

ACTA BOT. CROAT. VOL. 39, 79—84, 1980.

UDC 58  
CODEN: ABCRA2  
YU ISSN 0365—0586

UDC 582.282.163:54—38. = 862

UTJECAJ ANORGANSKIH SOLI NA RAST  
GLJIVE *MORCHELLA HORTENSIS*  
U SURUTKI

With Summary in English

ZDRAVKO DUVNJAK, IVKA ŠPINDERK I GAVRO TAMBURAŠEV

(Tehnološki fakultet, Zagreb)

Primitjeno 16 07 1979

## Uvod

S obzirom na vrlo brz prirast stanovništva, u svijetu se osjeća manjak proteina za prehranu, te se pored klasičnih proučavaju i njihovi novi izvori među koje spadaju i mikroorganizmi (D a b b a h 1970, K i h l b e r g 1972).

Radi proučavanja mikroorganizama kao izvora proteina za prehranu određena pažnja se poklanja i višim gljivama, to više što se njihove mnoge vrste rabe u prehrani (L i t c h f i e l d et al. 1963). Više gljive se kultiviraju na kompostima (S i n g e r 1961), međutim radi se i na dobivanju njihove micelijske mase submerznim načinom kultiviranja (H u m f e l d i S u g i h a r a 1949). U submerznom kultiviranju micelija viših gljiva mogu se upotrijebiti razni otpaci za pripremu hranjivih podloga (R e u s s e r et al. 1958, L e D u y et al. 1974, L i t c h f i e l d 1967). S obzirom na to da je i surutka otpadak u proizvodnji sira i da sadržava izvore ugljika, dušika, fosfora, sumpora, vitamina i mineralnih tvari (P r o k o v s k i j 1976), može se uzimati kao kompletna podloga ili kao njezin sastavni dio za kultiviranje micelija viših gljiva.

Ponekad, kao u slučaju kultiviranja gljive *Morchella hortensis*, potrebno je surutku razrijediti s vodom da bi mogla poslužiti kao kompletna podloga za rast (D u v n j a k et al. 1978).

U ovom radu se razmatra mogućnost korištenja nerazrijeđene surutke, ali uz dodatak nekih anorganskih soli, kao podloge za submerzno kultiviranje gljive *Morchella hortensis*.

## Materijal i metode

Proizvodni organizam bio je viša gljiva *Morchella hortensis*. Održavana je na čvrstoj podlozi koja se sastoji od: glukoze (20 g), krumpirove infuzije napravljene od 300 g krumpira u litri vode i agara (20 g). Ista podloga, ali bez dodatka agara upotrijebljena je za pripremu vegetativnog inokuluma.

Kao podloga za submerzno kultiviranje ove gljive služila je surutka u koju je pojedinačno i u raznim koncentracijama dodavan amonijev klorid, amonijev nitrat i amonijev sulfat. Početni pH podloge podešen je na vrijednost 5,5 i 6,5.

Surutka koja je korištena za pripravljanje hranjive podloge za kultiviranje proizvodnog organizma poticala je iz različitih šarži iz proizvodnje svježeg sira. Imajući to na umu jasno je da je njen sastav varirao od šarže do šarže, ali i pored toga utvrđeno je da najčešće sadržava laktoze od 40 do 45 mg/ml, fosfata od 2,0 do 2,8 mg/ml i ukupnog dušika od 1,0 do 2,0 mg/ml. pH je varirao od 4,0 do 4,3.

Podloge su sterilizirane 25 min. na 110°C.

Za inokuliranje 100 ml ispitivane podloge korišteno je 5 ml inokuluma homogeniziranog u mikseru Warring blender pri 12000 o/m u toku 60 sekundi. Inokulum je kultiviran pod istim uvjetima kao i proizvodni mikroorganizam u surutki.

Kultiviranje proizvodnog mikroorganizma u surutki provedeno je submerznim postupkom u Erlenmayer tikvicama od 500 ml sa po 100 ml podloge. Temperatura kultiviranja bila je 24°C.

Miješanje je omogućeno tresenjem na rotacionoj tresilici sa 180 o/min. s ekscentrom od 5 cm. Kultiviranje je trajalo 5 dana.

