

KATARZYNA JANDA<sup>1</sup>, KRYSZYNA PRZYBULEWSKA<sup>2</sup>

## OCENA ZDOLNOŚCI SZCZEPÓW *THERMOMYCES LANUGINOSUS* DO BIODEGRADACJI OLEJU RZEPAKOWEGO

### THE ESTIMATION OF THE ABILITY OF *THERMOMYCES LANUGINOSUS* STRAINS TO THE BIODEGRADATION OF THE RAPE OIL

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Środowiska  
Akademia Rolnicza  
71-434 Szczecin, ul. Słowackiego 14  
Kierownik: prof. dr hab. A. Nowak

*Material badawczy stanowiły szczepy termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* wyodrębnione z różnych środowisk naturalnych. Celem pracy była ocena ich zdolności do hydrolizy oleju rzepakowego. Udowodniono, że wszystkie szczepy zdolne były do biodegradacji oleju rzepakowego, zaś najwyższą aktywnością lipolityczną charakteryzowały się szczepy wyizolowane z tuskanych orzechów laskowych.*

#### WSTĘP

Zgodnie z ogólnie przyjętą definicją grzyby termofilne są mikroorganizmami, zdolnymi do wzrostu i rozwoju w przedziale temperatur od 20 do 50°C. Występują w powietrzu, w glebach różnych stref klimatycznych, w składowanych masach roślinnych i wielu innych środowiskach [2, 3, 5, 10]. Drobnoustroje te posiadają zdolność do biosyntezy wielu egzoenzymów, co stwarza możliwości wykorzystywania ich w przemyśle, farmacji lub w ochronie środowiska [1, 5, 6, 9, 12, 15, 16]. Gatunek *Thermomyces lanuginosus* zaliczany jest do najczęściej spotykanych grzybów termofilnych. Posiada najwyższą wśród grzybów maksymalną temperaturę wzrostu, wynoszącą 60-62°C [11]. Szczepy tego gatunku wyizolowano między innymi z gleb, kompostowanej materii organicznej, ziaren zbóż, orzechów i nasion [11]. Dowiedziono, że szczepy *Thermomyces lanuginosus* zdolne są do biosyntezy wielu egzoenzymów lipolitycznych [4, 11, 17]. Celem niniejszej pracy była ocena zdolności szczepów tego gatunku do rozkładu oleju rzepakowego. Podjęto ponadto próbę określenia, czy istnieją różnice w poziomie aktywności lipolitycznej wynikające z pochodzenia szczepów.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły 144 szczepy termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* (syn. *Humicola lanuginosa*), które wyodrębniono z biohumusu, podłoża pieczarkowego, kompostu ogrodowego, kompostu liściowego, z łuskanych orzechów laskowych oraz z surowego ziarna kawy.

Do badania aktywności lipolitycznej wykorzystano podłoże stałe według *Kunert i Lysek* [13], zawierające substrat tłuszczowy w postaci oleju rzepakowego w ilości 1,5%. Podłoże na szalkach *Petriego* inokulowano fragmentami grzybni powietrznych, pochodzących z zarodnikujących hodowli. Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach w temperaturze 55°C przez 144 godziny. Efekt hydrolizy oleju rzepakowego przez egzoenzymy lipolityczne badanych szczepów widoczny był jako zmiana zabarwienia pożywki wokół kolonii z zielonkawe do niebieskogrnatowej. Przyczyną tego zjawiska były kwasy tłuszczowe, uwolnione przez kompleks enzymów lipolitycznych, które obniżały wartość pH środowiska i prowadziły do zmiany zabarwienia pożywki hodowlanej [13, 14].

