

KATARZYNA JANDA, ANNA STOLARSKA<sup>1</sup>

**BADANIA AKTYWNOŚCI LIPOLITYCZNEJ  
*THERMOMYCES LANUGINOSUS* NA TRIBUTYRYNIE**  
A STUDY OF THE *THERMOMYCES LANUGINOSUS* LIPOLYTIC  
ACTIVITY ON TRIBUTYRIN

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska  
Pracownia Technologii Rolnej i Przechowalnictwa

<sup>1</sup>Katedra Fizjologii Roślin

Akademia Rolnicza

ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin

e mail: kjanda@agro.ar.szczecin.pl

Kierownik: prof. dr hab. A. Nowak

*Celem pracy było porównanie aktywności lipolitycznej szczepów termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus*, wyizolowanych z surowego ziarna kawy, luskanych orzechów laskowych, podłoża pieczarkowego, biohumusu, kompostu ogrodowego i kompostu liściowego. Aktywność lipolityczną szczepów grzybowych testowano przy użyciu tributyriny. Wszystkie badane szczepy zdolne były do hydrolizy tego substratu. Najwyższą aktywnością lipolityczną charakteryzowały się szczepy wyizolowane z surowego ziarna kawy.*

**Słowa kluczowe:** aktywność lipolityczna, *Thermomyces lanuginosus*, tributyrina

**Key words:** lipolytic activity, *Thermomyces lanuginosus*, tributyrin

#### WSTĘP

Drobnoustroje są bogatym, potencjalnym źródłem enzymów. Szczególną grupę stanowią grzyby termofilne, występujące we wszystkich strefach klimatycznych i posiadające zdolność do biosyntezy wielu kompleksów enzymatycznych [5, 10]. Termostabilne enzymy grzybów termofilnych znajdują zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Wykorzystuje się je do otrzymywania wolnych kwasów tłuszczowych z naturalnych trójglicerydów, które z kolei stosowane są w medycynie lub jako dodatki do pasz. Enzymy lipolityczne mogą być wykorzystywane w utylizacji odpadów przemysłu tłuszczowego oraz jako dodatki do detergentów [11, 14, 15].

*Thermomyces lanuginosus* Tsiklinskaya jest grzybem termofilnym powszechnie występującym w przyrodzie [1, 8]. Grzyb ten ma zdolność do biosyntezy ksylanaz, proteaz, amylaz, celulaz i lipaz [7]. Dotychczasowe badania enzymatyczne *T. lanuginosus* prowadzone były z wykorzystaniem szczepów pochodzących z pojedynczych źródeł. W niniejszej pracy porównano aktywność lipolityczną szczepów powyższego gatunku wyizolowanych z wielu naturalnych źródeł. Aktywność lipolityczną tych szczepów testowano na pożywce stalej zawierającej 1% tributyriny.

## MATERIAŁ I METODY

Ocenie aktywności lipolitycznej poddano łącznie 144 szczepy *T. lanuginosus*, które wyizolowano z surowego ziarna kawy (50 szczepów), luskanych orzechów laskowych (6 szczepów), podłoża pieczarkowego (42 szczepy), biohumusu (26 szczepów), kompostu ogrodowego (14 szczepów) i kompostu liściowego (6 szczepów). W badaniach aktywności lipolitycznej powyższych szczepów wykorzystano pożywkę TBA (Tributyryn Agar) o składzie: Bactopecton (Difco) – 5 g, ekstrakt drożdżowy (Difco) – 3 g, tributyrina (Sigma Aldrich) – 10 g, Bactoagar (Difco) – 15g, woda destylowana – 1000 ml [3]. Najpierw składniki pożywki rozpuszczono na gorąco, potem dodano tributyrinę, pożywkę zmiksowano, poddano sterylizacji i rozlano do standardowych szalek *Petrie*go. Końcowe pH pożywki wynosiło 6,5.

