

Teresa KRZYŚKO-ŁUPICKA¹, Łukasz KRĘCIDŁO¹ i Magdalena KOSZAŁKOWSKA¹

OCENA STOPNIA BIODEGRADACJI SUBSTANCJI TŁUSZCZOWEJ W OBECNOŚCI AUTOCHTONICZNEGO SZCZEPU *Penicillium citrinum* O AKTYWNOŚCI LIPOLITYCZNEJ

ESTIMATION OF FATTY SUBSTANCE BIODEGRADATION IN PRESENCE OF AUTOCHTHONOUS LIPOLYTIC *Penicillium citrinum* STRAIN

Abstrakt: Substancje tłuszczowe w środowisku przysparzają wiele problemów ekologicznych. Skuteczną metodą ich utylizacji jest wykorzystanie mikroflory autochtonicznej o aktywności lipolitycznej. Celem badań była ocena rozwoju i aktywności lipolitycznej szczepu *Penicillium citrinum* w procesie biodegradacji substancji tłuszczowej z zaolejonej ziemi bielącej (ZZB) w hodowlach płynnych. Aktywność lipolityczną badanego szczepu oceniono na podstawie stopnia biodegradacji substancji tłuszczowej, korzystając ze zmian mas ekstraktów tłuszczowych i wyniki analizy instrumentalnej (IR, ¹H, ¹³C NMR). Stopień biodegradacji osiągnął wartość bliską 100% po 28 dniach, co pozwala na wykorzystanie *Penicillium citrinum* w postaci szczepionki w usuwaniu substancji tłuszczowej bezpośrednio ze środowiska.

Słowa kluczowe: zaolejona ziemia bieląca, *Penicillium citrinum*, aktywność lipolityczna, biodegradacja

Wstęp

Źródłem substancji tłuszczowych w środowisku jest *zaolejona ziemia bieląca* (ZZB), będąca odpadem powstającym podczas rafinacji tłuszczu w zakładach tłuszczowych. Odpad ten przysparza wiele problemów ekologicznych. Fizykochemiczne metody utylizacji tego odpadu nie przynoszą zadowalających efektów i są kosztowne [1-3], dlatego dąży się do opracowania alternatywnej bezpośredniej metody unieszkodliwiania przy zastosowaniu autochtonicznej mikroflory o aktywności lipolitycznej [4, 5], przy czym korzysta się głównie z biodegradacyjnych właściwości bakterii. Poznanie dróg mikrobiologicznego rozkładu substancji tłuszczowych przez grzyby pozwoli na skuteczne wykorzystanie ich aktywności w procesach technologicznych.

Szybkość i skuteczność biodegradacji zależy zarówno od liczebności, jak i zdolności adaptacyjnych mikroorganizmów oraz formy użytkowej szczepionki [6], a w kontroli efektywności tego procesu należy stosować szybkie metody instrumentalne.

Celem badań była ocena rozwoju i aktywności lipolitycznej szczepu *Penicillium citrinum* w procesie biodegradacji substancji tłuszczowej z ZZB w hodowlach płynnych. Efektywność rozkładu substancji tłuszczowej oznaczano metodami instrumentalnymi (IR i ¹H, ¹³C NMR).

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowił:

- Ekstrakt tłuszczowy z ZZB o składzie 27,14% kwasu oktadecenowego C18:1 i 1,13% kwasu cyklopentaundekanowego,

¹ Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, kard. B. Kominka 6a, 45-035 Opole, tel. 77 401 60 57, email: teresak@uni.opole.pl

- Szczepionka *Penicillium citrinum* - autochtoniczny szczep wyselekcjonowany z ZZB, którego aktywność została wstępnie oznaczona w teście próbówkowym w podłożu z tributyriną [4].

Proces biodegradacji substancji tłuszczowej prowadzono w mineralnych podłożach płynnych [7], w których jedynym źródłem węgla były ekstrakty tłuszczowe z ZZB w stężeniach masowych 0,2 i 0,3%. Kontrolę bezwzględną stanowił rozwój mikroorganizmów w podłożu syntetycznym z glukozą, jako jedynym źródłem węgla, a względną - podłoże mineralne, zawierające 0,2% ekstraktu tłuszczowego (bez szczepionki). Szczep *Penicillium citrinum* namnażano na skosach z Tributyrin Agar firmy Fluka, zmywu dokonywano wodą z Tweenem (0,05%). Szczepionkę o gęstości $2 \cdot 10^6$ jtk \cdot cm⁻³ wprowadzono w ilości 10%.