Ocenę aktywności enzymatycznych przeprowadzono co 24 godziny, mierząc średnice stref hydrolizy substratu oraz średnice kolonii grzyba. Na podstawie tych pomiarów obliczono indeksy aktywności enzymatycznej (IA) wyrażające stosunek średnicy strefy hydrolizy substratu do średnicy kolonii [7, 8].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą analizy wariancji. Do obliczenia najmniejszych istotnych różnic przy  $p = 0,05$  wykorzystano test *Tukey'a*. Znajomość najmniejszych istotnych różnic pozwoliła na utworzenie grup jednorodnych, w obrębie których znalazły się wartości nie różniące się istotnie między sobą. Współczynniki korelacji oraz równania regresji wyliczono za pomocą programu statystycznego Statistica.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że wyodrębnione szczepy charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością lipolityczną (Tab. I).

Najwyższą wartość indeksu aktywności lipolitycznej równą 1,19 uzyskały szczepy wyodrębnione z orzechów laskowych. Wartość ta różniła się istotnie od wartości indeksu aktywności lipolitycznej uzyskanych przez pozostałe szczepy i stanowiła odrębną grupę jednorodną. Wartości indeksu aktywności lipolitycznej, charakteryzujące szczepy z pozostałych źródeł stanowiły grupę jednorodną i nie stwierdzono między nimi statystycznie istotnych różnic.

Zmiany wartości indeksu aktywności lipolitycznej badanych szczepów w czasie sześciu-dobowej hodowli na podłożu z olejem rzepakowym przedstawia krzywa na rycinie 1. Ponieważ niezależnie od pochodzenia szczepów krzywe miały zbliżony charakter, w związku z tym tendencje tę przedstawiono w postaci jednej krzywej. Zaprezentowane wartości są reprezentatywne dla badanej populacji *Thermomyces lanuginosus*.

Najwyższe wartości indeksu aktywności lipolitycznej badane szczepy osiągały w pierwszej dobie i wartość ta istotnie różniła się istotnie od wartości uzyskanych w pozostałych dobach hodowli.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że podczas hodowli wyodrębnionych szczepów na pożywkę z dodatkiem oleju rzepakowego tworzyły one kolonie o zróżnicowanych średnicach (Tab. II).

Największe kolonie o średnicy 47,92 mm tworzyły szczepy wyodrębnione z podłoża pieczarkowego. Różnica pomiędzy tą wartością, a wartościami uzyskanymi przez pozosta-

Tabela I. Średnie wartości indeksu aktywności lipolitycznej szczepów *Thermomyces lanuginosus* hodowanych na podłożu stałym z olejem rzepakowymThe average index of the lipolytic activity of the *Thermomyces lanuginosus* strains incubated on the solid medium with rape oil

| Źródło wyodrębnienia szczepów | Wartość indeksu aktywności lipolitycznej (IA) | Grupy jednorodne NIR <sub>0,05</sub> = 0,07 |
|-------------------------------|---|---|
| Łuskane orzechy laskowe       | 1,19  | a   |
| Kompost ogrodowy              | 1,12  | b   |
| Podłoże pieczarkowe           | 1,09  | b   |
| Biohumus                      | 1,09  | b   |
| Surowe ziarno kawy            | 1,07  | b   |
| Kompost liściowy              | 1,06  | b   |

łe szczepy była statystycznie istotna. Najmniejsze kolonie o średnicy 35,22 mm tworzyły szczepy pochodzące z orzechów laskowych. Wielkość ta także różniła się istotnie od wartości reprezentujących wielkości kolonii pozostałych szczepów.