Do posiewów na szalki z pożywką TBA wykorzystywano pięciodobowe, zarodnikujące hodowle szczepów *T. lanuginosus* na pożywce PDA (Potato Dextrose Agar) z dodatkiem 0,3% ekstraktu drożdżowego. Według *Jensena* i in. [8] pożywka ta stwarza optymalne warunki dla wzrostu i zarodnikowania badanego grzyba. Dla każdego szczepu posiewy wykonano w trzech powtórzeniach. Hodowlę prowadzono w 55°C przez 10 dni. Powyższa temperatura mieści się w przedziale temperatur optymalnych dla wzrostu *T. lanuginosus*. Ocenę aktywności lipolitycznej prowadzono co 24 godziny, mierząc przy pomocy linijki średnice stref hydrolizy substratu, widoczne jako przejaśnienie pożywki wokół kolonii. Mierzono również średnice kolonii grzyba. Pomiaru wykonywane były z dokładnością do 1 mm. Dla kolejnych dni hodowli obliczono wartości wskaźnika aktywności lipolitycznej, wyrażające stosunek średnicy strefy hydrolizy substratu do średnicy kolonii [4]. Obliczono również dzienne przyrosty średnicy kolonii i strefy przejaśnienia.

Wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 5.1 w środowisku Windows. Dla kolejnych dni hodowli i grup szczepów (wyizolowanych z różnych źródeł) obliczono średnie i odchylenia standardowe wskaźnika aktywności lipolitycznej, dziennego przyrostu średnicy kolonii i strefy przejaśnienia. Istotność różnic pomiędzy grupami szczepów określono przy pomocy testu prosta ANOVA. Test ten wykorzystano również do oceny istotności różnic w analizie danych dla wszystkich badanych szczepów.

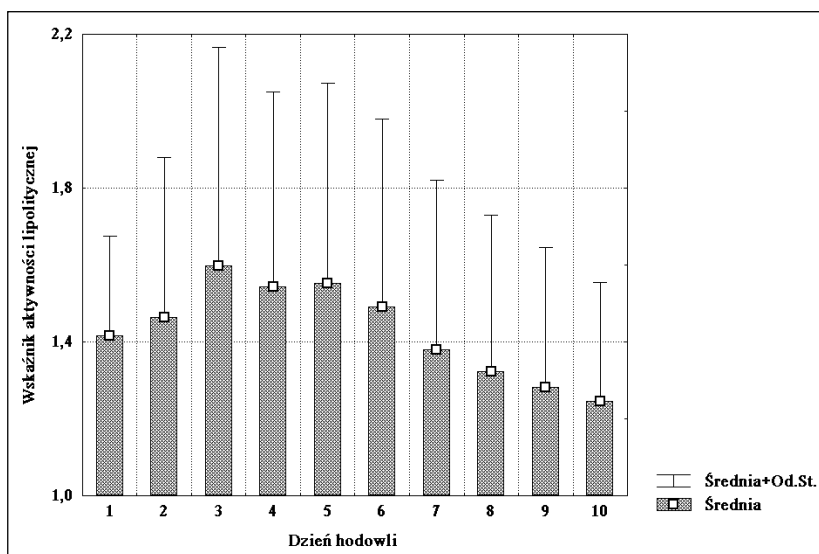
## WYNIKI

Zmiany wskaźnika aktywności lipolitycznej (średnie i odchylenia standardowe) szczepów *T. lanuginosus*, wyizolowanych z różnych naturalnych źródeł w czasie hodowli na pożywce zawierającej 1% tributyriny przedstawiono w Tabeli I. Najwyższe wartości wskaźnika aktywności lipolitycznej stwierdzono dla szczepów wyizolowanych z surowego ziarna kawy. Wartości te rosły do trzeciego dnia hodowli, a następnie stopniowo malały. W porównaniu ze szczepami wyizolowanymi z surowego ziarna kawy, pozostałe grupy szczepów charakteryzowały się znacząco niższymi wartościami wskaźnika aktywności lipolitycznej. Wśród tych pozostałych grup najwyższe wartości tego wskaźnika stwierdzono dla szczepów wyizolowanych z luskanych orzechów laskowych. W tej grupie szczepów stosunkowo wysoka wartość wskaźnika w pierwszym dniu, znacząco zmalała w drugim dniu hodowli. Jednakże od trzeciego do szóstego dnia utrzymywały się wartości wskaźnika aktywności lipolitycznej porównywalne z wartością w pierwszym dniu hodowli. Powyżej szóstego dnia hodowli wartości te uległy stopniowemu zmniejszeniu. Wyżej opisane zmiany wskaźnika aktywności lipolitycznej były istotne statystycznie. Z kolei różnice w wartościach wskaźnika aktywności lipolitycznej pomiędzy grupami szczepów wyizolowanych z podłoża pieczarkowego, biohumusu, kompostu ogrodowego i kompostu liściowego były statystycznie nieistotne.

