

KATARZYNA JANDA

BADANIE ZDOLNOŚCI SZCZEPÓW TERMOFILNEGO GRZYBA  
*THERMOMYCES LANUGINOSUS* DO HYDROLIZY TŁUSZCZU KAKAOWEGO  
ORAZ SMALCU

THE ESTIMATION TO THE ABILITY OF THE STRAINS OF THE THERMOPHILIC  
FUNGUS *THERMOMYCES LANUGINOSUS* TO THE HYDROLYSIS THE COCOA FAT  
AND THE LARD

Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa  
Pracownia Higieny Żywności i Mikrobiologii, Akademia Rolnicza  
71-434 Szczecin, ul. Słowackiego 17  
e-mail: [przechow@agro.ar.szczecin.pl](mailto:przechow@agro.ar.szczecin.pl)  
Kierownik: prof. dr hab. J. Falkowski

*Thermomyces lanuginosus* jest jednym z najpowszechniej występujących w przyrodzie grzybów termofilnych. Badania dowodzą, że szczepy tego gatunku zdolne są do biosyntezy wielu enzymów hydrolitycznych. Prace określające aktywność lipolityczną szczepów tego gatunku prowadzone były najczęściej na podłożu z dodatkiem oliwy z oliwek. Celem niniejszego opracowania była ocena zdolności szczepów *Thermomyces lanuginosus* do biosyntezy egzoenzymów lipolitycznych w obecności tłuszczów o konsystencji stałej.

#### WSTĘP

Drobnoustroje, w tym również grzyby termofilne są potencjalnym źródłem enzymów hydrolitycznych, które wykorzystywane są w przemyśle spożywczym, chemicznym, kosmetycznym, a także w ochronie środowiska [2, 8, 11, 15–19]. Gatunek *Thermomyces lanuginosus* zaliczany jest do najpowszechniej występujących grzybów termofilnych [3, 10]. Badania dowiodły, że szczepy *Thermomyces lanuginosus* zdolne są do biosyntezy szeregu enzymów hydrolitycznych, w tym także kompleksu egzoenzymów lipolitycznych [2, 8, 9, 14]. Z dostępnej literatury wynika, że aktywność lipolityczna szczepów tego gatunku testowana była w obecności olejów roślinnych.

Celem niniejszej pracy było zbadanie aktywności lipolitycznej wyizolowanych szczepów termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* w obecności tłuszczów o konsystencji stałej.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły 144 szczepy termofilnego *Thermomyces lanuginosus* wyodrębnione z podłoża pieczarkowego, biohumusu, kompostu liściowego, kompostu ogrodowego oraz tuskanych orzechów laskowych i surowego ziarna kawy. Do badania aktywności lipolitycznej w obecności naturalnych substratów tłuszczowych zastosowano podłoże stałe według *Kunert* i *Lysek* [12]. Testowano roślinny oraz zwierzęcy substrat tłuszczowy w postaci tłuszczu kakaowego i smalcu. Wymienione

tłuszcze dodawano do podłoża w ilości 1,5% i miksowano z pozostałymi składnikami pożywki przed jałowieniem. Wartość pH pożywki wynosiła 6,5. Podłoża inokulowano fragmentem grzybni, pochodzącej z dojrzałej pięciodobowej hodowli i inkubowano w temperaturze 55 °C przez okres 192 godzin. Badania prowadzono w trzech powtórzeniach.

Efektom hydrolizy substratów tłuszczowych przez egzoenzymy badanych szczepów była zmiana barwy pożywki wokół kolonii grzyba z zielonkawej do niebiesko-granatowej. 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 indeks aktywności lipolitycznej przyjęto obliczony stosunek średnicy strefy hydrolizy, przejawiającej się zmianą zabarwienia podłoża do średnicy kolonii badanego szczepu [4–7].

Uzyskane wyniki badań analizowano statystycznie za pomocą analizy wariancji. Statystyczne istotności różnic określono używając najmniejszej istotnej różnicy, przy  $p = 0,05$ , wyliczonej testem *Tukeya*.

