

JOACHIM FALKOWSKI, BARBARA JAKUBOWSKA, KATARZYNA JANDA

OCENA WYSTĘPOWANIA GRZYBÓW TERMOFILNYCH W SUROWYM
ZIARNIE KAWY

THE ESTIMATION OF THE APPEARANCE OF THE THERMOPHILIC
MYCOFLORA IN THE RAW COFFEE BEANS

Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa,
Pracownia Mikrobiologii i Higieny Żywności, Akademia Rolnicza
71–434 Szczecin, ul. Słowackiego 17
tel. (091) 42 50 253
fax.: (091) 487 19 62
e mail: przechow@agro.ar.szczecin.pl
Kierownik: prof. dr hab. J. Falkowski

Jednym z naturalnych środowisk grzybów termofilnych są składowane produkty organiczne, między innymi tytoń, ziarno kakaowe, zbóż, kukurydzy, nasiona roślin strączkowych, słoma, siano. W dostępnej literaturze nie spotkano danych na temat występowania tej grupy drobnoustrojów w surowym ziarnie kawy. W związku z powyższym podjęto badania, celem których była próba wyodrębnienia grzybów termofilnych z importowanego surowego ziarna kawy.

WSTĘP

Według Cooney i Emerson grzyby termofilne są drobnoustrojami, których minimalną temperaturą wzrostu i rozwoju jest 20°C, zaś temperatura maksymalna wynosi 50°C [2, 3]. Wzmoczone badania, poświęcone tym drobnoustrojom, prowadzone są zaledwie od około 30 lat. Przyczyną zwiększonego zainteresowania grzybami termofilnymi było odkrycie, że charakteryzują się one zdolnością do biosyntezy szeregu egzoenzymów hydrolitycznych i dzięki temu istnieją potencjalne możliwości ich wykorzystania w przemyśle [2, 4, 5, 9]. Rozwój grzybów termofilnych w produktach organicznych może prowadzić do szeregu zmian prowadzących do pogorszenia ich jakości. Tego typu zjawiska nasilają się w przypadkach, gdy nie są spełnione optymalne warunki przechowywania składowanych produktów roślinnych. Grzyby termofilne izolowano ze zróżnicowanych środowisk, między innymi z różnego pochodzenia składowanych mas organicznych (komposty, siano, słoma i inne), gleby, powietrza, gorących źródeł, piór ptaków z Antarktyki, czy z paliwa lotniczego [2, 3, 6, 11, 12, 13]. Jeżeli chodzi o jadalne surowce roślinne to grzyby termofilne wyodrębniono z ziarna kukurydzy, ziarna zbóż, orzechów włoskich, arachidowych, i laskowych, kwaśnego mleka, owoców palm olejowych [1, 2, 3, 8, 11, 12, 13, 14, 15]. Nie spotkano w dostępnej literaturze doniesień o wyizolowaniu grzybów termofilnych z surowego ziarna kawy. Kawa (*Coffea* sp.) uprawiana jest w klimacie sprzyjającym rozwojowi tej grupy drobnoustrojów, w związku

z czym stanowić może potencjalne ich źródło. Obecność grzybów termofilnych w surowym ziarnie kawy może przyczyniać się do pogorszenia się jakości ziarna podczas transportu czy przechowywania.

Celem pracy była próba wyodrębnienia grzybów termofilnych z prób importowanego surowego ziarna kawy oraz identyfikacja wyizolowanych szczepów.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły 24 próby surowego ziarna kawy, pochodzące z 12 krajów Afryki, Ameryki Środkowej i Azji.