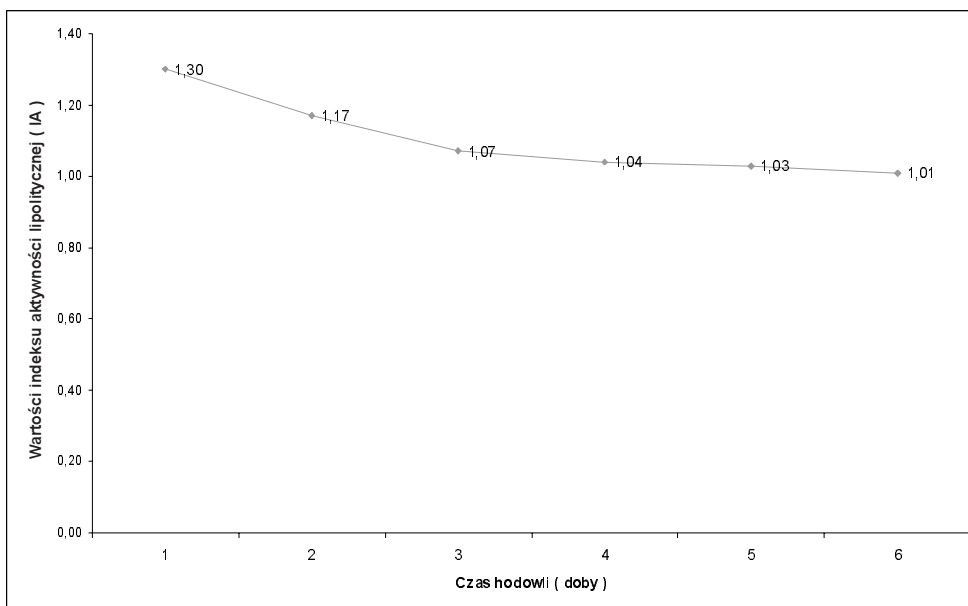
Ryc. 1. Zmiany wartości indeksu aktywności lipolitycznej szczepów *Thermomyces lanuginosus* w czasie hodowli na podłożu stałym z dodatkiem oleju rzepakowego.The changes of index of the lipolytic activity of the *Thermomyces lanuginosus* strains incubated on the solid medium with rape oil.

Tabela II. Średnie średnice kolonii tworzonych przez badane szczepy na podłożu stałym z dodatkiem oleju rzepakowego  
The average diameters of the colonies formed by the investigated strains on the solid medium with rape oil

| Źródło wyodrębnienia szczepów | Średnice kolonii (mm) | Grupy jednorodne<br>NIR <sub>0,05</sub> = 1,69 |
|-------------------------------|-----------------------|--|
| Podłoże pieczarkowe           | 47,92                 | a  |
| Kompost ogrodowy              | 45,92                 | b  |
| Biohumus                      | 45,72                 | b  |
| Ziarno kawy                   | 45,0                  | b  |
| Kompost liściowy              | 41,61                 | c  |
| Orzechy laskowe               | 35,22                 | d  |

Tabela III. Współczynniki korelacji i równania regresji dotyczące wielkości kolonii badanych szczepów oraz wartości indeksu aktywności lipolitycznej  
The coefficients of correlation and the regression equations applied to the diameters of the colonies and the index of the lipolytic activity

| Źródło wyodrębnienia szczepów | Równanie regresji         | Współczynnik korelacji |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------|
| Luskane orzechy laskowe       | $y = - 0,0052 x + 1,3787$ | $r = - 0,86^*$         |
| Kompost ogrodowy              | $y = - 0,0066 x + 1,4213$ | $r = - 0,73^*$         |
| Podłoże pieczarkowe           | $y = - 0,0040 x + 1,2762$ | $r = - 0,86^*$         |
| Biohumus                      | $y = - 0,0042 x + 1,2778$ | $r = - 0,84^*$         |
| Surowe ziarno kawy            | $y = - 0,0034 x + 1,2201$ | $r = - 0,91^*$         |
| Kompost liściowy              | $y = - 0,0024 x + 1,1563$ | $r = - 0,78^*$         |

Pośrednie średnice kolonii charakteryzowały szczepy wyizolowane z kompostu ogrodowego, tworzące kolonie o średnicy 45,92 mm, szczepy pochodzące z biohumusu, które tworzyły kolonie o średnicy 45,72 mm, szczepy pochodzące z surowego ziarna kawy, tworzące kolonie o średnicy 45,0 mm. Wymienione wartości stanowiły grupę jednorodną i nie różniły się istotnie między sobą. Szczepy wyodrębnione z kompostu liściowego tworzyły kolonie o średnicy 41,61 mm i wartość ta stanowiła odrębną grupę jednorodną.

We wszystkich przypadkach wykazano istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy wielkością kolonii badanych szczepów a ich aktywnością lipolityczną (Tab. III).