Prowadzono hodowle wstrząsane w temperaturze 22°C przez 4 tygodnie. Obserwacje morfologii i fizjologii szczepionki oraz oznaczenia chemiczne (masy ekstraktów i analizę instrumentalną) wykonywano po 7, 14, 21 i 28 dniach.

Metody mikrobiologiczne

Kinetykę wzrostu badanego szczepu oznaczono na podstawie przyrostu suchej masy [$g \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$] w czasie. Równolegle prowadzono ocenę morfologiczną i fizjologiczną testowanej szczepionki w pełnym i modyfikowanym podłożu mineralnym.

Metody chemicznej analizy instrumentalnej

1. Przygotowanie ekstraktów tłuszczowych

Odwagę ZZB (5 g) ekstrahowano *n*-heksanem w aparacie Soxhleta. Otrzymany roztwór zatężano w wyparce próżniowej do otrzymania substancji oleistej i oznaczono jej masę.

2. Analiza instrumentalna ekstraktów tłuszczowych

Analiza spektrofotometryczna w podczerwieni (IR) przy zastosowaniu aparatu firmy Analytical Philips model PU 9800 FT-IR Spektrometr o rozdzielczości 2 cm⁻¹. Próbki w postaci filmu naniesionego na kryształ chorku sodu badano w zakresie liczb falowych 4000÷750 cm⁻¹. Analizę ¹H, ¹³C NMR przeprowadzono przy użyciu aparatu firmy Tesla model BS567A z zastosowaniem częstotliwości 100 MHz dla ¹H i 25,142 MHz dla ¹³C. Jako wzorzec zastosowano *tetrametylosilan* (TMS).

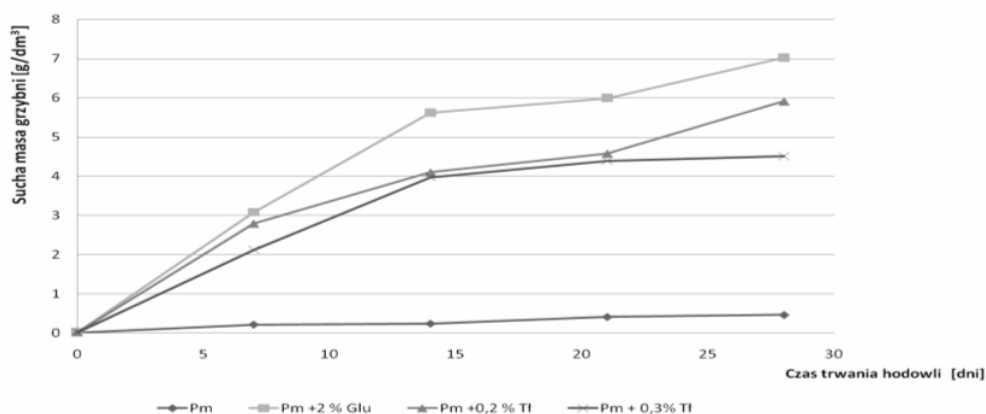
Wyniki i ich omówienie

Kinetyka wzrostu szczepu *Penicillium citrinum* w podłożach mineralnych z dodatkiem ekstraktów tłuszczowych (rys. 1) wykazała, że szczep ten wykorzystuje tłuszcz odpadowy jako źródło składników pokarmowych, ale w mniejszym stopniu niż glukozę. Większe przyrosty biomasy odnotowano, gdy zawartość tłuszczu w podłożu wynosiła 0,2%. Najwyższe różnice w przyrostach biomasy obserwowano w pierwszym i czwartym tygodniu hodowli.