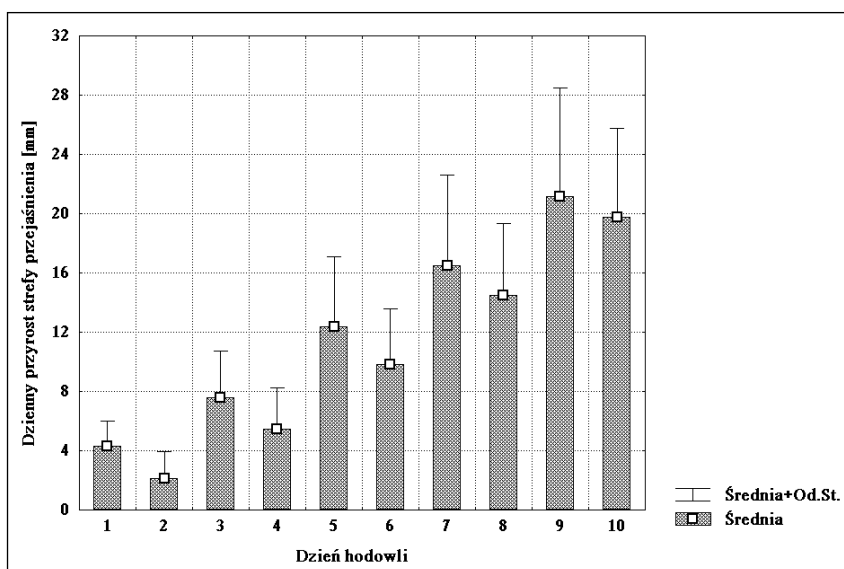
Tabela I. Zmiany wskaźnika aktywności lipolitycznej szczepów *Thermomyces lanuginosus* w czasie hodowli na pożywce stałej z trójbutyryną  
The lipolytic activity index changes during the *Thermomyces lanuginosus* growth on the tributyrin-containing medium

| Dzień hodowli | Wskaźnik aktywności lipolitycznej (średnie i odch. stand.) dla szczepów wyizolowanych ze źródeł: |                         |                     |           |                  |                  |
|---------------|--|-------------------------|---------------------|-----------|------------------|------------------|
|               | surowe ziarna kawy   | łuskane orzechy laskowe | podłoże pieczarkowe | biohumus  | kompost ogrodowy | kompost liściowy |
| 1             | 1,6 ± 0,3  | 1,6 ± 0,2               | 1,1 ± 0,1           | 1,5 ± 0,0 | 1,1 ± 0,0        | 1,5 ± 0,1        |
| 2             | 2,3 ± 0,1  | 1,3 ± 0,0               | 1,2 ± 0,2           | 1,3 ± 0,2 | 1,3 ± 0,0        | 1,4 ± 0,0        |
| 3             | 2,8 ± 0,2  | 1,5 ± 0,3               | 1,4 ± 0,2           | 1,4 ± 0,2 | 1,3 ± 0,0        | 1,2 ± 0,1        |
| 4             | 2,6 ± 0,2  | 1,6 ± 0,1               | 1,4 ± 0,1           | 1,1 ± 0,0 | 1,4 ± 0,1        | 1,2 ± 0,0        |
| 5             | 2,6 ± 0,1  | 1,5 ± 0,2               | 1,3 ± 0,1           | 1,3 ± 0,2 | 1,4 ± 0,0        | 1,2 ± 0,0        |
| 6             | 2,5 ± 0,1  | 1,6 ± 0,4               | 1,3 ± 0,1           | 1,2 ± 0,1 | 1,3 ± 0,0        | 1,2 ± 0,1        |
| 7             | 2,3 ± 0,2  | 1,3 ± 0,2               | 1,2 ± 0,1           | 1,1 ± 0,1 | 1,2 ± 0,1        | 1,1 ± 0,0        |
| 8             | 2,2 ± 0,1  | 1,3 ± 0,1               | 1,1 ± 0,1           | 1,1 ± 0,1 | 1,1 ± 0,1        | 1,1 ± 0,1        |
| 9             | 2,1 ± 0,1  | 1,2 ± 0,1               | 1,2 ± 0,1           | 1,1 ± 0,1 | 1,1 ± 0,1        | 1,1 ± 0,0        |
| 10            | 1,9 ± 0,0  | 1,2 ± 0,1               | 1,2 ± 0,1           | 1,1 ± 0,0 | 1,1 ± 0,0        | 1,1 ± 0,0        |

