

KATARZYNA JANDA

AKTYWNOŚĆ PROTEOLITYCZNA I ZDOLNOŚĆ DO KOAGULACJI
MLEKA SZCZEPÓW TERMOFILNEGO GRZYBA *THERMOMYCES*
LANUGINOSUS

THE PROTEOLYTIC ACTIVITY AND THE ABILITY TO THE MILK
COAGULATION BY *THERMOMYCES LANUGINOSUS* STRAINS

Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa
Akademia Rolnicza
71-434 Szczecin, ul. Słowackiego 17
Kierownik: prof. dr hab. J. Falkowski
e-mail: kjanda@agro.ar.szczecin.pl

*W pracy podjęto próbę określenia zdolności szczepów termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* wyodrębnionych z różnych środowisk naturalnych do biosyntezy egzoenzymów proteolitycznych oraz do koagulacji mleka.*

WSTĘP

Drobnoustroje, w tym również grzyby termofilne są potencjalnym źródłem enzymów hydrolitycznych, znajdujących zastosowanie w przemyśle spożywczym, chemicznym, kosmetycznym, farmaceutycznym i w ochronie środowiska [4, 11, 14, 16-18]. Gatunek *Thermomyces lanuginosus* zaliczany jest do najczęściej występujących grzybów termofilnych [5, 10]. Badania dowiodły, że szczepy *Thermomyces lanuginosus* zdolne są do biosyntezy enzymów amylolitycznych, celulolitycznych, ksylanolitycznych i lipolitycznych [2, 4, 9, 16]. Bardzo nieliczne są doniesienia dotyczące aktywności proteolitycznej szczepów tego gatunku oraz ich zdolności do koagulacji mleka.

Celem niniejszej pracy była ocena aktywności proteolitycznej szczepów *Thermomyces lanuginosus* wyodrębnionych z różnych środowisk naturalnych, a także sprawdzenie, czy są one zdolne do biosyntezy kompleksu egzoenzymów koagulujących mleko.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły szczepy termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* (syn. *Humicola lanuginosa*), wyodrębnione z podłoża pieczarkowego, biohumusu, kompostu ogrodowego, kompostu liściowego oraz z łuskanych orzechów laskowych i z surowego ziarna kawy.

Badanie aktywności proteolitycznej. Do badania aktywności proteolitycznej zastosowano podłoże stałe z dodatkiem kazeiny. Jako podłoże podstawowe użyto pożywkę według Bilaja [2], a roztwór kazeiny przygotowano według modyfikacji Burbianki [3]. Końcowe stężenie

kazeiny w podłożu wynosiło 0,3%. Ocenę aktywności proteolitycznej szczepów przeprowadzano co 24 godziny. Aby określić efekt hydrolizy kazeiny płytki zalewano 15% roztworem HgCl_2 [3]. W miejscu hydrolizy kazeiny powstawała przezroczysta strefa wokół kolonii grzyba, zaś reszta pożywki była mlecznobiała.

Jako indeks aktywności proteolitycznej przyjęto stosunek średnicy strefy hydrolizy kazeiny do średnicy kolonii badanego szczepu [8, 19]. Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Podłoże inkubowano w temp. 55°C przez 120 godzin.

B a d a n i e a k t y w n o ś c i k o m p l e k s u e g z o e n z y m ó w k o a g u l u j ą c y c h m l e k o. Do oceny zdolności biosyntezy kompleksu egzoenzymów koagulujących mleko przez wyizolowane szczepy wykorzystano metodykę i podłoże płynne polecane przez *Martini* i in. [12]. Do kolbek o pojemności 50 cm³ wprowadzano 15 cm³ pożywki, którą następnie wyjaławiano. Jako inokulum zastosowano bloczki agarowe pobierane wraz z pięciodobową zarodnikującą grzybnią, wyhodowaną w temperaturze 45°C na optymalnym dla gatunku podłożu [6, 10]. Każdą kolbkę szczepiono dwoma bloczkami agarowymi o wymiarach 5 x 5 mm. Hodowle prowadzono w temperaturze 55°C metodą stacjonarną, jednak w celu lepszego napowietrzenia kolonii trzy razy na dobę każdą kolbkę poddawano okresowemu wstrząsaniu [15]. Po upływie 120 godzin wyhodowaną grzybnię oddzielano na jałowych sączkach z bibuły, a otrzymany przesącz posłużył jako źródło kompleksu egzoenzymów koagulujących mleko [1, 12, 13]. W badaniach wykorzystano sterylne mleko o zawartości tłuszczu 0,5% z dodatkiem CaCl_2 w ilości 0,55 g CaCl_2 / 500 cm³ mleka [1, 12].