Do izolacji szczepów grzybów termofilnych wykorzystano podłoże RBA (Rose Bengal Agar) z dodatkiem streptomycyny i rózu bengalskiego, które hamowały rozwój bakterii i przyczyniały się tym samym do łatwiejszej izolacji czystych kultur grzybowych [7]. Po zestaleniu podłoża na każdej płytce wykładano po 10 ziaren w taki sposób, aby nie dopuścić do ich zetknięcia. Łącznie wykładano po 100 ziaren z każdej próby. Wyrastające kolonie przesiewano na podłoże PDA (Potato Dextrose Agar) [7]. Inkubacje prowadzono w temperaturze 50°C przez okres 5 – 7 dni. Systematycznie dokonywano obserwacji makro – i mikroskopowych rosnących kolonii. Identyfikację grzybów przeprowadzono w oparciu o metody zawarte w literaturze [2, 3, 12]. Czyste kultury przesiewano na skosy agarowe i przechowywano w temperaturze 4°C.

WYNIKI

Przeprowadzone badania dowiodły, że surowe ziarno kawy jest bogatym źródłem grzybów termofilnych. Łącznie z 24 przebadanych próbek wyodrębniono 270 szczepów, należących do tej grupy drobnoustrojów. Szczegółowe dane dotyczące liczby badanych próbek pochodzących z poszczególnych krajów oraz ilości wyodrębnionych szczepów przedstawiono w tabeli I.

Dane zawarte w tabeli I wykazały, że najbogatszym źródłem grzybów termofilnych było ziarno kawy pochodzące z Indonezji, z którego wyodrębniono 151 szczepów oraz z Ekwadoru – 81 szczepów. Ilości te stanowią udział odpowiednio 55,9% oraz 30,0% z ogólnej liczby wyodrębnionych szczepów. Zwraca jednak uwagę fakt, że z Indonezji przebadano sześć próbek, zaś z Ekwadoru zaledwie jedną. Żadnej mykoflory termofilnej nie wyodrębniono z próbki pochodzącej z Madagaskaru oraz z jednej z próbek z Laosu.

Przeprowadzona identyfikacja czystych kultur wykazała, że wyizolowane szczepy należały do różnych jednostek taksonomicznych. Skład jakościowy wyizolowanej mykoflory termofilnej odzwierciedla tabela II.

Z danych umieszczonych w tabeli II wynika, że zdecydowaną większość spośród 270 wyodrębnionych szczepów stanowiło 240 z nich należących do gatunku *Thermomyces lanuginosus* (syn. *Humicola lanuginosa*). Udział szczepów tego gatunku w ogólnej liczbie wyodrębnionych szczepów wyniósł 88,9%. Szczepy *Thermomyces lanuginosus* stanowiły zdecydowaną większość we wszystkich próbach, zaś monokulturę w przypadku próbek pochodzących z Ekwadoru, Ugandy, Wietnamu i Zimbabwe. Pozostałe szczepy, stanowiące 11,1% spośród wyizolowanych szczepów należały do gatunków *Talaromyces thermophilus* (syn. *Penicillium dupontii*) – 8 szczepów, *Talaromyces emersonii* (syn. *Penicillium emersonii*) – 9 szczepów oraz dwóch gatunków niezidentyfikowanych – 13 szczepów.

Tabela I. Pochodzenie surowego ziarna kawy oraz liczby próbek badanych z poszczególnych krajów.

The origin of the raw coffee beans and the quantity of the samples tested from individual countries.

L.p.	Pochodzenie surowego ziarna kawy	Liczba próbek	Liczba wyodrębnionych szczepów	Udział mykoflory wyodrębnionej z poszczególnych krajów
1.	Indonezja	6	151	55,9%
2.	Ekwador	1	81	30,0%
3.	Gwatemala	2	13	4,8%
4.	Kostaryka	3	7	2,6%
5.	Uganda	2	6	2,2%
6.	Kamerun	1	3	1,1%
7.	Kenia	1	2	0,7%
8.	Laos	3	2	0,7%
9.	Malawi	2	2	0,7%
10.	Zimbabwe	1	2	0,7%
11.	Wietnam	1	1	0,4%
12.	Madagaskar	1	0	0,0%
SUMA		24	270	100,0%

Tabela II. Skład jakościowy wyizolowanej mykoflory termofilnej.

The qualitative composition of the isolated thermophilic mycoflora.

