

Katarzyna JANDA, Agata MARKOWSKA-SZCZUPAK¹

**WPLYW AKTYWNOŚCI WODY I TEMPERATURY NA WZROST
ORAZ AKTYWNOŚĆ LIPOLITYCZNĄ KSEROFILNEGO GRZYBA
EUROTIUM HERBARIORUM (Weber ex F.H. Wigg.) Link**

**INFLUENCE OF WATER ACTIVITY AND TEMPERATURE ON GROWTH
AND LIPOLYTIC ACTIVITY OF XEROPHILIC FUNGUS *EUROTIUM
HERBARIORUM* (Weber ex F.H. Wigg.) Link**

Zakład Biochemii i Żywnienia Człowieka, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

¹Zakład Biotechnologii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Abstract. *Eurotium herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link strains isolated from rapeseed, soybean and sunflower seed were incubated on liquid medium with oils, adequately, rapeseed oil, soybean oil and sunflower oil. Influence of water activity (a_w) of medium (0.995; 0.950; 0.900 and 0.850) and temperature (15° and 25°C) on dry mass, proteins content and lipolytic activity were studied. Irregardless of oil type, protein content achieved by *Eurotium herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link strains on medium of water activity in the range between 0,900 and 0,995 at 25°C were higher that at 15°C. The study proved, that all strains were able to biosynthesis lipolytic exoenzymes on liquid medium with oils. Lipolytic activity was higher at 15°C than at 25°C. This indicates that presence *Eurotium herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link strains in oilseeds may to initiate disadvantageous quality changes of oils.

Słowa kluczowe: aktywność lipolityczna, *Eurotium herbariorum*, sucha masa grzybni, zawartość białka.

Key words: dry mass of mycelium, *Eurotium herbariorum*, lipolytic activity, protein content.

WSTĘP

Grzyby kserofilne to mikroorganizmy preferujące środowiska o obniżonej aktywności wody. Według Andrews i Pitt (1987) do tej grupy drobnoustrojów zalicza się drobnoustroje, które są zdolne do wzrostu w warunkach aktywności wody poniżej 0,85. Na szczególną uwagę zasługują gatunki z rodzaju *Eurotium*: *E. amstelodami* (anamorf *Aspergillus vitis*), *E. chevalieri* (anamorf *Aspergillus chevalieri*) i *E. herbariorum* (anamorf *Aspergillus glaucus*), które należą do najważniejszych grzybów odpowiedzialnych za psucie się żywności o niskiej wilgotności (Dantigny i in. 2005). Są szeroko rozpowszechnione, zwłaszcza w rejonach tropikalnych i subtropikalnych, w glebach, sokach owocowych, przyprawach, produktach mięsnych, żywności suszonej, pieczywie, na ziarnach zbóż, orzechach, w suszonych ziołach,

Adres do korespondencji – Corresponding author: dr hab. Katarzyna Janda, Zakład Biochemii i Żywnienia Człowieka, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, ul. Władysława Broniewskiego 24, 71-460 Szczecin, e-mail: Katarzyna.Janda@pum.edu.pl

w sianie oraz w powietrzu i kurzu (Abellana i in. 1999, Samson i in. 2000, Krikštaponis i in. 2001, Gock i in. 2003, Karwowska i in. 2004, Janda i Ulfing 2005, 2006, Abe 2010, Škrinjar i in. 2012a, b). Wykazano, że gatunki wyizolowane z suszonych ziół, hodowane na podłożach agarowych, są zdolne do biosyntezy katalazy, ureazy, DNA-zy, ponadto hydrolizują kazeinę mleka, żelatynę, skrobię, tributyriny i olej rzepakowy oraz rosną na podłożu stałym z dodatkiem oleju napędowego Diesel i paliwa Biodiesel (Janda i in. 2009). Dowiedziono, że szczepy *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link syntetyzują mykotoksyny: patulinę, sterygmatocystynę, echinulinę, kladosporynę, neoechinulinę A, B, C i D, flawoglaucynę, auroglaucynę, fycion, izotetrahydroglaucynę, epiheweadryd (Al-Julaifi i in. 1996, Samson i in. 2000, Krikštaponis i in. 2001, Butinar i in. 2005, Kokič-Tanakov i in. 2007, Slack i in. 2009). Samson i in. (2000) stwierdzili, że żywność zanieczyszczona *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link jest toksyczna dla królików i może powodować niestrawność u ludzi. W dostępnej literaturze brakuje prac na temat wpływu aktywności wody i temperatury na aktywność lipolityczną szczepów tego gatunku.

Celem pracy była ocena wpływu aktywności wody i temperatury na wzrost i aktywność lipolityczną szczepów *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły szczepy *Eurotium herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link wyizolowane z nasion rzepaku, soi i słonecznika. Do wyodrębniania grzybów wykorzystano pożywkę DG18, a inkubację prowadzono w temperaturze 25°C (Janda i Ulfing 2005).

Doświadczenie przebiegało w dwóch etapach.