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzone badania wykazały, że podczas hodowli wyodrębnionych szczepów na podłożu z dodatkiem substratu tłuszczowego w postaci tłuszczu kakaowego, a także smalcu wszystkie badane szczepy charakteryzowały się aktywnością lipolityczną na zbliżonym poziomie. Strefy hydrolizy substratów tłuszczowych w postaci przebarwienia pożywki na kolor niebieski widoczne były tylko pod koloniami, w związku z czym indeks aktywności lipolitycznej wynosił 1,0. Ponieważ jednak szczepy różniły się między sobą średnicami tworzonych kolonii, dlatego tę cechę przyjęto jako parametr różnicujący szczepy badanego gatunku.

Średnice kolonii uzyskane przez badane szczepy podczas hodowli na podłożu z dodatkiem tłuszczu kakaowego przedstawia tabela I.

Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, że na podłożu z dodatkiem substratu tłuszczowego w postaci tłuszczu kakaowego największe kolonie o średnicy 40,52 mm uzyskały szczepy wyodrębnione z biohumusu. Wartość ta różniła się istotnie od wartości uzyskanych przez pozostałe szczepy.

Najmniejsze kolonie o średnicy 31,48 mm tworzyły szczepy wyizolowane z orzechów laskowych. Kolonie o zbliżonej wielkości, osiągające średnicę 33,33 mm tworzyły szczepy wyodrębnione z kompostu liściowego. Obie te wartości stanowiły grupę jednorodną. Wartość charakteryzująca wielkość kolonii szczepów pochodzących z kompostu liściowego należała ponadto do grupy jednorodnej, zawierającej wartości pośrednie. Pośrednie wartości charak-

Tabela I. Średnice kolonii tworzonych przez szczepy w czasie hodowli na podłożu z dodatkiem tłuszczu kakaowego

The average diameter of the colonies on the medium with the cocoa fat

Źródło wyodrębnienia szczepów	Średnice kolonii (mm)	Grupy jednorodne $NIR_{0,05} = 3,73$
Biohumus	40,52	a
Kompost ogrodowy	36,79	b
Podłoże pieczarkowe	36,13	b
Ziarno kawy	35,94	b
Kompost liściowy	33,33	b c
Orzechy laskowe	31,48	c

teryzowały szczepy wyodrębnione z kompostu ogrodowego, tworzące kolonie o średnicy 36,79 mm, szczepy wyizolowane z podłoża pieczarkowego, które tworzyły kolonie o średnicy 36,13 mm oraz szczepy pochodzące z ziarna kawy, tworzące kolonie o średnicy 35,94 mm. Wartości charakteryzujące wielkości kolonii tych szczepów stanowiły grupę jednorodną.

W tabeli II przedstawiono średnice kolonii tworzonych przez wyodrębnione szczepy na podłożu z dodatkiem smalcu.

Tabela II. Średnice kolonii tworzonych przez szczepy w czasie hodowli na podłożu z dodatkiem smalcu  
The average diameter of the colonies on the medium with the lard

Źródło wyodrębnienia szczepów	Średnice kolonii (mm)	Grupy jednorodne NIR <sub>0,05</sub> = 3,97
Kompost ogrodowy	34,25	a
Biohumus	32,10	a
Ziarno kawy	31,60	a
Orzechy laskowe	30,71	a b
Podłoże pieczarkowe	27,67	b
Kompost liściowy	26,75	b

Przeprowadzone badania dowiodły, że w czasie hodowli na podłożu z dodatkiem smalcu największymi koloniami o średnicy 34,25 mm charakteryzowały się szczepy wyodrębnione z kompostu ogrodowego. Najmniejsze kolonie o średnicy 26,75 mm tworzyły szczepy wyizolowane z kompostu liściowego. Szczepy wyodrębnione z biohumusu tworzyły kolonie o średnicy 32,10 mm, a szczepy pochodzące z ziarna kawy charakteryzowały się koloniami o średnicy 31,60 mm. Wartości te stanowiły grupę jednorodną wspólnie z wartością maksymalną. Grupę jednorodną wspólnie z wartością najniższą stanowiła średnica kolonii równa 27,67 mm charakteryzująca szczepy pochodzące z podłoża pieczarkowego. Wartością pośrednią, należącą do obu grup jednorodnych była średnica 30,71 mm, charakteryzująca wielkość kolonii szczepów wyizolowanych orzechów laskowych.

Analizując wielkości kolonii można przypuszczać, że szczepy tworzące większe kolonie lepiej przyswajały zawarty w podłożu substrat tłuszczowy.

