

ZASTOSOWANIE IGLIWIĄ SOSNY (*PINUS SILVESTRIS* L.) JAKO SUROWCA DO BIOSYNTETY ENZYMÓW CELULOLITYCZNYCH PRZEZ GRZYB *ARMILLARIELLA MELLEÀ* (VAHL ex FR.) KARST.

Krystyna J. Chrapkowska

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Igliwie sosny (*Pinus silvestris* L.) po oddestylowaniu olejków eterycznych i igliwie sosny po oddestylowaniu olejków eterycznych wzbogacone 3% mocznika zastosowano jako składniki podłoża dwóch wariantów hodowli różnych szczepów grzyba *Armillariella mellea* (Vahl ex Fr.) Karst. I wariant hodowli okazał się korzystny dla dobrej biosyntezy aktywnych kompleksów celulaz, natomiast II wariant wpływa korzystniej na wzrost biomasy grzybni i przyrost zawartości azotu ogólnego.

GENEZA I CEL PRACY

Praca jest kontynuacją cyklu badawczego prowadzonego od szeregu lat w Instytucie Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, nad wykorzystaniem patogennych zdolności biosyntezy aktywnych kompleksów celulaz przez różne szczepy grzyba *Armillariella mellea*, a także i innych grzybów.

Wykonano wiele prac [2, 5, 6, 8 i inne], które dostarczyły cennych informacji o metodach otrzymywania i charakterystyce wysokoaktywnych kompleksów celulaz. W niektórych pracach [3, 4, 7], przeprowadzono próby technologicznego zastosowania i wykorzystania kompleksów celulaz do hydrolizy celulozy zawartej w różnych ubocznych surowcach bogatych w tę substancję. Dzięki tym zabiegom uzyskiwano duże ubytki celulozy z równoczesnym przyrostem cukrów przyswajalnych. Z niektórych surowców takich jak otręby zbożowe, po zastosowaniu zabiegów enzymatycznych uzyskiwano prawie całkowite wydobycie cennych biologicznie białek, zamkniętych w komórkach warstwy aleuranowej, otoczonych grubymi błonami celulozowymi.

Większość mikroorganizmów, a w szczególności grzyby, wykazują właściwości biosyntezy aktywnych kompleksów celulaz, jeżeli podczas hodowli w pożywce znajduje się odpowiedni substrat celulozowy działający jako induktor. Otrzymane tym sposobem kompleksy celulaz wykazują w następstwie wysoką aktywność w hydrolizowaniu celulozy zawartej w surowcu, który był dodany jako składnik pożywki do hodowli mikroorganizmów.

Tę zależność potwierdziły wyniki wielu badań [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8].

Po przebadaniu w cytowanych pracach i wykorzystywaniu wielu surowców bogatych w celulozę, zainteresowano się igliwem sosny jako naturalnym składnikiem pożywki, bogatym w celulozę oraz substancje odżywcze i biologicznie czynne.

Bogate właściwości igliwia sosny w substancje odżywcze i biologicznie czynne wykazali w swoich pracach Grochowski [11], Kalniņš i Ievinš [12], Nikitin [18], Sołodkij [24], Żurkowski [26] i inni.

Za dodatkiem igliwia sosny jako składnika pożywki przemawia również to, że sosna obok świerku jest naturalnym siedliskiem bytowania tego grzyba, co ma wpływ na zachowanie jego cech genetycznych, nad czym prowadzili badania Mańka [15, 16 i 17] oraz Rykowski [23].

W związku z tym celem pracy było zastosowanie igliwia sosny jako surowca-induktora do hodowli wgłębnej różnych szczepów grzyba *Armillariella mellea* i otrzymywania wysokoaktywnych kompleksów celulaz.

Dla osiągnięcia podjętego celu, zadaniami pracy było:

– założenie dwóch wariantów hodowli doświadczalnych, różnych szczepów grzyba *Armillariella mellea*. I wariant hodowli z dodatkiem 5% igliwia sosny po oddestylowaniu olejków eterycznych i II wariant hodowli z dodatkiem 5% igliwia sosny po oddestylowaniu olejków eterycznych wzbogacanego 3% mocznika (NH_2CONH_2).

– otrzymanie i charakterystyka celulolitycznej aktywności płynów pohodowlanych różnych szczepów grzyba *Armillariella mellea* przy zastosowaniu substratu modelowego karboksymetylo-celulozy (KMC-Na) oraz celulozy wyizolowanej z igliwia sosny po oddestylowaniu olejków eterycznych jako specyficznego substratu,

– analiza zmian zachodzących w składnikach chemicznych podczas hodowli różnych szczepów badanego grzyba obydwu wariantów podłoży hodowlanych.

Uzyskane wyniki w tej pracy posłużą między innymi za informacje czy celowe będzie prowadzenie dalszych badań nad wykorzystaniem igliwia jako głównego składnika podłoży stałych hodowli grzyba *Armillariella mellea* dla otrzymywania wysokobiałkowych biomas. Tego rodzaju biomasy przerośnięte strzępkami grzybni mogą być wykorzystane jako składniki mieszanek paszowych.