W pierwszym etapie wykorzystano zmodyfikowaną pożywkę płynną Bancercz i in. (2005) zawierającą: 10 g glukozy, 2 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 g mocznika, 8 μg d-biotyny, 200 μg tiaminy, 4 μg myo-inositolu, 1000 cm^3 wody destylowanej; pH 5,5. Oleje dodawano do pożywki, w postaci emulsji w 7-procentowym roztworze gumy arabskiej (4% v/v), w ilości 5 cm^3 w 100 cm^3 pożywki. W zależności od ilości dodanego chlorku sodowego otrzymano pożywkę o aktywności wody 0,995, 0,95, 0,90 i 0,85 a_w (Lang 1967). Aktywność wody z pożywki weryfikowano miernikiem aktywności wody firmy Decagon: DE 202 Aqua Lite. Do posiewów na pożywkę z olejem rzepakowym (Rapeseed oil, from *Brassica rapa*, Fluka), sojowym (Soybean oil, Sigma – Aldrich) lub słonecznikowym (Sunflower seed oil, Fluka) wykorzystano po 3 szczepy *E. herbariorum*, wyizolowane z nasion rzepaku, soi lub słonecznika (łącznie 9 szczepów). W celu otrzymania zawiesiny zarodników szczepy hodowano 10–14 dni na skosach z podłożem MEA w 25°C. Do skosów wprowadzono jałowy płyn do rozcieńczeń w ilości po 7 cm^3 . Probówki wytrząsano na aparacie typu Vortex przez minutę. Pożywkę z olejem rzepakowym zaszczepiano zawiesiną zarodników szczepów wyodrębnionych z nasion rzepaku, pożywkę z olejem sojowym – zarodnikami szczepów z nasion soi, a pożywkę z olejem słonecznikowym – zarodnikami szczepów z nasion słonecznika. Kolby o pojemności 300 cm^3 , zawierające po 100 cm^3 pożywki, inokulowano 1 cm^3 zawiesiny zarodników o gęstości 10^6 – 10^7 jtk $\cdot \text{ml}^{-1}$ (Chopra i in. 1982). Hodowle statyczne prowadzono przez 5 dób w temperaturze 15 i 25°C. Otrzymany przesącz pochodzący był źródłem egzoenzymów lipolitycznych, wykorzystanym w kolejnym etapie doświadczenia.

W drugim etapie doświadczenia wykonano test na aktywność egzolipaz syntetyzowanych przez szczepy *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link podczas hodowli statycznej na pożywkach płynnych. W tym celu przygotowano mieszaninę reakcyjną o następującym składzie: 2,5 cm³ emulsji oleju (odpowiednio rzepakowego, sojowego lub słonecznikowego) w 7-procentowym roztworze gumy arabskiej (4% v/v), 3,5 cm³ buforu Tris-HCl o pH 8,0 oraz 5 cm³ przesączu pohodowlanego, który był źródłem kompleksu egzolipaz. Tak przygotowaną mieszaninę wytrząsano w kolbkach, o pojemności 100 cm³, w łaźni wodnej Julabo SW 22 w 30°C przez 60 min (150 obr/min). Po godzinie inkubacji reakcję przerywano przez dodanie 10 cm³ 96-procentowego etanolu. Do próbek kontrolnych po inkubacji emulsji z buforem Tris-HCl w identycznych warunkach dodawano 10 cm³ etanolu, a następnie 5 cm³ przesączu pohodowlanego. W tak przygotowanych próbkach określano ilość wolnych kwasów tłuszczowych uwolnionych przez egzolipazy obecne w przesączu pohodowlanym w warunkach doświadczenia. Do miareczkowania wobec fenoloftaleiny wykorzystano 0,05N roztworu KOH. Wyniki przedstawiono w jednostkach aktywności lipolitycznej U. Za jednostkę aktywności lipazy przyjmuje się ilość enzymu potrzebną do uwolnienia 1 milimola wolnych kwasów tłuszczowych w ciągu minuty, w warunkach doświadczenia (Larsen i Jensen 1999, Paskevicius 2001, Saxena i in. 2003, Cihangir i Sarikaya 2004, Colen i in. 2006, Cho i in. 2007, Shukla i in. 2007). Wyniki przedstawiono w jednostkach aktywności lipolitycznej U · ml⁻¹. W hodowlach płynnych oznaczono również zawartość białka (Lowry i in. 1951) i suchej masy grzybni. W celu określenia suchej masy grzybnie pięciodobowych hodowli oddzielano na sączkach z bibuły filtracyjnej Whatman nr 1. Aby dokładnie pozbyć się składników pożywki, sączek przepłukiwano najpierw ciepłą wodą (w celu wypłukania chlorku sodu), później heksanem (wymycie tłuszczu), następnie etanolem (trzykrotnie porcjami po 10 cm³), a na końcu wodą destylowaną (Loo i in. 2006). Pozostałą na sączku grzybnię suszono wstępnie powietrznie, a następnie w temperaturze 80°C do stałej masy (Colen i in. 2006).

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu arkusza kalkulacyjnego Excel oraz programu Statistica 8.0. Statystyczną istotność różnic określano na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

WYNIKI I DISKUSJA

Przydatnymi narzędziami do określenia wzrostu grzybów *Eurotium herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) na pożywkach z dodatkiem olejów roślinnych okazały się zawartość białka i suchej masy grzybni. Silny efekt główny obu właściwości stwierdzono na poziomie istotności $p < 0,05$ (tab. 1). Na pożywce z olejem rzepakowym w temperaturze 15°C zawartość suchej masy wahała się od 0,93 mg · ml⁻¹ na pożywce o $a_w = 0,850$ do 2,59 mg · ml⁻¹ na pożywce o $a_w = 0,995$, jednak różnice te były statystycznie nieistotne (rys. 1). W temperaturze 25°C odpowiednie wartości mieściły się w przedziale od 1,04 mg · ml⁻¹ do 5,20 mg · ml⁻¹, na pożywkach o a_w wynoszącym odpowiednio 0,850 i 0,900. Najniższa zawartość suchej masy (1,04 mg · ml⁻¹) różniła się statystycznie istotnie od wartości uzyskanych na pożywkach o $a_w = 0,900$, 0,950 i 0,995 (wynosiła odpowiednio 5,20 mg · ml⁻¹, 5,03 mg · ml⁻¹ i 5,16 mg · ml⁻¹). Sucha masa uzyskana na pożywkach o $a_w = 0,900$, 0,950 i 0,995 w 25°C (odpowiednio 5,20 mg · ml⁻¹, 5,03 mg · ml⁻¹ i 5,16 mg · ml⁻¹) była większa od uzyskanej na tych samych pożywkach w temperaturze 15°C (2,16 mg · ml⁻¹, 1,95 mg · ml⁻¹ i 2,59 mg · ml⁻¹).