Na Ryc. 1 zilustrowano ogólną tendencję zmian wskaźnika aktywności lipolitycznej (średnie i odchylenia standardowe dla wszystkich szczepów). Do trzeciego dnia hodowli obser-

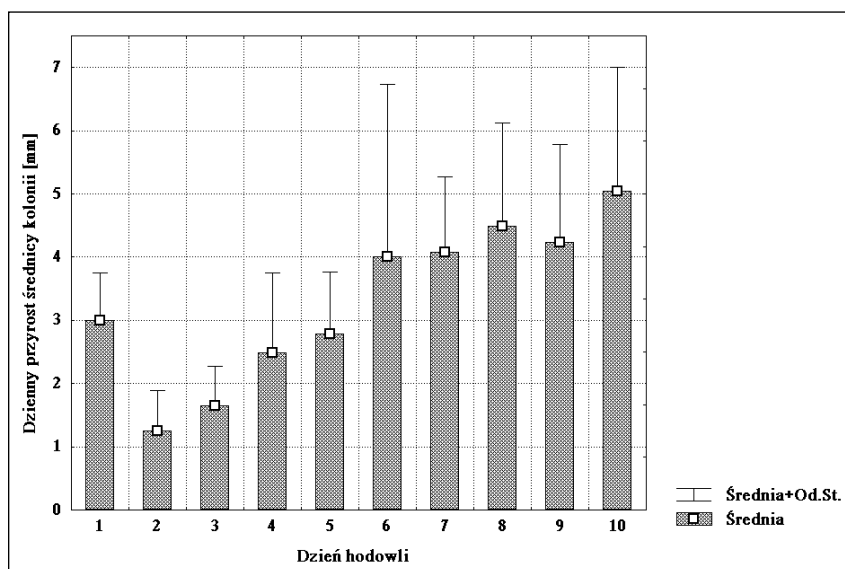


Ryc. 1. Zmiany wskaźnika aktywności lipolitycznej *Thermomyces lanuginosus* w czasie hodowli na pożywce z tributyriną (średnie i odchylenia standardowe dla wszystkich szczepów).  
The lipolytic activity index changes during the *Thermomyces lanuginosus* growth on the tributyrin-containing medium (means and standard deviations for all strains).



Ryc. 2. Zmiany dziennego przyrostu średnicy strefy przejaśnienia wokół kolonii *Thermomyces lanuginosus* w czasie hodowli na pożywce z tributyriną (średnie i odchylenia standardowe dla wszystkich szczepów).

The daily clearing zone increase changes during the *Thermomyces lanuginosus* growth on the tributyrin-containing medium (means and standard deviations for all strains).



Ryc. 3. Zmiany dziennego przyrostu średnicy kolonii *Thermomyces lanuginosus* w czasie hodowli na pożywce z tributyriną (średnie i odchylenia standardowe dla wszystkich szczepów).