SUROWCE I MATERIAŁY

Surowcem do badań było igliwie sosny zwyczajnej (*Pinus silvestris* L.) po oddestylowaniu olejków eterycznych. Igliwie było w postaci brykietów o wymiarach: średnica 45 mm i grubości 10 mm. Wzbogacenie igliwia w mocznik przeprowadzono według metody podanej przez Żurkowskiego i Chrapkowską [27]. Igliwie otrzymano z Instytutu Chemicznej Technologii Drewna Akademii Rolniczej w Poznaniu. Pozyskane było na zrębach zupełnych w Lasach Doświadczalnych Akademii Rolniczej w Poznaniu w Nadleśnictwie Zielonka.

Materiałem badanym były trzy szczepy grzyba *Armillariella mellea*. Szczepy grzyba otrzymano z Instytutu Ochrony Lasu Zespołu Naukowo-Dydaktycznego Fitopatologii Leśnej Akademii Rolniczej w Poznaniu.

Odczynniki używane w pracy pochodziły: adenozyina – z firmy Reanal Buda-

peszt; adenina — Ciech Lublin; tiamina — Merk Darmstadt; tryptofan — Koch-Light Laboratories Ltd; albumin bovine cryst. pure — Windsor-Berksire-England, International Enzymes Limited oraz Karboksymetyloceluloza (KMC-Na) firmy Koch-Light Laboratories Ltd, ze stopniem podstawienia (DS) — 0,8.

Pozostałe odczynniki chemiczne pochodziły z Przedsiębiorstwa Przemysłowo-Handlowego „Polskie Odczynniki Chemiczne” Gliwice.

METODY BADAŃ

Suchą masę oznaczano metodą suszenia, azot ogólny metodą Kjeldahla, określenie ubytku celulozy oraz izolowanie celulozy wykonano metodą Scharrera-Kürschnera według Prosińskiego [19], cukry redukujące jako glukoza metodą Somogyi-Nelsona [25]. Hydrolizę dwucukrów przeprowadzono przez dodanie kwasu solnego w takiej proporcji do próbek, aby jego stężenie wynosiło 1,85%, w czasie 5 minut oraz temperaturze 68 - 70°C i następnie zobojętniając 30% NaOH wobec oranżu metylowego, według metody Bertranda podanej przez Biełozierskiego i Proskuriakowa [1]. Muzealne szczepy grzybów oraz ich inokulaty prowadzono na pożywce agarowo śliwkowej według Mańki [16] z dodatkiem 1% trocin sosnowych, a inokulaty z dodatkiem 5% zmielonego igliwia po oddestylowaniu olejków eterycznych. Hodowlę prowadzono w temperaturze 23°C i odświeżano przez przeszczepianie co 21 dni. Hodowlę doświadczalną grzybów prowadzono metodą wgłębną na zmodyfikowanej pożywce o ustalonym składzie według badań Mandels i Reese [14] oraz Rautela i Cowlinga [20], w warunkach hodowli podanych przez Chrapkowską i wsp. [8] z dodatkiem w I — wariacie 5% zmielonego igliwia sosny po oddestylowaniu olejków eterycznych i w II — wariacie z dodatkiem 5% igliwia po oddestylowaniu olejków eterycznych wzbogaconego 3% mocznika. Obydwie hodowle prowadzono na wytrząsarce typu Universal Shaker 327 przy amplitudzie 3 i częstotliwości drgań 50/min, w ciągu 7 dni, w temperaturze 30°C. Płyny pohodowlane po rozdrobnieniu grzybni oddzielano przez wirowanie i przechowywano w lodówce. Aktywność celulolityczną płynów pohodowlanych oznaczano następująco:

- aktywność (E. C. No. 3.2.1.4) glukanohydrolazy β -1,4 glukanu:
- endo-1,4- β glukazy (endokarboksymetylocelulazy) metodą wiskozymetryczną, stosując jako substrat 1% roztwór soli sodowej karboksymetylocelulozy (KMC-Na). Pomiary zmiany obniżenia lepkości, wykonywano na wiskozymetrze Ostwalda przy użyciu metody Reese i wsp. [21] oraz Consultation Report S.E.V. [9],
- egzo-1,4- β glukazy (egzokarboksymetylocelulazy) metodą redukcyjną opartą na badaniach Reese i wsp. [22], stosując jako substrat 0,5% roztwór soli sodowej karboksymetylocelulozy (KMC-Na),
- specyficzną aktywność właściwą (egzo-1,4- β glukaz) z zastosowaniem jako specyficznego substratu, celulozy wyizolowanej z igliwia sosny po ekstrakcji olejków eterycznych oznaczono metodą Chrapkowskiej [2] i wyrażano w mg glukozy/g białka oznaczonego metodą Lowry i wsp. [13].