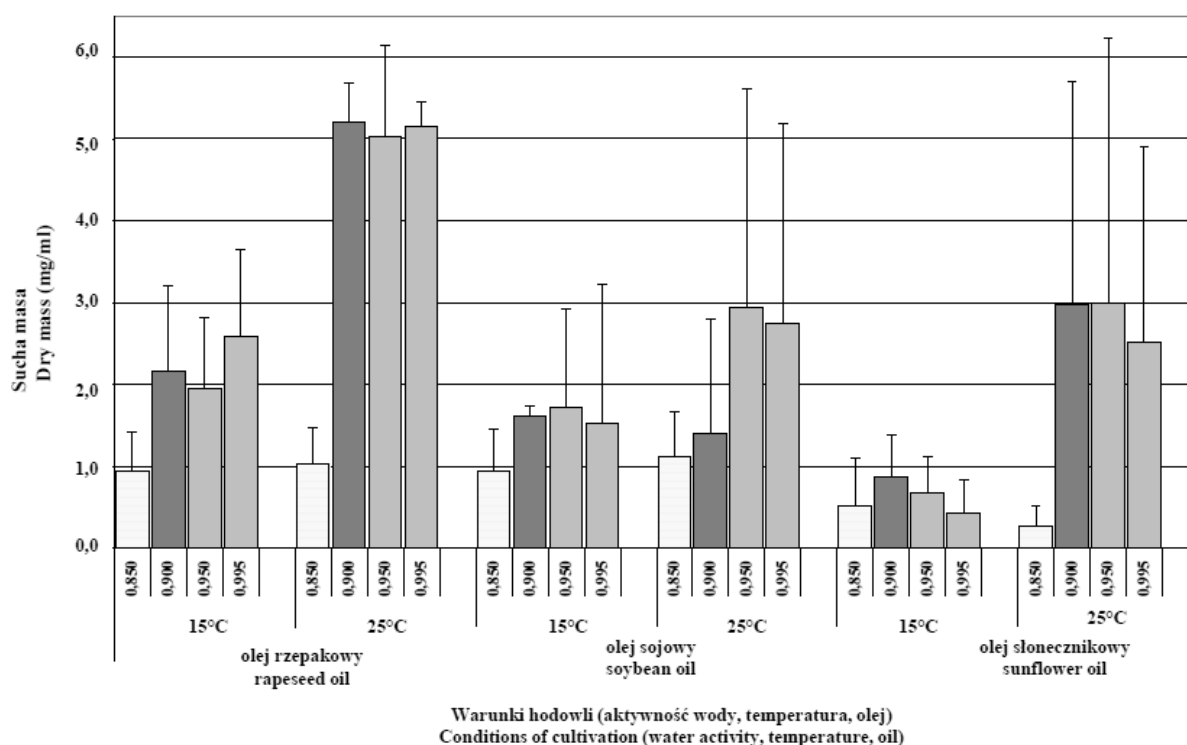
Tabela 1. Analiza wariacji dla parametrów wzrostu i aktywności lipolitycznej *E. herbariorum* na pożywce płynnej
 Table 1. Analysis of variation for the growth parameters and lipolytic activity for *E. herbariorum* strains on liquid culture medium

Parametry Parameters	F	p
Aktywność lipazy Lipase activity	1,58	0,0722
Sucha masa grzybni Dry mass of mycelium	4,11	0,0000*
Zawartość białka Protein content	33,37	0,0000*

*Zależności statystycznie istotne na poziomie istotności $p < 0,005$ – Correlations statistically significant at the significance level of $p < 0.005$.

p – poziom istotności – level of significance.

F – wynik analizy wariancji – the result of analysis.