Nakon kultiviranja izrasla micelijska masa je filtracijom odijeljena od istrošene podloge, zatim isprana vodom te sušena u sušioniku na temperaturi od 80°C. Dobivena biomasa je izražena u gramima suhe tvari na 100 ml hranjive podloge.

## Rezultati i diskusija

Za razliku od gljive *Agaricus campestris*, nađeno je da *Morchella hortensis* ne može rasti u nerazrijeđenoj surutki. Tek ako se kao podloga upotrijebi 80% surutke i 20% vode, onda *M. hortensis* raste i u 100 ml takve podloge dobije se 0,91 g suhe micelijske mase (D u v n j a k et al., 1978).

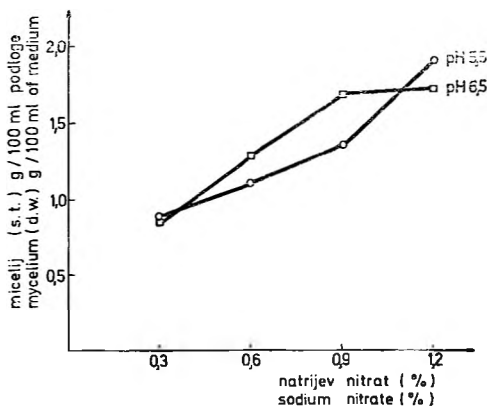
Međutim, *M. hortensis* može rasti i u nerazrijeđenoj surutki ako se u nju dodaju neke anorganske soli.

Na slici 1. prikazani su rezultati dobiveni submerznim kultiviranjem *M. hortensis* u nerazrijeđenoj surutki u koju je dodan natrijev nitrat u koncentraciji od 0,3 do 1,2% odnosno u mM<sub>N<sub>2</sub></sub> 17,15 do 68,60.

Kultiviranjem ove gljive na početnoj pH vrijednosti podloge 5,5, povećanje koncentracije natrijevog nitrata uzrokuje i porast prinosa micelijske mase.

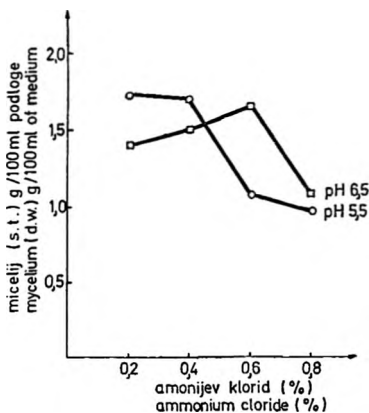
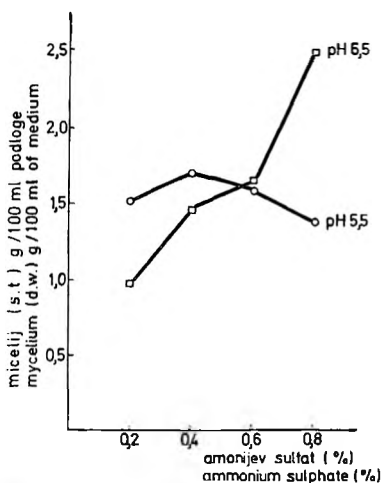
Pri koncentraciji natrijevog nitrata 1,2% u nerazrijeđenoj surutki dobiveno je 1,9 g suhe tvari biomase, što je maksimalni prinos u ovoj seriji pokusa.

Ako se kultivira ova gljiva kod početne pH vrijednosti 6,5, dodatkom 0,3% natrijevog nitrata u nerazrijeđenu surutku, dobiva se 0,85 g suhe micelijske mase što se podudara sa rezultatom dobivenim pod istim uvjetima ali pri početnom pH podloge 5,5.



Sl. 1. Utjecaj natrijevog nitrata na rast micelija *M. hortensis* u nerazrijeđenoj surutki

Fig. 1. Influence of sodium nitrate on mycelium growth of *M. hortensis* in undiluted whey.



Sl. 2. Utjecaj amonijeveg sulfata na rast micelija *M. hortensis* u nerazrijeđenoj surutki

Fig. 2. Influence of ammonium sulphate on mycelium growth of *M. hortensis* in undiluted whey.

Sl. 3. Utjecaj amonijeveg klorida na rast micelija *M. hortensis* u nerazrijeđenoj surutki

Fig. 3. Influence of ammonium chloride on mycelium growth of *M. hortensis* in undiluted whey.