Doświadczenie prowadzono w dwóch wariantach.

– *Wariant I:* Do próbek wprowadzano 10 cm³ mleka i 5 cm³ przesączu pochodowlanego, po czym zawartość delikatnie mieszano ręcznie. Probówki umieszczano w termostatach w temperaturze 25°C, 37°C i 55°C.

– *Wariant II:* Aby sprawdzić termostabilność kompleksu enzymów koagulujących mleko, próby przesączów pochodowlanych umieszczano na 15 minut w łaźni wodnej w temperaturze 60°C, 70°C i 80°C. Po ostudzeniu przesącze w ilości 5 cm³ dodawano do próbek zawierających 10 cm³ odpowiednio przygotowanego mleka i umieszczano w termostacie w temperaturze 55°C.

W obu doświadczeniach prowadzono obserwacje dotyczące czasu wytwarzania skrzepów, ich struktury i barwy. Oceniano również wartość pH wydzielonej serwatki.

Uzyskane wyniki analizowano statystycznie za pomocą analizy wariancji. Statystyczne istotności określano używając najmniejszej istotnej różnicy, przy $p \leq 0,05$ wyliczonej testem *Tukey'a*.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

A k t y w n o ś ć p r o t e o l i t y c z n a

Na podłożu stałym z dodatkiem kazeiny wyodrębnione szczepy charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością proteolityczną (Tab. I).

Największą wartością indeksu aktywności proteolitycznej równą 1,06 charakteryzowały się szczepy wyizolowane z orzechów laskowych. Wartość ta stanowiła grupę jednorodną wspólnie z wartością indeksu aktywności proteolitycznej równą 1,05, którą osiągnęły szczepy pochodzące z biohumusu. Najmniejszą wartość indeksu aktywności proteolitycznej równą 1,01 osiągnęły szczepy wyodrębnione z kompostu liściowego. Pośrednią wartość równą 1,03 uzyskały szczepy pochodzące z kompostu ogrodowego i z ziarna kawy, a także szczepy wyodrębnione z podłoża pieczarkowego, których wartość indeksu aktywności proteolitycznej równa była 1,01. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami indeksu aktywności proteolitycznej uzyskanymi przez szczepy wyodrębnione z kompostu ogrodowego, szczepy pochodzące z ziarna kawy, szczepy wyizolowane z podłoża pieczarkowego, szczepy wyodrębnione z kompostu liściowego i z biohu-

Tabela I. Średnie wartości indeksu aktywności proteolitycznej
The average index of proteolytic activity

Źródło wyodrębnienia szczepów	Wartość indeksu aktywności proteolitycznej	Grupy jednorodne NIR _{0,05} = 0,03
Luskane orzechy laskowe	1,06	a
Biohumus	1,05	a b
Kompost ogrodowy	1,03	b
Surowe ziarno kawy	1,03	b
Podłoże pieczarkowe	1,01	b
Kompost liściowy	1,01	b

musu. Szczepy wyizolowane z biohumusu charakteryzowały się pośrednią wartością indeksu aktywności proteolitycznej, która należała do obu grup jednorodnych.

Niezależnie od pochodzenia szczepy *Thermomyces lanuginosus* największe wartości indeksu aktywności proteolitycznej osiągały w pierwszej dobie hodowli, zaś najniższe – w piątej dobie.

Zdolność do biosyntezy egzoenzymów koagulujących mleko

Przeprowadzona badania udowodniły, że wyizolowane szczepy zdolne były do biosyntezy kompleksu egzoenzymów koagulujących mleko. Wytwarzane kompleksy enzymatyczne aktywne były w szerokim przedziale temperatur od 25°C do 80°C. W temperaturze 25°C egzoenzymy powodowały wytwarzanie luźnych skrzepów, natomiast w 80°C widocznym efektem aktywności enzymów koagulujących mleko było wyraźne jego zgęstnienie (Tab. II, III).