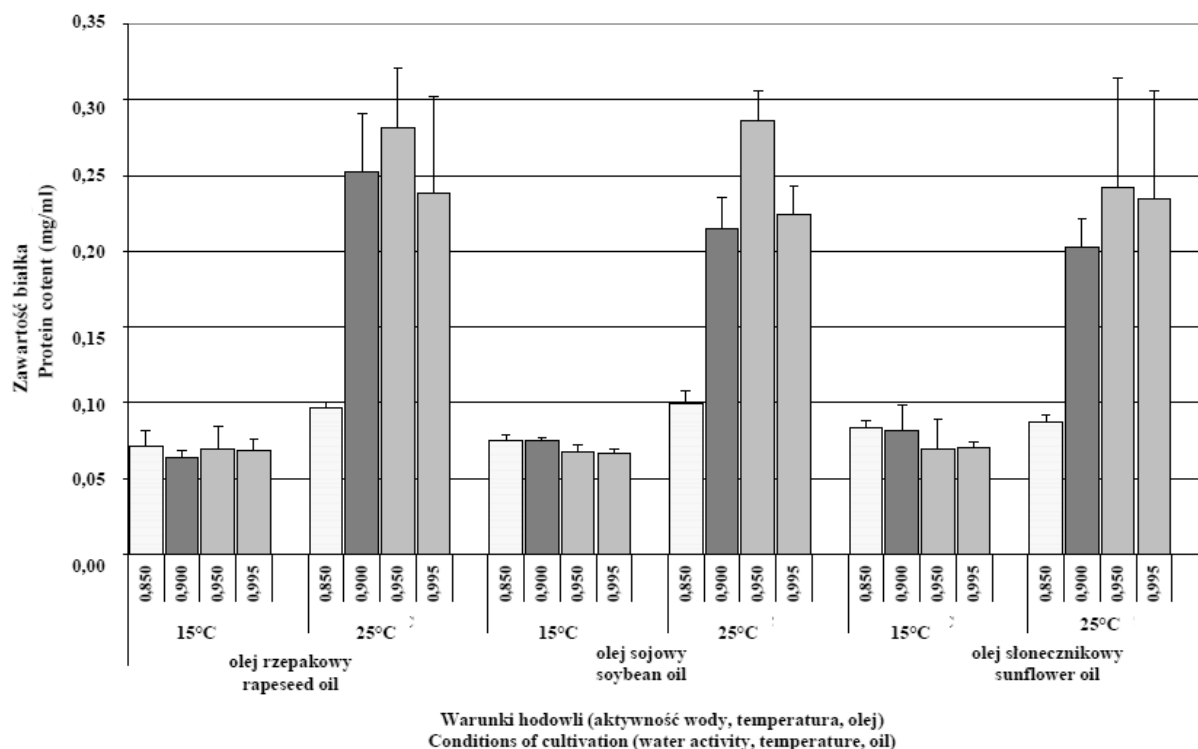


Rys. 1. Średnia zawartość suchej masy grzybni (\pm odchylenie standardowe) szczepów *E. herbariorum* po pięciu dniach hodowli na pożywkach płynnych z olejami roślinnymi
 Fig. 1. Mean dry mass (\pm standard deviation) *E. herbariorum* strains after 5 days incubation on liquid culture medium with oils

Różnice te były statystycznie istotne. Na pożywce z olejem sojowym w temperaturze 15°C zawartość suchej masy wynosiła od $0,93 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ do $1,73 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, na pożywkach o a_w wynoszącym odpowiednio 0,850 i 0,950. Sucha masa grzybni szczepów hodowanych w 25°C mieściła się natomiast w przedziale od $1,11 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ na pożywce o $a_w = 0,850$ do $2,93 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ przy $a_w = 0,950$, ale różnice te były statystycznie nieistotne. Na pożywce

z olejem słonecznikowym w temperaturze 15° sucha masa wahała się od 0,43 mg · ml⁻¹ na pożywce o a_w = 0,995 do 0,87 mg · ml⁻¹ przy a_w = 0,900, ale różnice te nie były statystycznie istotne. W temperaturze 25°C wartości te mieściły się w przedziale od 0,26 mg · ml⁻¹ do 2,99 mg · ml⁻¹ na pożywkach o a_w wynoszącym odpowiednio 0,850 i 0,950. Stwierdzono, że różnice pomiędzy najniższą (0,26 mg · ml⁻¹) zawartością suchej masy uzyskaną na pożywce o a_w = 0,850 a wartościami osiągniętymi na pożywkach o a_w = 0,900, 0,950 i 0,995 (2,98 mg · ml⁻¹, 2,99 mg · ml⁻¹ i 2,51 mg · ml⁻¹) były statystycznie istotne. Ilość suchej masy, uzyskana w temperaturze 25°C na pożywkach, o a_w = 0,900, 0,950 i 0,995, z olejem rzepakowym, sojowym i słonecznikowym, była większa niż na tych samych pożywkach w temperaturze 15°C; różnice te były statystycznie istotne. Stwierdzono, że w temperaturze 15°C szczepy hodowane na pożywce, o a_w = 0,995, z olejem rzepakowym osiągały większą zawartość suchej masy niż szczepy na pożywce z olejem ze słonecznika o tej samej wartości a_w (odpowiednio 2,59 mg · ml⁻¹ i 0,43 mg · ml⁻¹). W temperaturze 25°C na pożywkach o a_w = 0,900 i 0,995 szczepy hodowane na pożywce z olejem rzepakowym uzyskiwały istotnie wyższą zawartość suchej masy grzybni (odpowiednio 5,20 mg · ml⁻¹ i 5,16 mg · ml⁻¹) niż na pożywkach z olejem sojowym (odpowiednio 1,41 mg · ml⁻¹ i 2,24 mg · ml⁻¹) i słonecznikowym (odpowiednio 2,98 mg · ml⁻¹ i 2,51 mg · ml⁻¹). Zdecydowanie sprzyjały przyrostowi biomasy grzybni szczepów *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link na pożywkach z olejem rzepakowym i słonecznikowym temperatura 25°C i a_w pożywki w przedziale od 0,900 do 0,995.

Zawartość białka w przesączach pochodzących zilustrowano na rys. 2.