Opierając się na wynikach wcześniejszych badań własnych można stwierdzić, że substraty tłuszczowe w postaci olejów roślinnych są lepiej hydrolizowane przez szczepy *Thermomyces lanuginosus* [9]. Najprawdopodobniej różnice te spowodowane są składem chemicznym dodawanych substratów tłuszczowych, a konkretnie ilością kwasów tłuszczowych o charakterze nasyconym i nienasyconym. Tłuszcz kakaowy i smalec jako tłuszcze stałe zawierają większe ilości kwasów tłuszczowych nasyconych. Mniejsza ilość wiązań podwójnych może więc być przyczyną mniej skutecznej hydrolizy tego typu substratów tłuszczowych przez szczepy *Thermomyces lanuginosus*.

#### WNIOSKI

1. Wszystkie wyodrębnione szczepy termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* zdolne były do hydrolizy stałych tłuszczów w postaci tłuszczu kakaowego oraz smalcu.

2. Badane szczepy wykazały jednakową aktywność lipolityczną w obecności obu testowanych substratów.

3. Wyizolowane szczepy tworzyły kolonie o zróżnicowanych średnicach, a różnice te wynikały z ich pochodzenia i były statystycznie istotne.

K. Janda

THE ESTIMATION TO THE ABILITY OF THE STRAINS OF THE THERMOPHILIC FUNGUS *THERMOMYCES LANUGINOSUS* TO THE HYDROLYSIS THE COCOA FAT AND THE LARD

Summary

The purpose of the study was the estimation of the lipolytic activity of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* on the solid base with the cocoa fat and the lard. The material was 144 strains isolated from biohumus, garden compost, leaf compost, mushroom compost, hazelnuts and raw coffee beans. The study proved, that all species was able to hydrolyze both the cocoa oil and the lard. The index of the lipolytic activity was the same on the medium with cocoa oil and on the medium with the lard.

PIŚMIENNICTWO

1. Bilaj T.I.: Tiermostabilnyje fiermienty gribow. Izd. Naukowa Dumka, Kijew 1979.
2. Clausen I.G.: Aspects in lipase screening. J. Mol. Catal. B: Enzym. 1996, 3, 139–146.
3. Garrison R.G., Boyd K.S., Lane J.W.: Ultrastructural studies on *Thermomyces lanuginosus* and certain other closely related thermophilic fungi. Mycologia 1975, 67, 961–971.
4. Hankin L., Anagnostakis S.I.: The use of solid media for detection of enzyme production fungi. Mycologia 1975, 67, 597–607.
5. Ho H.H., Foster B.: Starch utilization by *Phytophthora* spp. Mycopathologia et Mycologia Applicata 1972, 46, 335–339.
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 glukoamylazę. Prace Instytutów i Lab. Bad. Przem. Spoż. 1983, 37, 47–59.
8. Jaeger K.E., Reetz M.: Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. TIBTECH SEPTEMBER 1998, 16, 396–403.
9. Janda K., Falkowski J.: Aktywność lipolityczna szczepów termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* (syn. *Humicola lanuginosa*) wyodrębnionych z łuskanych orzechów laskowych i surowego ziarna kawy. Materiały XXXII Sesji Naukowej KTiChŻ PAN „Technologia żywności a oczekiwania konsumentów”, Warszawa 2001 (wydana na CD jako Praca zbiorowa pod red. T. Habera i H. Porzucek).
10. Jensen B., Wiebe M.G., Robson G.D., Trinci A.P.J., Olsen J.: Growth kinetics of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Mycol. Res. 1993, 6, 665–669.
11. Kristjanson J.K.: Thermophilic organisms as a source of thermostable enzymes. Trends Biotechnol. 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 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, 59–70.
14. Liu W.H., Beppu T., Arima K.: Physical and chemical properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. Agr. Biol. Chem. 1973, 31, 2493–2499.

15. Nigam P., Singh D.: Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* 1995, 17, 770–778.
16. Oberman H.: Drobnoustroje jako źródło enzymów wewnątrz – i pozakomórkowych. *Post. Mikrobiol.* 1970, 9, 447–455.
17. Reetz M.: Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 2002, 6, 145–150.
18. Rodziewicz A., Sobieszcański J.: Pozakomórkowe proteiny drobnoustrojów. *Post. Mikrobiol.* 1988, 27, 55–74.
19. Wasserman B.P.: Thermostable enzyme production. *Food Technology* 1984, February, 78–89.

Otrzymano: 2003.04.28