Równolegle obserwowano zmiany makroskopowe i mikroskopowe rozwoju badanego szczepu (tab. 1). Niezależnie od stężenia tłuszczu w podłożu w 3 tygodniu trwania procesu pojawiały się pojedyncze komórki przypominające chlamidospory. Z kolei większe stężenie tłuszczu (0,3%) opóźniało zarodnikowanie grzyba.

Tabela 1
Zmiany makro- i mikroskopowe szczepu *Penicillium citrinum* w trakcie procesu biodegradacji tłuszczuTable 1
The macro- and microscopic changes of *Penicillium citrinum* during of fatty biodegradation process

Rodzaj podłoża	Wiek hodowli [dni]	Obserwacje	
		Makroskopowe	Mikroskopowe
1. P _m	7	Zbite kremowe flokulanty	Konidia elipsoidalne, cienkościenne Konidiofory cienkościenne
2. P _m + 0,2% glukozy		Grzybnia żółtozielona, śluzowata	Zarodniki elipsoidalne lekko kolczaste, grubościenne Konidiofory niesymetryczne grubościenne
3. P _m + 0,2% tłuszczu		Grzybnia kremowozielona, śluzowata	Zarodniki elipsoidalne, grubościenne Konidiofory niesymetryczne grubościenne
4. P _m + 0,3% tłuszczu		Grzybnia kremowa, śluzowata	Zarodniki brak Konidiofory niesymetryczne grubościenne
1. P _m	14	Bz	Bz
2. P _m + 0,2% glukozy		Bz	Bz
3. P _m + 0,2% tłuszczu		Grzybnia śluzowata, szara	Zarodniki elipsoidalne, grubościenne Konidiofory grubościenne, napęczniałe, mocno septowane, Pojawiają się chlamidospory
4. P _m + 0,3% tłuszczu		Flokulanty szarozielone	Zarodniki elipsoidalne, grubościenne Konidiofory grubościenne, napęczniałe, mocno septowane, Pojawiają się chlamidospory
1. P _m	21	Bz	Bz
2. P _m + 0,2% glukozy		Grzybnia śluzowata obfita żółtozielonoszara	Zarodniki elipsoidalne lekko kolczaste, grubościenne Konidiofory niesymetryczne grubościenne
3. P _m + 0,2% tłuszczu		Flokulanty szarozielone	Zarodniki elipsoidalne, grubościenne Konidiofory grubościenne, napęczniałe, mocno septowane, Obecne chlamidospory
4. P _m + 0,3% tłuszczu		Flokulanty szarozielone	Zarodniki elipsoidalne, grubościenne Konidiofory grubościenne, napęczniałe, mocno septowane, Obecne chlamidospory
1. P _m	28	Bz	Bz
2. P _m + 0,2% glukozy		Grzybnia śluzowata obfita	Zarodniki elipsoidalne lekko kolczaste, grubościenne Konidiofory niesymetryczne grubościenne
3. P _m + 0,2% tłuszczu		Flokulanty szarozielone	Zarodniki elipsoidalne, grubościenne, nabrzmiałe Konidiofory grubościenne, napęczniałe, mocno septowane, Obecne chlamidospory
4. P _m + 0,3% tłuszczu		Flokulanty szarozielone	Zarodniki elipsoidalne, grubościenne, nabrzmiałe Konidiofory grubościenne, napęczniałe, mocno septowane, Obecne chlamidospory



Rys. 1. Kinetyka wzrostu szczepu *Penicillium citrinum* w obecności 0,2 i 0,3% tłuszczu jako jedynego źródła węgla [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]

Fig. 1. The kinetic of *Penicillium citrinum* growth in the presence of 0.2 and 0.3% of fatty extracts as a sole source of carbon [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]

Efektom rozwoju grzyba w czasie trwania hodowli w podłożu mineralnym z tłuszczem jako alternatywnym źródłem węgla było obniżenie zawartości tłuszczu w podłożu, wskazujące na proces biodegradacji. Już po 7 dniach stopień biodegradacji wynosił ok. 60% i wzrastał w kolejnych tygodniach do prawie 100%. Intensywniej proces ten przebiegał w obecności 0,2% tłuszczu. Wyższe stężenie tłuszczu (0,3%), skutkujące niższym przyrostem biomasy, mogło być wynikiem hamowania transportu składników podłoża i tlenu do komórek grzyba (tab. 2).