L.p.	Kraj	Nr próbki	Porażenie próbki (%)	A	B	C	D	
1.	Ekwador	5	81	81	–	–	–	–
2.	Gwatemala	7a	6	5	–	–	–	1
		7b	7	–	–	5	2	–
3.	Indonezja	1a	51	49	2	–	–	–
		1b	10	8	–	–	2	–
		1c	4	3	1	–	–	–
		1d	39	39	–	–	–	–
		1e	2	–	–	–	2	–
		1f	45	45	–	–	–	–
4.	Kamerun	9	3	–	–	2	1	–
5.	Kenia	12	2	–	1	1	–	–
6.	Kostaryka	4a	2	1	1	–	–	–
		4b	4	–	2	–	1	1
		4c	1	–	–	–	–	1

Tabela II cd.

L.p.	Kraj	Nr próbki	Porażenie próbki (%)	A	B	C	D	
7.	Laos	2a	1	–	–	1	–	–
		2b	0	–	–	–	–	–
		2c	1	–	–	–	–	1
8.	Madagaskar	11	0	–	–	–	–	–
9.	Malawi	8a	1	–	1	–	–	–
		8b	1	–	–	–	–	1
10.	Uganda	6a	2	2	–	–	–	–
		6b	4	4	–	–	–	–
11.	Wietnam	3	1	1	–	–	–	–
12.	Zimbabwe	10	2	2	–	–	–	–
SUMA				240	8	9	8	5
Udział gatunku w ogólnej liczbie wyodrębnionych szczepów				88,9%	3,0%	3,3%	3,0%	1,8%

A – *Thermomyces lanuginosus*, B – *Talaromyces themophilus*, C – *Talaromyces emersoni*,
D – gatunki niezidentyfikowane

DYSKUSJA

Przedstawione wyniki badań wskazują, że surowe ziarno kawy stanowić może bogate źródło mykoflory termofilnej. Zwraca uwagę fakt, że nawet próby pochodzące z jednego kraju różnią się między sobą zarówno stopniem porażenia, jak i składem jakościowym występujących grzybów termofilnych. Autorzy przypuszczają, że próbując wyjaśnić to zjawisko należałoby wziąć pod uwagę wiele czynników, które mogą mieć wpływ na kształtowanie się zarówno liczebności, jak i składu jakościowego mykoflory termofilnej. Do czynników tych zaliczyć należy między innymi uwarunkowania klimatyczne panujące w miejscu uprawy kawy (przede wszystkim temperaturę i wilgotność powietrza), stanowisko uprawy (teren odsłonięty czy otoczony roślinnością), rodzaj gleby, obecność innych drobnoustrojów, czy wreszcie miejsce i warunki składowania oraz transportu.

W większości badanych prób gatunkiem zdecydowanie dominującym był *Thermomyces lanuginosus*. Fakt ten potwierdza doniesienia badaczy grzybów termofilnych, wskazujących że gatunek ten należy do najbardziej rozpowszechnionych grzybów termofilnych [2, 13].

Brak jakiegokolwiek mykoflory termofilnej w dwóch próbach skłania do zastanowienia, co mogło być tego przyczyną. *Kuthubuthen i Pugh* [10] donoszą, że grzyby termofilne są wrażliwe na działanie herbicydów. Zdaniem tych autorów jednym z najwrażliwszych gatunków jest *Thermomyces lanuginosus*. Można więc przypuszczać, że niektóre z prób poddane były zabiegom – fizycznym lub chemicznym, mającym na celu wyeliminowanie drobnoustrojów mogących przyczynić się do pogorszenia jakości ziarna podczas składowania i transportu. W związku z powyższym być może uzasadnione

byłoby podjęcie badań, mających na celu określenie w nich ewentualnych pozostałości środków chemicznych.

Propozycja taka wydaje się to celowa tym bardziej, że podobne rezultaty (brak jakiegokolwiek mykoflory termofilnej) otrzymano podczas prób izolacji grzybów termofilnych z innych importowanych surowców spożywczych, między innymi z rodzynek czy orzechów arachidowych (dane niepublikowane – badania w toku).