Povećanjem koncentracije natrijevog nitrata linearno se povećava i količina biomase, te se pri 0,9% ove soli u podlozi dobije 1,7 g suhog micelija. Dalje povećanje koncentracije natrijevog nitrata na 1,2% pri početnom pH podloge 6,5, ne uzrokuje promjenu u prirodu biomase u odnosu na njezinu količinu dobivenu sa 0,9% natrijevog nitrata.

Ako se u nerazrijeđenu surutku doda amonijev sulfat u koncentraciji od 0,2 do 0,8%, što u  $mMN_2$  iznosi: 13,15 do 52,60, onda pri početnom pH podloge 5,5 porastom koncentracije ove soli do 0,4% raste i količina biomase, te se dobije 1,7 g u 100 ml takve podloge, što je vidljivo na slici 2.

Povećanje koncentracije amonijevog sulfata iznad te vrijednosti izaziva inhibiciju rasta ovog mikroorganizma. Prirod biomase u surutki sa 0,8% amonijevog sulfata za 20% niži je od onog koji je dobiven u surutki sa 0,4% ove soli.

Kad je početna pH vrijednost surutke bila 6,5 i kad je koncentracija amonijevog sulfata u njoj povećana sve do 0,8% iznad 0,4% te soli, nije primijećena inhibicija rasta ovog mikroorganizma, kao što je to bio slučaj kod početnog pH 5,5. U ovom slučaju je porastom koncentracije te soli gotovo linearno rasla i količina biomase, tako da se u surutki, kojoj je dodano 0,8% amonijevog sulfata, dobilo 2,5 g suhe tvari biomase u 100 ml takve podloge.

Na slici 3. prikazani su rezultati koji pokazuju utjecaj amonijevog klorida na rast micelija gljive *M. hortensis* u nerazrijeđenoj surutki.

Kod početnog pH 5,5 sa 0,2 i 0,4% odnosno  $mMN_2$  sa 18,17 i 37,4% amonijevog klorida dobije se 1,7 g suhe biomase u 100 ml surutke. Više koncentracije od 0,4% te soli izazivaju znatnu inhibiciju rasta proizvodnog mikroorganizma. Sa 0,6% inhibicija rasta iznosi 38% u odnosu na rast u surutki sa 0,4% amonijevog klorida.

Dodatkom iste soli u nerazrijeđenu surutku ali kod početnog pH podloge 6,5 maksimalni prirod odgovara najvišem koji je postignut kod pH 5,5, ali u ovom slučaju sa 0,6% amonijevog klorida. Sa 0,8% ove soli u surutki kod pH 6,5 primijećena je inhibicija rasta kao i kod pH 5,5.

S obzirom na to da *M. hortensis* raste u razrijeđenoj surutki, može se pretpostaviti da u takvom mediju taj mikroorganizam ima sve potrebne elemente za svoj rast. Međutim, nemogućnost rasta *M. hortensis* u nerazrijeđenoj surutki upozorava na to da ona sadržava neku komponentu koja sprečava rast te gljive, te se razrjeđivanjem surutke snizuje koncentracija inhibitora i time omogućuje rast *M. hortensis*.

Budući da ova gljiva raste u nerazrijeđenoj surutki uz prisutnost navedenih anorganskih soli, može se pretpostaviti da ti spojevi zbog različitih molarnih koncentracija pokazuju razlike u prirastu biomase *M. hortensis*. Te razlike mogu biti uzrokovane i u specifičnim utjecajima na transport kroz staničnu stijenku. Izraziti utjecaj pH na prinose biomase također govori u prilog razlika u transportu pojedinih iona.

Uzimajući u obzir da je u razrijeđenoj surutki postignut prirod od 1,1 g suhe biomase proračunato na 100 ml nerazrijeđene surutke (D u v n j a k et. al., 1978), a u nekim pokusima iz ovog rada čak i 2,5 g biomase, sigurno je da navedene soli imaju funkciju dodatnih izvora dušika.

## Z a k l j u č a k

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da *Morchella hortensis* može rasti i u nerazrijeđenoj surutki ako se u nju dodaju određene količine natrijevog nitrata, amonijevog klorida ili amonijevog sulfata. Relativno

niske koncentracije od samo 0,2 do 0,3% ovih spojeva omogućavaju prilično dobar rast micelija.