Rys. 2. Średnia zawartość białka (± odchylenie standardowe) w przesączach pochodzących z hodowli szczepów *E. herbariorum* po pięciu dniach hodowli na pożywkach płynnych z olejami roślinnymi
Fig. 2. Mean protein content (± standard deviation) after 5 days incubation of *E. herbariorum* strains on liquid culture medium with oils

W przypadku oleju rzepakowego w temperaturze 15°C zawartość białka wahała się od 0,064 mg · ml⁻¹ do 0,071 mg · ml⁻¹ na pożywkach o a_w wynoszącym odpowiednio 0,900 i 0,850; różnice te były statystycznie nieistotne. W temperaturze 25°C odpowiednie wartości mieściły się w przedziale od 0,097 mg · ml⁻¹ na pożywce o a_w = 0,850 do 0,281 mg · ml⁻¹ przy a_w = 0,950. Różnice statystycznie istotne wykazano pomiędzy najniższą zawartością białka (0,097 mg · ml⁻¹) uzyskaną na pożywce o a_w = 0,850 a wartościami osiągniętymi na pozostałych pożywkach. Najwyższa zawartość białka (0,281 mg · ml⁻¹) osiągnięta przez szczepy na pożywce o a_w = 0,950 różniła się istotnie od wartości najniższej (0,097 mg · ml⁻¹) oraz uzyskanej przy a_w = 0,995 (0,238 mg · ml⁻¹). Na pożywce z olejem sojowym w temperaturze 15°C zawartość białka wynosiła od 0,067 mg · ml⁻¹ na pożywce o a_w = 0,995 do 0,075 mg · ml⁻¹ przy a_w = 0,900, ale różnice te nie były statystycznie istotne. W temperaturze 25°C wartości te były bardziej zróżnicowane i wahały się od 0,999 mg · ml⁻¹ do 0,286 mg · ml⁻¹ na pożywkach o a_w wynoszącym odpowiednio 0,850 i 0,950; różnica ta była statystycznie istotna. W przypadku oleju słonecznikowego w temperaturze 15°C ilość białka mieściła się w przedziale od 0,069 mg · ml⁻¹ do 0,084 mg · ml⁻¹ na pożywkach o a_w wynoszącym odpowiednio 0,950 i 0,850; różnice te były statystycznie nieistotne. W temperaturze 25°C zawartość białka wahała się od 0,087 mg · ml⁻¹ na pożywce o a_w wynoszącym 0,850 do 0,243 mg · ml⁻¹ przy a_w = 0,950. Różnice statystycznie istotne stwierdzono pomiędzy najniższą (0,087 mg · ml⁻¹) zawartością białka uzyskaną na pożywce o a_w = 0,850 zawartościami na pożywkach o a_w = 0,900, 0,950 i 0,995 (odpowiednio 0,20 mg · ml⁻¹, 0,24 mg · ml⁻¹ i 0,23 mg · ml⁻¹). Niezależnie od rodzaju oleju dodawanego do pożywki zawartości białka uzyskane przez szczepy na pożywkach o a_w w zakresie od 0,900 do 0,995, w temperaturze 25°C, były wyższe od osiągniętych na tych samych pożywkach w temperaturze 15°C; różnice te były statystycznie istotne. Ponadto w temperaturze 25°C najniższą zawartością białka charakteryzowały się przesącze uzyskane podczas hodowli szczepów na pożywkach o a_w = 0,850. Różnice pomiędzy tymi wartościami a uzyskanymi na pożywkach o pozostałych wartościach a_w były statystycznie istotne. Stwierdzono, że na pożywce o a_w = 0,900 w temperaturze 25°C szczepy hodowane na pożywce z olejem rzepakowym charakteryzowały się wyższą (0,25 mg · ml⁻¹) zawartością białka niż na pożywce z olejem słonecznikowym (0,20 mg · ml⁻¹). Dowiedziono również, że szczepy hodowane w temperaturze 25°C na pożywce o a_w = 0,950 z olejem sojowym charakteryzowały się wyższą (0,29 mg · ml⁻¹) zawartością białka w przesączu pohodowlanym niż na pożywce z olejem słonecznikowym (0,24 mg · ml⁻¹); różnice te były statystycznie istotne.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zawartość suchej masy grzybni oraz białka była w większym stopniu uzależniona od temperatury, w której prowadzono hodowlę grzybów. W dostępnej literaturze nieliczne są prace dotyczące szczepów *Eurotium herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link. Abellana i in. (1999) badali wpływ aktywności wody z pożywki stałej i temperatury na wzrost grzybni szczepów kilku gatunków należących do rodzaju *Eurotium*. Autorzy ci wykazali, że minimalna aktywność wody niezbędna do wzrostu grzybni uzależniona jest od temperatury środowiska. W przypadku szczepów *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link odnotowano a_w = 0,80 w temperaturze 15°C i 20°C oraz a_w = 0,75 w temperaturze 25°C i 30°C. Badania własne potwierdziły, że kombinacja temperatury i aktywności wody z podłoża w trakcie przechowywania nasion roślin olejnych może zadecydować o stopniu rozwoju grzybów z rodzaju *Eurotium* na ich powierzchni.

Przeprowadzona czynnikiowa analiza wariacji (tab. 2) wskazuje na istotny wpływ aktywności wody również na aktywność lipolityczną szczepów *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.). Na pożywce z olejem rzepakowym w temperaturze 15°C aktywność lipolityczna wahała się od 0,012 U · ml⁻¹ do 0,690 U · ml⁻¹, przy a_w wynoszącym odpowiednio 0,995 i 0,900 (rys. 3).