Efekt biodegradacji tłuszczu w hodowlach szczepu *Penicillium citrinum* w czasie trwania procesu [%]

Tabela 2

The fatty biodegradation effects in presence of *Penicillium citrinum* in time [%]

Table 2

Czas trwania biodegradacji [dni]	Efekt biodegradacji [%]	
	Hodowle zawierające 0,2% tłuszczu	Hodowle zawierające 0,3% tłuszczu
0 (próbka wyjściowa)	-	-
7	61,54	50,00
14	78,85	80,47
21	98,44	86,54
28	99,80	94,53

Efekt działania szczepionki *P. citrinum* w przemianach substancji tłuszczowej z ZZB określono na podstawie zmian jakościowo-ilościowych oznaczonych metodami instrumentalnymi (IR i ^1H , ^{13}C NMR).

Korzystając z widm IR, stwierdzono, że zasadniczymi składnikami badanych próbek były związki zawierające ugrupowania alifatyczne (parafiny, olefiny) oraz niewielka ilość związków aromatycznych i związków z grupą karboksylową (tab. 3). Obecność związków parafinowych, olefinowych i znikomych ilości związków aromatycznych potwierdziły

również widma ^1H , ^{13}C NMR badanych próbek (tab. 4 i 5). W wyjściowej mieszaninie przeważały związki alifatyczne, stanowiące ok. 70%, a pozostałą część stanowiły głównie podstawione atomy węgla: olefinowe oraz w znacznie mniejszych ilościach aromatyczne i karboksylowe.

Pasma absorpcyjne w widmach IR oraz przypisane im elementy strukturalne dla wyjściowych próbek tłuszczu odpadowego

Tabela 3

The absorption bands in the IR spectra and structural elements assigned to them for the output of waste fat samples

Liczba falowa [cm^{-1}]	Rodzaj pasma	Elementy strukturalne
2925, 2854	Rozc. C-H	Ar-CH ₃ , -CH ₂ - w cykloalkanach
1741, 1711	Rozc. C=O	Aldehydy, kwasy karboksylowe, estry
1465	Def. asym. C-H Nożycowe C-H	-CH ₃ , -CH ₂ - -CH ₂ -O- estry
1414	Def. C-H	CH ₃ , CH ₂ , C=C-H
1378	Def. sym. C-H	CH ₃
1243	Rozc. C-O	Estry
966	Def. C-H	C=C-H
722	Def. C-H	Zw. aromatyczne, R ₁ CH=CHR ₂ (cis), (CH ₂) _n n>4

Zakresy przesunięć chemicznych atomów wodoru oraz ich dystrybucja [%] wyznaczona metodą ^1H NMR w próbkach zawierających 0,2% tłuszczu

Tabela 4

The chemical shift ranges of the hydrogen atoms as well as their distribution [%] determined by ^1H NMR in the samples containing 0.2% fat

Tabela 4

Zakres przesunięć chemicznych δ [ppm]	Udział procentowy w próbce wyjściowej [%]
H γ (-CH ₃) <1,1	9,61
H β (-CH ₂ -, -CH-) 1,1÷1,8	68,49
H α (Ar-CH ₃) 1,8÷3,2	14,32
Hol (C=CH) 4,3÷5,8	5,28
Har (Ar-H) >6,7	2,30

Zakresy przesunięć chemicznych atomów węgla oraz odpowiadające im względne intensywności [%] wyznaczone za pomocą o widma ^{13}C NMR w wyjściowych próbkach zawierających 0,2% tłuszczu

Tabela 5

The chemical shift ranges of the carbon atoms as well as their real intensities [%] determined by ^{13}C NMR in the samples containing 0.2% fat

Tabela 5

Zakres przesunięć chemicznych δ [ppm]	Względna intensywność [%]
C-alifatyczne 0÷50	69,91
C-podstawione 50÷110	20,06
C-aromatyczne 110÷145	8,41
C-karboksylowe 165÷185	1,82

Zmiany względnych intensywności [%] pasm absorpcji widm IR w czasie świadczą o przebiegu procesu biodegradacji substancji tłuszczowej w obecności szczepu *Penicillium citrinum* (tab. 6). Po 28 dniach stopień biodegradacji osiągnął wartość bliską 100%, co odpowiada minimalnym intensywnościom występujących pików.