The daily growth rate changes during the *Thermomyces lanuginosus* growth on the tributyrin-containing medium (means and standard deviations for all strains).

wowano wzrost wartości tego wskaźnika. Wysokie wartości wskaźnika utrzymywały się od trzeciego do piątego dnia, by ulec stopniowemu zmniejszeniu w końcowej fazie hodowli. Z kolei codzienne przyrosty średnicy strefy przejaśnienia (Ryc. 2) miały tendencję wzrostową w przeciągu całego okresu hodowli. Wzrost ten miał jednak przebieg skokowy, tzn. po każdym dużym przyroście średnicy strefy przejaśnienia, w następnym dniu przyrost ten był znacząco mniejszy. Zmiany te były najlepiej widoczne dla szczepów wyizolowanych z surowego ziarna kawy. Wszystkie badane grupy szczepów charakteryzowały się zbliżonymi zmianami dziennego przyrostu średnicy kolonii. Na Ryc. 3 zilustrowano ogólną tendencję tych zmian. Wartość dziennego przyrostu średnicy kolonii wyraźnie zmniejszyła się w drugim dniu, od trzeciego do szóstego dnia miała tendencję wzrostową, a powyżej szóstego dnia – utrzymywała się na zbliżonym poziomie. Wyżej przedstawione zmiany były statystycznie istotne.

### DYSKUSJA

Szczepy wyizolowane z surowego ziarna kawy charakteryzowały się bardzo wysoką aktywnością lipolityczną na tributyrynie. Stosunkowo wysoką aktywność lipolityczną wykazywały również szczepy wyizolowane z luskanych orzechów laskowych; w niniejszej pracy potwierdzono więc wniosek wyciągnięty wcześniej przez *Jandę i Falkowskiego* [6]. Ogólnie można wnosić, że szczepy wyizolowane z surowców roślinnych wykazywały aktywność lipolityczną znacząco wyższą od aktywności szczepów wyizolowanych z podłoża pieczarkowego, biohumusu i kompostów. Wiadomo, że ziarno kawy i orzechy charakteryzują się bogatym składem chemicznym. Duży udział w puli związków organicznych tych surowców mają substraty tłuszczowe, głównie trójglicerydy [12, 16]. Z kolei komposty, biohumus i podłoże pieczarkowe mają składy chemiczne znacznie różniące się od składu surowców roślinnych, jak również stwarzają zupełnie odmienne warunki środowiskowe dla drobnoustrojów. W dojrzałych kompostach dominują kwasy humusowe, a substancje tłuszczowe pochodzą głównie od bakterii i grzybów [9, 13]. Wydaje się, że tą odmiennością składu chemicznego i warunków środowiskowych można wytłumaczyć różnice w aktywności lipolitycznej badanych szczepów. Na podstawie składu chemicznego trudno jednak wyjaśnić różnice w aktywności lipolitycznej pomiędzy szczepami wyizolowanymi z surowych ziaren kawy i luskanych orzechów laskowych.

W doświadczeniu zaobserwowano hamowanie wzrostu *T. lanuginosus* w drugim dniu hodowli. W tym dniu stwierdzono również wzrost wskaźnika aktywności lipolitycznej i obniżenie dziennego przyrostu średnicy strefy przejaśnienia. Wiadomo, że produktami hydrolizy tributyriny są gliceryna i kwas masłowy. Gliceryna jest inhibitorem wielu enzymów grzybowych [2], a kwas masłowy wykazuje toksyczne właściwości wobec grzybów, zwłaszcza wobec grzybów strzępkowych [17]. W świetle dostępnych danych można postawić hipotezę, że obniżenie wartości dziennego przyrostu średnicy kolonii i dziennego przyrostu strefy przejaśnienia w drugim dniu hodowli mogło być wynikiem hamującego wpływu produktów hydrolizy tributyriny. W kolejnych dniach wzrost szczepów był jednak coraz szybszy, ale wzrost średnicy strefy przejaśnienia miał skokowy przebieg. Może to oznaczać, że szczepy *T. lanuginosus* w jakimś stopniu zaadaptowały się do wysokich stężeń gliceryny i kwasu masłowego; te produkty hydrolizy tributyriny nie miały już wpływu na wzrost szczepów, miały natomiast znaczący wpływ na ich aktywność lipolityczną. Wskaźnik aktywności lipolitycznej nie ukazuje jednak powyższych zmian.