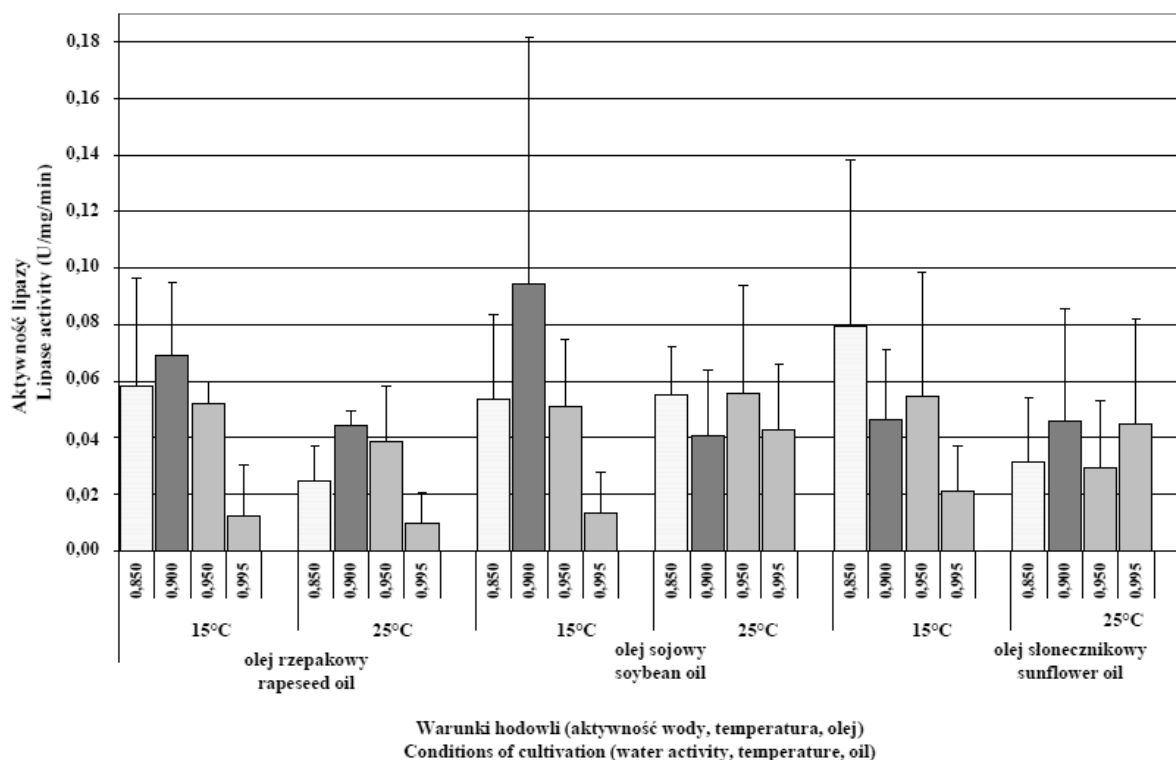
Tabela 2. Analiza czynnikowa ANOVA dla hodowli *E. herbariorum* na pożywce płynnej
 Table 2. Factor analysis ANOVA for *E. herbariorum* strains on liquid culture medium

Czynniki i kombinacje czynników Factors and combination of factors	Aktywność lipazy Lipase activity (U · ml ⁻¹)		Sucha masa Dry mass (mg · ml ⁻¹)		Zawartość białka Protein content (mg · ml ⁻¹)	
	F	p	F	p	F	p
	Rodzaj oleju – Type of oil	1,12	0,3314	11,03	0,0001*	0,73
Temperatura – Temperature	3,16	0,0795	24,54	0,0000*	504,30	0,0000*
Aktywność wody – Water activity (a _w)	4,59	0,0053*	8,20	0,0001*	37,83	0,0000*
Rodzaj oleju x temperatura – Type of oil x temperature	0,38	0,6859	2,53	0,0871	2,63	0,0788
a _w pożywki x rodzaj oleju – a _w of medium x type of oil	0,49	0,8166	1,12	0,3594	0,49	0,8157
a _w pożywki x temperatura – a _w of medium x temperature	2,39	0,0755	2,84	0,0441*	45,30	0,0000*
a _w pożywki x rodzaj oleju x temperatura a _w of medium x type of oil x temperature	1,07	0,3897	0,52	0,7922	0,69	0,6606

*Zależności statystycznie istotne na poziomie istotności p < 0,005 – Correlations statistically significant at the significance level of p < 0,005.

p – poziom istotności – level of significance.

F – wynik analizy wariancji – the result of analysis.



Rys. 3. Średnia aktywność lipolityczna (± odchylenie standardowe) szczepów *E. herbariorum* po pięciu dniach hodowli na pożywkach płynnych z olejami roślinnymi

Fig. 3. Mean lipolytic activity (± standard deviation) of *E. herbariorum* strains after 5 days incubation on liquid culture medium with oils