S obzirom na to da ovaj mikroorganizam može rasti u razrijeđenoj surutki bez dodatka, a ne može rasti u nerazrijeđenoj, znači da navedene anorganske soli djeluju specifično na rast *M. hortensis*.

Kako je prirod micelijske mase, računano na istu količinu surutke pri korištenju nerazrijeđene surutke uz dodatak tih soli, do 2,5 puta veći nego samo u razrijeđenoj surutki, znači da ti spojevi u ovom slučaju služe i kao dodatni izvori dušika.

Utjecaj početnog pH podloge naročito je došao do izražaja dodatkom amonijevog sulfata u surutku.

Prirod od 2,5 g suhe micelijske mase je najviši od svih dobivenih u ovom radu i postignut je u 100 ml surutke sa 0,8% amonijevog sulfata.

#### Literatura

- Dabbah, R., 1970: Protein from Microorganisms. Food technol. 6, 35—42.
- Duvnjak, Z., M. Erić, G. Tamburašev, 1978: Studij rasta viših gljiva *Agaricus campestris* i *Morchella hortensis* u submerznoj kulturi pri upotrebi surutke kao hranjive podloge. Mljekarstvo 2, 38—42.
- Humfeld, H., T. F. Sugihara, 1949: Mushroom Mycelium Production by Submerged Propagation. Food Technol., 3, 355—356.
- Kihlberg, R., 1972: The Microbe as a Source of Food; in Annual Review of Microbiology 26, 427—466.
- Le Duy, A., N. Kosarić, J. E. Zajic, 1974: Morel Mushroom Mycelium Growth in Waste Sulfite Liquors as Source of Protein and Flavouring. J. Inst. Can Sci. Technol. Aliment., 7, 44—50.
- Litchfield, J. H., 1967: Morel Mushroom Mycelium as a Food Flavouring Material. Biotechnol. and Bioeng. 9, 289—304.
- Litchfield, J. H., V. G. Vely, R. C. Overbeck, 1963: Nutrient Content of Morel Mushroom Mycelium. Amino Acid Composition of the Protein. J. Food Sci. 28, 741—743.
- Prokovskij, A. A. 1976: Himičeskij sastav piščevih produktov, Piščevaja promišlenost, Moskva
- Reusser, F., J. F. Spencer, H. R. Salans, 1958: Protein and Fat Content of some Mushrooms grown in Submerged Culture. Appl. Microb. 6, 1—4.
- Singer, R. Mushrooms and Truffles, Leonard Hill (Books) Ltd., 1961.

#### SUMMARY

##### EFFECT OF INORGANIC SALTS ON THE GROWTH OF THE MUSHROOM *MORCHELLA HORTENSIS*

Zdravko Duvnjak, Ivka Špinderk i Gavro Tamburašev

(Faculty of Technology, Zagreb)

It was found that *M. hortensis* could not grow in undiluted whey but it could in the whey diluted with water (Duvnjak et al. 1978).

From the results obtained in this work it can be seen that this organism can grow in undiluted whey when sodium nitrate, ammonium chloride or ammonium sulphate are added.

Relatively very low concentrations (0.2 — 0.3%) of those compounds in undiluted whey result in good yield of the mycelium.

The fact that the microorganism grows in diluted whey without any additions but cannot grow in undiluted whey means that inorganic salts act on the membrane transport in *M. hortensis* in undiluted whey.

Since the yield of the mycelial biomass, for the same quantity of whey is 2.5 times greater in undiluted whey with addition of those compounds than in diluted whey, it can be concluded that the salts are used by the microorganism as complementary sources of nitrogen.

The influence of the initial pH of the medium is especially strong with the addition of ammonium sulphate in undiluted whey.

The greatest yield of 2.5 g of dry mycelium was reached in 100 ml of undiluted whey with 0.8% of ammonium sulphate.

*Prof. dr Zdravko Duvnjak*  
*Ivka Spinderk, dipl. ing.*  
*Prof. dr Gavro Tamburašev*  
Tehnološki fakultet, Zagreb  
Pierottijeva 6/IV  
YU-41000 Zagreb (Jugoslavija)