Ze względu na wysoką aktywność lipolityczną szczepu izolowane z surowych ziaren kawy i luskanych orzechów laskowych mogą być wykorzystane do różnych celów aplikacyjnych. Można więc mówić o dużym potencjale biotechnologicznym tych szczepów. Nie ulega również wątpliwości, że badania skriningowe aktywności enzymatycznej grzybów izolowanych z różnych naturalnych źródeł mają duże znaczenie z biotechnologicznego punktu widzenia.

K. Janda, A. Stolarska

#### A STUDY OF THE *THERMOMYCES LANUGINOSUS* LIPOLYTIC ACTIVITY ON TRIBUTYRIN

##### Summary

The study was to compare the lipolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* wild strains on the medium containing 1-% tributyrin. The strains were isolated from raw coffee beans, shelled hazelnuts, mushroom compost, biohumus, garden compost and leaf compost. The incubation was carried out at 55°C for ten days. The lipolytic activity index was the hydrolysis zone diameter/colony diameter ratio. Daily growth rates and daily clearance zone increase were also analyzed. All strains tested hydrolyzed tributyrin. The highest lipolytic activity index values were found in the strains isolated from raw coffee beans. Relatively high lipolytic activity index values were also found in the strains isolated from shelled hazelnuts. The highest lipolytic activity indices were observed between the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> day of incubation. It was hypothesized that the products of the tributyrin hydrolysis considerably affected both fungal growth and lipolytic activity. The *T. lanuginosus* strains isolated from raw coffee beans and shelled hazelnuts have a great biotechnological potential.

##### PIŚMIENNICTWO

1. Cooney D.G., Emerson R.: Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. W.H. Freeman and Company. San Francisco & London, 1964.
2. Gradišnik-Grapulin M., Legiša M.: Comparison of specific metabolic characteristics playing a role in citric acid excretion between some strains of the genus *Aspergillus*. Journal of Biotechnology 1996, 45, 265-270.
3. Harrigan W.F., McCance M.E.: Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press. London, 1976.
4. 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.
5. Janda K., Falkowski J.: Grzyby termofilne – występowanie, właściwości biochemiczne i temperatury kardynalne. Post. Mikrobiol. 2001, 40, 287-310.
6. Janda K., Falkowski J.: Badanie aktywności lipolitycznej szczepów termofilnego grzyba *Thermomyces lanuginosus* (syn. *Humicola lanuginosa*) na podłożu płynnym. Acta Scientiarum Polonorum, Biologia, 2002, 1, 43-48.
7. Janda K., Falkowski J.: Termofilny grzyb *Thermomyces lanuginosus* – występowanie i właściwości. Post. Mikrobiol. 2003, 42, 55-66.
8. 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, 97, 665-669.
9. Kaiser J.: Modelling composting as a microbial ecosystem: a simulation approach. Ecological Modelling 1996, 91, 25-37.

10. *Mouchacca J.*: Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. *Cryptogamie, Mycol.* 1997, 18, 19-69.
11. *Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T.*: The realm of microbial lipases in biotechnology. Review. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999, 29, 119-131.
12. *Patarroyo M.E.*: Chemistry of coffee. The Coffee and Health Seminar. Cartagena ([www.ico.org/event/cofhealth/cofhealth.htm](http://www.ico.org/event/cofhealth/cofhealth.htm)), 2003.
13. *C.*: Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society Transactions* 2002, 30, 1047-1050.
14. *Reetz M.T.*: Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 2002, 6, 145-150.
15. *Sharma C., Chisti Y., Banerjee U.C.*: Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 2001, 19, 627-662.
16. *Vigli G., Phillippidis A., Spyros A., Dais P.*: Classification of edible oils by employing  $^{31}\text{P}$  and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5715-5722.
17. *Woolford M.K.*: The antimicrobial spectra of organic compounds with respect to their potential as hay preservatives. *Grass and Forage Science* 1984, 39, 75-79.

Otrzymano: 2004.12.28