Stwierdzono, że różnica pomiędzy wartością najmniejszą ($0,012 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$), uzyskaną na pożywce o $a_w = 0,995$, a wartościami osiągniętymi przy $a_w = 0,850$ i $0,900$ (odpowiednio $0,06 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ i $0,07 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) była statystycznie istotna. W temperaturze 25°C aktywność lipolityczna była najwyższa ($0,044 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) na pożywce o $a_w = 0,900$, a najniższa ($0,010 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) przy $a_w = 0,995$, przy czym różnice te były statystycznie nieistotne. Na pożywce z olejem sojowym w temperaturze 15°C aktywność lipolityczna mieściła się w przedziale od $0,013 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ na pożywce o $a_w = 0,995$ do $0,095 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ przy $a_w = 0,900$. Różnica między wartościami największą i najmniejszą była statystycznie istotna. W temperaturze 25°C aktywność lipolityczna wahała się od $0,040 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ na pożywce o $a_w = 0,900$ do $0,056 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ przy $a_w = 0,950$; różnice te były statystycznie nieistotne. Aktywność lipolityczna szczepów *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link na pożywce o $a_w = 0,900$ z olejem sojowym była wyższa w temperaturze 15°C ($0,095 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) niż na tej samej pożywce w temperaturze 25°C ($0,040 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$); różnica ta była statystycznie istotna. Na pożywce z olejem słonecznikowym w temperaturze 15°C aktywność lipolityczna była najwyższa ($0,079 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) na pożywce o $a_w = 0,850$, a najniższa przy $a_w = 0,995$ ($0,021 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$); różnica ta była statystycznie istotna. W temperaturze 25°C aktywność lipolityczna szczepów była zbliżona i wynosiła od $0,029 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ do $0,046 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ na pożywkach o a_w wynoszącym odpowiednio $0,950$ i $0,900$; różnice były statystycznie nieistotne. Na pożywce z olejem słonecznikowym o $a_w = 0,850$ aktywność lipolityczna w temperaturze 15°C była wyższa niż na takiej samej pożywce w temperaturze 25°C ; różnica ta była statystycznie istotna. Dowiedziono, że w temperaturze 15°C na pożywce o $a_w = 0,900$ z olejem sojowym szczepy *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link charakteryzowały się wyższą ($0,09 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) aktywnością lipolityczną niż na pożywce o tej samej wartości a_w z olejem słonecznikowym ($0,05 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Wpływ aktywności wody na aktywność enzymatyczną grzybów mikroskopowych próbuje się tłumaczyć za pomocą różnych modeli, w tym wieloczynnikowych, wzbogaconych o wpływ warunków występujących w środowisku bytowania grzybów lub w pożywkach mikrobiologicznych (Sautour i in. 2001, Gock i in. 2003, Kredics i in. 2004).

Otrzymane wyniki świadczą o tym, że – pomimo że niskie a_w pożywek działa hamująco na produkcję biomasy grzybów *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link – nie hamuje to ich zdolności lipolitycznych. Można nawet stwierdzić, że w określonych warunkach środowiska (np. w obecności oleju słonecznikowego i temperaturze 15°C) ulegają one wzmocnieniu. Według Kredicsa i in (2004) wysokie zdolności adaptacyjne systemów enzymatycznych grzybów mikroskopowych są rezultatem ewolucji. Duża plastyczność enzymów umożliwia grzybom szeroką penetrację różnych środowisk oraz efektywne współzawodniczenie z innymi organizmami o substancje odżywcze. Jak wynika z najnowszych doniesień literaturowych (Disalvo i in. 2013), w środowiskach pozbawionych wody białka (również enzymatyczne) podlegają znacznie mniejszym zmianom konformacyjnym niż lipidy błonowe. Może to tłumaczyć znacznie większy wpływ aktywności wody na ilość produkowanej biomasy grzybowej niż na aktywność enzymatyczną.

PODSUMOWANIE

Szczepy *E. herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link w temperaturze 25°C na pożywkach o $a_w = 0,900$ i $0,995$ z olejem rzepakowym osiągały wyższą zawartość suchej masy grzybni, niż hodowane na pożywkach z olejem sojowym i słonecznikowym. W temperaturze 25°C ,

niezależnie od rodzaju dodanego oleju, zawartość białka uzyskana na pożywkach o a_w w zakresie od 0,900 do 0,995 była wyższa niż w temperaturze 15°C. Stwierdzono, że w temperaturze 25°C na pożywce o $a_w = 0,900$ z olejem rzepakowym szczepy tego gatunku charakteryzowały się wyższą zawartością białka niż na pożywce z olejem słonecznikowym. Dowiedziono również, że w hodowli w temperaturze 25°C na pożywce o $a_w = 0,950$ z olejem sojowym osiągnęły one wyższą zawartość białka niż na pożywce z dodatkiem oleju słonecznikowego. W odróżnieniu od zawartości suchej masy i białka zaobserwowano, że aktywność lipolityczna była wyższa w temperaturze 15°C niż w 25°C. Aktywność lipolityczna szczepów na pożywce z olejem sojowym o $a_w = 0,900$ była większa w temperaturze 15°C niż w 25°C. Na pożywce z olejem słonecznikowym w temperaturze 15°C aktywność lipolityczna była najwyższa przy $a_w = 0,850$, a najniższa przy $a_w = 0,995$. Ponadto przy $a_w = 0,850$ wartość ta w temperaturze 15°C była większa niż w 25°C. Szczepy hodowane w temperaturze 15°C na pożywce o $a_w = 0,900$ z olejem sojowym charakteryzowały się wyższą aktywnością lipolityczną niż na pożywce z olejem słonecznikowym.

Dowiedziono, że wszystkie badane szczepy wykazywały aktywność lipolityczną na pożywkach płynnych zawierających naturalne substraty tłuszczowe w postaci olejów roślinnych. Obecność szczepów *Eurotium herbariorum* (Weber ex F.H. Wigg.) Link na nasionach roślin oleistych i ich uaktywnienie się w czasie przechowywania nasion w temperaturze 15°C może być przyczyną pogorszenia się jakości olejów roślinnych.

Wyniki niniejszych badań zachęcają do kontynuacji prac w tym zakresie. Określenie czynników odpowiedzialnych za obniżenie aktywności lipolitycznej grzybów kserofilnych może przyczynić się do zmniejszenia strat powstających w trakcie przechowywania nasion roślin oleistych.