WNIOSKI

1. Spośród przebadanych 24 próbek surowego ziarna kawy pochodzącego z 12 krajów wyizolowano łącznie 270 szczepów grzybów termofilnych, należących do różnych jednostek taksonomicznych.

2. Najbardziej zanieczyszczona próbka, która porażona była w 81%, pochodziła z Ekwadoru i zasiedlona była wyłącznie szczepami należącymi do gatunku *Thermomyces lanuginosus*.

3. Najbogatszym źródłem grzybów termofilnych okazało się ziarno pochodzące z Indonezji – 151 szczepów oraz z Ekwadoru – 81 szczepów.

4. Najliczniej reprezentowanym gatunkiem był *Thermomyces lanuginosus*, którego 240 szczepów stanowiło 88,9% ogólnej liczby wyodrębnionych szczepów.

Joachim Falkowski, Barbara Jakubowska, Katarzyna Janda

THE ESTIMATION OF THE APPEARANCE OF THE THERMOPHILIC MYCOFLORA IN THE RAW COFFEE BEANS

SUMMARY

The purpose of the study was the attempt of the isolation of the thermophilic fungi from raw coffee beans. The material constituted of 24 coffee beans samples came from 12 countries. The isolation and the identification of the thermophilic fungi was conducted according to *Bitaj* [2], *Bitaj* and *Zacharczenko* [3]. The study proved, that raw coffee beans were the rich source of the thermophilic mycoflora. From all tested samples 270 species were isolated. The most refused sample came from Ecuador – 81% coffee beans were infected. The most of species (90% from among isolated) were species belonged to the *Thermomyces lanuginosus*.

PIŚMIENNICTWO

1. *Abdel-Hafez A.I., Saber S.M.*: Mycoflora and mycotoxin of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and walnut (*Juglans regia* L.) seeds in Egypt. Zentralblatt Mikrobiologie 1993, 148, 137–147.
2. *Bitaj T.I.*: Tiermostabilnyje fermenty gribow. Izd. Naukowa Dumka, Kijew 1979.
3. *Bitaj T.I., Zacharczenko W.A.*: Opriebielitiel termofilnych gribow. Izd. Naukowa Dumka, Kijew 1987.
4. *Coronel L.M., Joson L.M., Mesina O.G.*: Isolation and screening of thermophilic fungi for cellulase production. Philippine J. Science 1991, 120, 379–389.
5. *Da Silva R., Yim D.K., Park Y.K.*: Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp. for pulp improvement. J. Ferment. Bioeng. 1994, 77, 10–111.
6. *Del Fratte G., Caretta G.*: Fungi isolated from Antarctic material. Polar Biol. 1990, 11, 1–7.
7. *Harrigan W.F., McCance M.E.*: Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London-New York 1976.
8. *Hocking A.D., Pitt J.I.*: Food spoilage fungi. II. Heat resistant fungi. Food Res. 1984, 44, 73–82.

9. Kristjanson J.K.: Thermophilic organisms as source of thermostable enzymes. Trends in Biotechnology 1989, 7, 349–353.
10. Kuthubuthen A.J., Pugh G.J.F.: The effect of fungicides on the growth rates of thermophilous fungi. Mycopathologia 1977, 62, 67–76.
11. Lacey J.: Potential hazards to animal and man from microorganisms in fodders and grain. Trans. Br. Mycol. Soc. 1975, 65, 171–184.
12. Mouchacca J.: Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. Cryptogamie, Mycol 1997, 18, 19–69.
13. Shekhar-Sharma H.S.: Economic importance of thermophilous fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989, 31, 1–10.
14. Shekhar-Sharma H.S., Johri B.N.: The role of thermophilic fungi in agriculture. Handbook of Applied Mycology, vol. 4.: Fungal Biotechnology 1992, 707–728.
15. Wareing P.: Incidence and detection of thermotolerant and thermophilic fungi from maize with particular reference to *Thermoascus* species. Int. J. Food Microbiol. 1997, 35, 137–145.

Otrzymano: 2001.09.28