Badania wykazały, że egzoenzymy koagulujące mleko syntetyzowane przez szczepy *Thermomyces lanuginosus* najaktywniejsze były podczas inkubacji próbek w temperaturze 55°C. W tych warunkach termicznych zwarte skrzepy kazeinowe widoczne były już po 24 godzinach inkubacji. W temperaturze 25°C po 24 godzinach inkubacji nie zauważono widocznego efektu oddziaływania enzymów na mleko. Zgęstnienie próbek mleka nastąpiło

Tabela II. Opis efektów aktywności kompleksu egzoenzymów koagulujących mleko syntetyzowanych przez wyodrębnione szczepy *Thermomyces lanuginosus*
The description of effects of activity of complex milk coagulating egzoenzymes by isolated *Thermomyces lanuginosus* strains

Czas koagulacji (godz.)	Temperatury inkubacji		
	25°C	37°C	55°C
24	brak efektu	luźne skrzepy	zwarte skrzepy
48	zgęstnienie mleka	zwarte skrzepy	zwarte skrzepy
72	luźne skrzepy	zwarte skrzepy	zwarte skrzepy

Tabela III. Opis efektów aktywności kompleksu egzoenzymów koagulujących mleko zawartych w przesączach pochodowlanych poddanych działaniu wyższych temperatur
The description of effects of activity of complex milk coagulating egzoenzymes containing culture filtrates subjected earlier to higher temperatures

Czas koagulacji (godz.)	Aktywność egzoenzymów koagulujących mleko zawartych w przesączach pochodowlanych poddanych działaniu podwyższonej temperatury		
	60°C	70°C	80°C
24	zwarte skrzepy	brak efektu	zgęstnienie mleka
48	zwarte skrzepy	luźne skrzepy	
72	zwarte skrzepy	luźne skrzepy	

po 48 godzinach, natomiast powstanie skrzepu o luźnej konsystencji miało miejsce po upływie 72 godzin inkubacji. W temperaturze 37°C po upływie 24 godzin inkubacji tworzyły się skrzepy o luźnej konsystencji. Skrzepy zwarte powstały po 48 godzinach.

W tabeli III przedstawiono opis efektów aktywności kompleksów egzoenzymów koagulujących mleko zawartych w przesączach, które poddano uprzednio działaniu wyższych temperatur. Próbkę zawierającą tak przygotowane przesącze inkubowano następnie w temperaturze 55°C.

Aktywność egzoenzymów koagulujących mleko zawartych w przesączach poddanych działaniu temperatury 60°C nie różniła się od aktywności enzymów nie poddanych działaniu podwyższonej temperatury i inkubowanych w temperaturze 55°C. Otrzymano takie same efekty w postaci zwartych skrzepów, które widoczne były już po 24 godzinach inkubacji.

Kompleks enzymów koagulujących mleko zawarty w przesączach pochodowlanych poddanych obróbce termicznej w temperaturze 70°C nie wykazywał aktywności w czasie 24 godzinnej inkubacji. Powstanie luźnych skrzepów widoczne było po 48 godzinach inkubacji. W próbach poddanych oddziaływaniu temperatury 80°C widocznym efektem aktywności enzymów koagulujących mleko było jego zgęstnienie. We wszystkich analizowanych przypadkach wartości pH wydzielonej serwatki mieściły się w przedziale od 6,0 do 6,5.

Zaobserwowano, że podczas inkubacji próbek w temperaturze 55°C najwyraźniejsze były zabarwienia powstałych skrzepów (białe, kremowe lub matowo różowe) oraz wydzielające się przyjemne zapachy (jabłkowy, poziomkowy, kokosowy oraz orzechowy).

W dostępnej literaturze nieliczne są doniesienia dotyczące zarówno aktywności proteolitycznej grzybów termofilnych, jak również ich zdolności do biosyntezy kompleksu egzoenzymów koagulujących mleko. Badacze zajmujący się poszukiwaniem źródeł enzymów reninopodobnych wśród drobnoustrojów zwracają uwagę, że organizmy takie powinny charakteryzować się, obok zdolności do biosyntezy egzoenzymów koagulujących mleko, niską aktywnością proteolityczną [13].

Zdaniem *Abdel-Fattah* i in. [1] z aktywnością proteolityczną związana jest zdolność szczepów do biosyntezy enzymów koagulujących mleko. *Bilaj* [2] doniósł, że podczas

hodowli na podłożu zawierającym kazeinę szczepy *Thermomyces lanuginosus* zdolne były do syntetyzowania enzymów proteolitycznych, zarówno wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Autor ten przeprowadził również badania dotyczące zdolności grzybów termofilnych do koagulacji mleka. Wykazały one, że szczepy *Thermomyces lanuginosus* nie posiadały zdolności do biosyntezy enzymów koagulujących mleko, podobnie jak większość badanych przez niego grzybów termofilnych. Hasnain i in. [7] wykazali, że w obecności kazeiny szczepy *Humicola lanuginosa* syntetyzowały enzym proteolityczny, nazwany przez autorów „humicolin”.

Zagadnieniem zdolności grzybów termofilnych do koagulacji mleka zajmowali się także Merendi i in. [13], jednak w badaniach swych nie uwzględnili oni gatunku *Thermomyces lanuginosus*.