PIŚMIENNICTWO

- Abe K.** 2010. Assessment of the environmental conditions in a museum storehouse by use of a fungal index. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 32–40.
- Abellana M., Benedi J., Sanchis V., Ramos A.J.** 1999. Water activity and temperature effects on germination and growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* isolated from bakery products. *J. Appl. Microbiol.* 87(3), 371–380.
- Al-Julaifi M.Z., Al-Khalief A.S., Elkhider K.A.** 1996. Patulin production by fungi isolated from barley locally grown in Saudi Arabia. *J. King Saud Univ. Sci., Science* (8)1, 19–24.
- Andrews S., Pitt J.** 1987. Further studies on the water relations of xerophilic fungi including some halophiles. *J. Gen. Microbiol.* 133, 233–238.
- Bancerz R., Ginalska G., Fiedurek J., Gromada A.** 2005. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 32, 253–260.
- Butinar L., Zalar P., Frisvad J.C., Cimerman-Gunde N.** 2005. The genus *Eurotium* – members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *FEMS Microbiol Ecol.* 51, 155–166.
- Cho H.Y., Bancerz R., Ginalska G., Leonowicz A., Cho N.S., Ohga S.** 2007. Culture conditions of psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* and its lipase characteristics. *J. Faculty. Agr. Kyushu Univ.* 52(2), 281–286.
- Chopra A.K., Chander H., Singh J.** 1982. Lipolytic activity of *Syncephalastrum racemosum*. *J. Dairy Sci.* 65, 1890–1894.

- Cihangir N., Sarikaya E.** 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. World J. Microb. Biot. 20, 193–197.
- Colen G., Junqueira G.R., Moraes-Santos T.** 2006. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. World J. Microb. Biot. 22, 881–885.
- Dantigny P., Guilmar A., Bensoussan M.** 2005. Basis of predictive mycology. Int. J. Food Microbiol. 100, 187–196.
- Disalvo E.A., Hollmann A., Semorile L., Martini F.M.** 2013. Evaluation of the Defay-Prigogine model for the membrane interphase in relation to biological response in membrane-protein interactions. Biochim. Biophys. Acta 1828, 1834–1839.
- Gock M.A., Hocking A.D., Pitt J.I., Poulos P.G.** 2003. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. Int. J. Food Microbiol. 2481, 11–19.
- Janda K., Ulfig K.** 2005. Badania składu ilościowego i jakościowego grzybów w suszach roślin leczniczych. Roczn. PZH 56(4), 331–338. [in Polish]
- Janda K., Ulfig K.** 2006. A comparison of selected media and incubation temperatures for isolation of microscopic fungi from dried medicinal plants. Roczn. PZH 57(3), 267–276.
- Janda-Ulfig K., Ulfig K., Markowska A.** 2009. Extracellular enzyme profile of xerophilic fungi isolated from dried material of medicinal plants. Pol. J. Environ. Stud. 1 (3), 391–397.
- Karwowska W., Pierzynowska J., Janicki A., Waszkiewicz-Robak B., Przybylska A.** 2004. Qualitative and quantitative analysis of filamentous fungi in air, food and ochratoxin a in human milk. Pol. J. Food Nutr. Sci. 13/54(2), 41–44.
- Kredics L., Manczinger L., Anta Z., Penzes Z., Szekeres A., Kevei F., Nagy E.** 2004. In vitro water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. J. Appl. Microbiol. 96, 491–498.
- Kokič-Tanakov S.D., Dimič G.R., Karalič D.** 2007. Contamination of spices with moulds potential producers of sterigmatocystine. Apteft 38, 29–35.
- Krikštaponis A., Stakėnienė J., Lugauskas A.** 2001. Toxigenic fungi in human environment. Biologija 4, 10–12.
- Lang A.R.G.** 1967. Osmotic coefficients and water potentials of sodium chloride solutions from 0–40°C. Aust. J. Chem. 20, 2017–2023.
- Larsen M.D., Jensen K.** 1999. The effects of environmental conditions on the lipolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti*. Int. J. Food Microbiol. 46, 159–166.
- Loo J.L., Lai O.M., Long K., Ghazali H.M.** 2006. Identification and characterization of a locally isolated microfungus - *Geotrichum candidum*. Malays. J. Microbiol. 2(1), 22–29.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** 1951. Protein measurement with the Follin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
- Paskevicius A.** 2001. Lipase activity of yeast and yeast-like fungi functioning under natural conditions. Biologija 4, 16–18.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O.** 2000. Introduction to food- and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Sixth edition. Wageningen, The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Saxena R.K., Davidson W.S., Sheoran A., Giri B.** 2003. Purification and characterization of alkaline lipase from *Aspergillus carneus*. Process Biochem. 39, 239–247.
- Sautour M., Dantigny P., Divies C., Bensoussan M.** 2001. A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. Int. J. Food Microbiol. 67, 63–69.
- Shukla P., Gupta K., Kango N.** 2007. Production of lipase by typer-lipolytic *Rhizous oryzae* KG-10 on low-value oil emulsions. Res. J. Microbiol. 2(9), 671–677.
- Škrinjar M., Blagojev N., Petrović L.J., Šošo V., Vesković-Moračanin S., Škaljac S.** 2012a. Rom. Biotech. Lett. 17(6), 7726–7736.

- Škrinjar M.M., Petrović Ž.M., Blagojev N.T., Šošo V.M.** 2012b. Sunflower seed for human consumption as a substrate for the growth of mycopopulations. *APTEFF* 43, 115–121.
- Slack G.J., Puniani E., Frisvad J.C., Samson R.A., Miller J.D.** 2009. Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycol. Res.* 113, 480–490.

Praca sfinansowana z grantu MNiSW 2P06R 025 30