Tabela 6
Pasma absorpcyjne w widmach IR oraz odpowiadające im względne intensywności [%] substancji tłuszczowej w czasie trwania biodegradacji w obecności szczepu *Penicillium citrinum*

Table 6
The absorption bands in the IR spectra as well as their real intensities [%] for the fat samples after biodegradation in presence of *Penicillium citrinum*

Intensywność [%]				
Czas biodegradacji [dni]				
Liczba falowa [cm ⁻¹]	7	14	21	28
2925, 2854	1,23; 0,77	1,20; 0,76	0,13; 0,70	1,37; 0,85
1741, 1711	0,70; 1,29	0,66; 1,19	0,57; 1,14	0,78; 1,36
1465	0,39	0,37	0,35	0,43
1414	0,35	0,33	0,30	0,38
1378	0,39	0,38	0,25	0,32
1243	0,70	0,68	0,64	0,74
966	0,53	0,52	0,50	0,55
722	0,00	0,00	0,00	1,61

Wnioski

1. Wskaźnikiem biodegradacji substancji tłuszczowej w obecności szczepu *Penicillium citrinum* są zmiany względnych intensywności pasm absorpcji widm IR w czasie trwania procesu; stopień biodegradacji osiągnął wartość bliską 100% po 28 dniach.
2. Aktywność przebadanego szczepu pozwala na wykorzystanie go w postaci szczepionki w usuwaniu substancji tłuszczowej bezpośrednio ze środowiska.
3. Wykorzystane w badaniach metody analizy instrumentalnej są wystarczające do szybkiego określenia stopnia biodegradacji substancji tłuszczowej z udziałem szczepionek mikrobiologicznych.

Literatura

- [1] Tsai WT, Chen HP, Hsien MF, Sun HF, Chien SF. J Anal Appl Pyrolysis. 2002; 63(1):157-170. DOI: 10.1016/S0165-2370(01)00150-4.
- [2] Tsai WT, Chen HP, Hsien MF, Lai CW, Lee MS. Resour Conservd Recycl. 2003;39(1):165-77. DOI: 10.1016/S0921-3449(02)00121-0.
- [3] Kheang LS, Foon CS, May HY, Ngan MA. Amer J Appl Sci. 2006;3(10):2063-2067. DOI: 10.3844/ajassp.2006.2063.2067.
- [4] Krzyśko-Łupicka T. Dynamika zmian mikrobiologicznych i przemian tłuszczu w zaolejonej ziemi bielącej w zależności od jej modyfikacji. Seria Studia i Monografie nr 417. Opole: Wydawnictwo Uniwersytetu Opolskiego; 2009.
- [5] Krzyśko-Łupicka T. Zesz Post Nauk Roln. 2011;567:127-138.
- [6] Krzyśko-Łupicka T, Robak M. Acta Sci Polon Biotechnol. 2011;10(4):29-38.
- [7] Difco manual. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, 48232 USA, tenth ed., 1984.

ESTIMATION OF FATTY SUBSTANCE BIODEGRADATION IN PRESENCE OF AUTOCHTHONOUS LIPOLYTIC *Penicillium citrinum* STRAIN

Department of Biotechnology and Molecular Biology, Opole University

Abstract: Fatty substances in the environment are cause to many ecological problems. The using of lipolytic autochthonous microflora is an effective method of utilization of this waste. Aim of this study was to evaluate the growth and lipolytic activity of *Penicillium citrinum* strain in the biodegradation process the fat from spent bleaching earth (SBE) in liquid cultures. Lipolytic activity of the tested strain evaluated based on the degree of degradation of fatty substances based on changes in fatty extract mass and of instrumental analysis. The biodegradation reached almost 100% after 28 days, which allows the use of *Penicillium citrinum* as an inoculum in the removal fatty substances directly from the environment.

Keywords: spent bleaching earth, *Penicillium citrinum*, lipolytic activity, biodegradation