WNIOSKI

1. Wyodrębnione szczepy *Thermomyces lanuginosus* posiadały zróżnicowaną aktywność proteolityczną, przy czym najwyższe wartości indeksu aktywności enzymatycznej osiągnęły szczepy pochodzące z orzechów laskowych.

2. Charakteryzowały się one, obok niskiej aktywności proteolitycznej, zdolnością do biosyntezy kompleksu egzoenzymów koagulujących mleko.

3. Kompleksy egzoenzymów koagulujących mleko okazały się aktywne w szerokim zakresie temperatur, a powstawaniu skrzepów kazeinowych towarzyszyło często wydzielanie przyjemnych, owocowo-orzechowych zapachów.

K. J a n d a

THE PROTEOLYTIC ACTIVITY AND THE ABILITY TO THE MILK COAGULATION BY *THERMOMYCES LANUGINOSUS* STRAINS

Summary

The aim of this study was the estimation of the ability to proteolytic activity and the ability to the milk coagulation by *Thermomyces lanuginosus* strains isolated from different natural sources. The estimation of proteolytic activity was conducted at 55°C on the solid medium with casein. The ability to the milk coagulation was estimated at temperature range between 25 and 80°C, using culture filtrate of isolated strains. The study proved, that all tested strains were able to the hydrolysis of casein, but the highest proteolytic activity had strains from hazelnuts. The quickest milk coagulation was observed at 55°C. Clotted milk had dense consistency and these samples had best colours and nice smells.

PIŚMIENNICTWO

1. Abdel-Fattah A.F., Mabrouk S.S., El-Hawwary N.M.: Distribution pattern of milk-clotting and proteolytic activities in some fungi. Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 1972, 23, 55-60.
2. Bilaj T.I.: Tiermostabilnyje fermenty gribow. Izd. Naukowa Dumka, Kijew 1979.
3. Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.: Mikrobiologia żywności. PWRiL, Warszawa 1983.
4. Edwards C.: Microbiology of extreme environments. McGraw-Hill Publ. Comp. 1990, 1-30.

5. 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.
6. Gomes J., Gomes I., Kreiner W., Esterbauer H., Sinner M., Steiner W.: Production of high level of cellulase-free and thermostable xylanase by wild strain of *Thermomyces lanuginosus*. *J. Biotechnol.* 1993, 30, 283-297.
7. Hasnain S., Adeli K., Storer A.C.: Purification and characterization of an extracellular thiol-containing serine protease from *Thermomyces lanuginosus*. *Biochem. Cell. Biol.* 1992, 70, 117-122.
8. Ilnicka-Olejniczak O., Hornecka D., Solak G.: Selekcja i izolacja wysokowydajnych szczepów wytwarzających enzymy. Cz. I. Szybka metoda selekcji wysokowydajnych szczepów wytwarzających glukoamylazę. *Prace Instytutów i Lab. Bad. Przem. Spoż.* 1983, 37, 47-59.
9. Janda K., Falkowski J.: Badanie aktywności lipolitycznej szczepów termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* (syn. *Humicola lanuginosa*) na podłożu płynnym. *Acta Scientiarum Polonorum* 2002, *Biologia* 1 (1-2), 43-48.
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. Martini A., Federici F., Argenti B.: Milk coagulating microbial enzyme. Pat. USA, 1979, kl. 195/66R/C07 G7/02,A23 C19/02/, Nr. 4141791.
13. Merendi C., Aragozzini F., Manachini P.L.: „Screening” sull’attività presamica di eumiceti termofili. *Ann. Microbiol.* 1970, 20, 23, 23-30.
14. Nigam P., Singh D.: Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1995, 17, 770-778.
15. Purkarthofer H., Sinner M., Steiner W.: Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of production in submerged and solid-state culture. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1993, 15, 677-682.
16. Reetz M.: Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Op. Chem. Biol.* 2002, 6, 145-150.
17. Wasserman B.P.: Thermostable enzyme production. *Food Technology*, February, 1984, 78-89.
18. Żakowska Z., Stobińska H., Janda K., Kuberski S., Goździecki T.: Biodegradacja kompozytów polimerowych modyfikowanych skrobią przez drobnoustroje termofilne. III Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Rozkład i Korozja Mikrobiologiczna Materiałów Technicznych”. Łódź 2003, 102-107.
19. Żakowska Z., Stobińska H., Piątkiewicz A.: Poszukiwanie szczepów do biodegradacji PE modyfikowanego skrobią. II Konferencja Naukowa „Rozkład i Korozja Mikrobiologiczna Materiałów Technicznych”. Łódź 2001, 298-302.

Otrzymano: 2003.11.21