] Abbas H., Hiol A., Deyris V., Comeau L.: Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 968-975.
- [2] Bednarski W., Rejs A. (red.): *Biotechnologia żywności*. WNT, Warszawa 2001.
- [3] Bilaj T.I.: *Tiermostabilnyje fermenty grzybów*. Izd. Naukowa Dumka, Kijew 1979.
- [4] Bilaj T.I., Zacharczenko W.A.: *Opriebieliteli termofilnych grzybów*. Izd. Naukowa Dumka, Kijew 1987.
- [5] Elimer E., Miśkiewicz T., Kwaśnik J.: Możliwości wykorzystania ubocznych i odpadowych produktów przemysłu tłuszczowego metodą mikrobiologiczną. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1989, **11-12**, 8-10.
- [6] Hornecka D., Ilnicka-Olejniczak O., Solak G.: Selekcja i izolacja wysokowydajnych szczepów wytwarzających enzymy. Cz. IV. Szybka metoda selekcji wysokowydajnych szczepów wytwarzających enzymy proteolityczne. *Prace Instytutów i Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 1984, **38**, 27-35.
- [7] Ilnicka-Olejniczak O., Hornecka D., Solak G.: Selekcja i izolacja wysokowydajnych szczepów wytwarzających enzymy. Cz. I. Szybka metoda selekcji wysokowydajnych szczepów wytwarzających glukoamylaze. *Prace Instytutów i Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 1983, **37**, 47-59.
- [8] Jaeger K.E., Reetz M.T.: Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *TIBITECH SEPTEMBER*, 1998, **16**, 396-403.
- [9] Janda K., Falkowski J.: Grzyby termofilne – występowanie, właściwości biochemiczne i temperatury kardynalne. *Post. Mikrobiol.*, 2001, **40 (3)**, 287-310.
- [10] Janda K., Falkowski J.: Termofilny grzyb *Thermomyces lanuginosus*: występowanie i właściwości. *Post. Mikrobiol.*, 2003, **42 (1)**, 55-66.
- [11] Kristjanson J.K.: Thermophilic organisms as a source of thermostable enzymes. *Trends in Biotechnology*, 1989, **7**, 349-353.
- [12] Kunert J., Lysek H.: Lipolytic activity of ovidicial soil fungi. *Biologia*, 1987, **42**, 285-290.
- [13] Lawrence R.C.: Microbial lipases and related esterases. Part. I. Detection, distribution and production of microbial lipases. Part. II. Estimation of lipase activity. Characterization of lipases. Recent work concerning their effect on dairy products. *Dairy Sci. Abstr.*, 1967, **29 (1)**, 1-8, (2), 59-70.
- [14] Nigam P., Singh D.: Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.*, 1995, **17**, 770-778.
- [15] Reetz M.T.: Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, **6**, 145-150.
- [16] Ruban E.L.: *Mikrobnnye lipidy i lipazy*. Izd. Naukowa Dumka, Kijew 1977.
- [17] Singh S., Pillay B., Prior B.A.: Thermal stability of beta-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **26**, 502-508.

A STUDY ON THE ABILITY OF THE STRAINS OF A *THERMOMYCES LANUGINOSUS* (SYN. *HUMICOLA LANUGINOSA*) THERMOPHILIC FUNGUS TO HYDROLYZE SUNFLOWER OIL

S u m m a r y

The objective of this study was to estimate the ability of a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* (syn. *Humicola lanuginosa*) to biosynthesize lipolytic enzymes. The material investigated consisted of 144 strains of this fungus that was isolated from various sources: mushroom compost, garden compost, leaf compost, biohumus, hazelnuts, and raw coffee beans. The strains were incubated at 55°C on

a solid medium containing 1.5% of sunflower oil. The study proved that all tested strains were able to hydrolyze the sunflower oil contained in the medium. The strains isolated from the biohumus and raw coffee beans showed the highest lipolytic activity whereas the strains isolated from the leaf compost and shelled hazelnuts had the lowest lipolytic activity. As for the strains showing the highest lipolytic activity, a significantly negative correlation between the diameters of their colonies and their lipolytic activity was stated.

Key words: thermophilic fungi, *Thermomyces lanuginosus*, lipolytic activity, sunflower oil. ☒

FUNDACJA CZŁONKÓW WYDZIAŁU NAUK ROLNICZYCH,
LEŚNYCH I WETERYNARYJNYCH POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Pro Scientia et Vita

Ogłasza II KONKURS na

- nagrody naukowe za rok 2003 z zakresu nauk rolniczych, leśnych, weterynaryjnych i o żywności oraz
- dofinansowanie udziału w międzynarodowych kongresach (sympoziach) naukowych w 2004 r.

Podstawowym wymogiem udziału w konkursie jest nieprzekroczony 35. rok życia oraz osiągnięcia badawcze i aktywna działalność w środowisku naukowym i naukowo-technicznym.

Regulamin przyznawania nagród oraz dofinansowania udziału w kongresach, terminy oraz informacje o fundacji znajdują się na stronie internetowej:

www.pan.pl/fundacja_psv

Adres do korespondencji:

„Pro Scientia et Vita”

Fundacja Członków Wydziału Nauk

Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych

Polskiej Akademii Nauk

Pałac Kultury i Nauki, pok. 2002

00-901 Warszawa