Badania te potwierdziły doniesienia literatury, że na podstawie wielkości kolonii grzyba nie można wnioskować o jego aktywności lipolitycznej [7, 8]. Otrzymane wyniki wskazują, że w celu dokonania skriningu szczepów *Thermomyces lanuginosus* w kierunku ich

aktywności lipolitycznej w obecności oleju rzepakowego, należy ocenić ich aktywność lipolityczną po 24 godzinach inkubacji

### WNIOSKI

1. Wszystkie wyizolowane szczepy posiadały zdolność do hydrolizy oleju rzepakowego.
2. Najwyższą aktywnością lipolityczną charakteryzowały się szczepy pochodzące z łuskanych orzechów laskowych.
3. Niezależnie od pochodzenia szczepów najwyższe wartości indeksu aktywności lipolitycznej osiągały one w pierwszej dobie hodowli.
4. We wszystkich przypadkach wykazano istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy wielkościami kolonii badanych szczepów a wartościami ich indeksów aktywności lipolitycznej.

K. J a n d a, K. P r z y b u l e w s k a

### THE ESTIMATION OF THE ABILITY OF *THERMOMYCES LANUGINOSUS* STRAINS TO THE BIODEGRADATION OF THE RAPE OIL

#### Summary

The aim of this study was the estimation of the ability the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* (syn. *Humicola lanuginosa*) to the biosynthesis lipolytic enzymes. The investigated material contained 144 strains of this fungus isolated from biohumus, garden compost, leaf compost, mushroom compost, hazelnuts and raw coffee beans. The incubation was conducted at 55°C on the solid medium with 1,5% rape oil. The study proved, that all tested strains were able to the hydrolysis of the rape oil. The highest lipolytic activity have the strains isolated from the hazelnuts. It was found the significant negative correlation between the diameters of the colonies investigated strains and their lipolytic activity.

### PIŚMIENNICTWO

1. *Bednarski W., Repts. A.* (red.): Biotechnologia żywności. Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001.
2. *Bilaj T.I., Zacharczenko W.A.*: Opriebielitel tiermofilnykh gribow. Izd. Naukova Dumka, Kijew 1987.
3. *Bilaj T.I.*: Tiermostabilnyje fermenty gribow. Izd. Naukova Dumka, Kijew 1979.
4. *Bisson S., Christov L., Singh S.*: Bleach boosting effects of purified xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp. *Process Biochemistry* 2002, 37, 567-572.
5. *Edwards C.*: Microbiology of extreme environments. McGraw-Hill Publ. Company, 1990.
6. *Elimer E., Miśkiewicz T., Kwaśnik J.*: Możliwości wykorzystania ubocznych i odpadowych produktów przemysłu tłuszczowego metodą mikrobiologiczną. *Przem. Ferment. i Owoc. Warz.* 1989, 11-12, 8-10.
7. *Hornecka D., Inicka-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.
8. *Inicka-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. Jaeger K.E., Reetz M.T.: Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Tibtech*, September 1998, 16, 396-403.
10. Janda K., Falkowski J.: Grzyby termofilne – występowanie, właściwości biochemiczne i temperatury kardynalne. *Post. Mikrobiol.*, 2001, 40, 3, 287-310.
11. Janda K., Falkowski J.: Termofilny grzyb *Thermomyces lanuginosus*: występowanie i właściwości. *Post. Mikrobiol.* 2003, 42, 1, 55-60.
12. Kristjanson J.K.: Thermophilic organisms as a source of thermostable enzymes. *Trends in Biotechnology* 1989, 7, 349-353.
13. Kunert J., Lysek H.: Lipolytic activity of ovicidal soil fungi. *Biologia* 1987, 42, 285-290.
14. 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.
15. Nigam P., Singh D.: Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* 1995, 17, 770-778.
16. Reetz M.T.: Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002, 6, 145-150.
17. Singh S., Pillay B., Prior B.A.: Thermal stability of beta-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. *Enz. Microb. Technol.* 2000, 26, 502-508.

Otrzymano: 2003.10.27