WYNIKI I Dyskusja

HODOWLA DOŚWIADCZALNA

W każdym z dwóch przeprowadzonych wariantów hodowli różnych szczepów badanego grzyba, wzrost i rozwój grzybni przebiegał odmiennie. W I wariacie po około 2-3 dniach hodowli, wytworzyły się ryzomorfy, w kształcie kuleczek o średnicy do 3 mm. Po 7 dniach hodowli kuleczki zaczęły się rozpadać na mniejsze.

Natomiast w II wariacie hodowli również w tym samym czasie wytworzyły się kuleczki ryzomorf, ale o dużo większych średnicach, dochodzących do 1,5 cm a w przypadku szczepu ZO-11 nawet do 2,5 cm. Po 7 dniach hodowli II wariantu powstałe kuleczki również zaczęły się rozpadać na mniejsze o średnicy 2-3 mm a po 2 następnym dniach rozpadły się całkowicie.

Obydwa warianty hodowli przerwano po 14 dniach, ponieważ jak podaje Fiedorov i Badjaj [10], w tym okresie pojawia się wzmożona celulolityczna aktywność tego grzyba.

W otrzymanych płynach pohodowlanych, z obydwu wariantów hodowli, oznaczono zespół aktywności kompleksów enzymów celulolitycznych (tab. 1 i 2). Oznaczona aktywność E. C. No. 3.2.1.4. glukanohydralazy β -1,4 glukanu wykazała, że płyny pohodowlane wszystkich badanych szczepów grzyba w obydwu wariantach hodowli w większości przypadków wykazują wysoką aktywność, zarówno endo-, jak i egzo-1,4- β glukanaz (tab. 1). Jednakże wyższe aktywności obydwu badanych enzymów uzyskano w przypadku I wariantu hodowli, bowiem uzyskiwano prawie dwukrotnie wyższe wartości aktywności endo- i egzo-1,4- β glukanaz.

Niektóre z badanych szczepów wyróżniły się szczególnie wysokim stopniem aktywności. Na przykład szczep Aśw.-26 (tab. 1) w przypadku obydwu wariantów hodowli; charakteryzował się najwyższą aktywnością zarówno endo- jak i egzo-1,4- β glukanaz. Jest to nieczęsto obserwowane zjawisko. Zwykle szczepy grzybów charakteryzujące się wysoką aktywnością jednego z wymienionych enzymów wykazują niską aktywność drugiego enzymu [3, 4, 5, 6, 8 i inni]. Szczepem równie wysokoaktywnym w wytwarzaniu endo-1,4- β glukanaz, był szczep ZO-11. Natomiast szczep 1 wyróżnił się tylko stosunkowo wysoką aktywnością egzo-1,4- β glukanazy i to w przypadku I wariantu hodowli.

Określona celulolityczna specyficzna aktywność właściwa (egzo-1,4- β glukanaz), w obydwu wariantach hodowli (tab. 2) wykazała, że najwyższe aktywności uzyskano dla szczepu Aśw.-26 w I wariacie hodowli. Również w I wariacie hodowli wysoce aktywnym był szczep 1 i to zarówno przed hydrolizą, jak i po hydrolizie dwucukrów 1,85% HCl. Natomiast szczep ZO-11 wykazał najniższe celulolityczne specyficzne aktywności właściwe. Określona specyficzna aktywność właściwa celulaz w płynach pohodowlanych wszystkich trzech badanych szczepów (tab. 2), wykazała o około 50% wyższe wartości aktywności dla I wariantu hodowli, w porównaniu z wynikami II wariantu hodowli.

W tabeli 3 przedstawiono zmiany zachodzące w niektórych składnikach chemicznych podczas hodowli różnych szczepów badanego grzyba w obydwóch wariantach hodowli.

Tabela 1
 Charakterystyka aktywności E. C. No. 3.2.1.4. glukanohydrolazy β -1,4 glukanu plynów pochodzających otrzymanych z dwóch wariantów hodowli różnych szczepów grzyba *Armillariella mellea* (Vahl ex Fr.) Karst.

Characteristics of the activity of E. C. No. 3.2.1.4. of the glucanohydrolases of β -1,4-glucane fluids obtained from two variants of submerged cultures of different strains of *Armillariella mellea* (Vahl ex Fr.) Karst.

Szczep grzyba Fungus strain	Białko metodą Lowry w mg/ml płynu pochodzającego Lowry method protein mg/ml in post culture fluid	Oznaczono metodami		egzo-1, 4- β glukanaza – metodą redukcyjną stosując jako substrat 0,5% KMC-Na		
		endo-1, 4- β glukanaza – metodą wiskozymetryczną stosując jako substrat 1% roztwór KMC-Na	Method of determination			
		endo-1, 4- β glukanaza – with viscosimetric method using 1% solution of KMC-Na as a substrate	exo-1, 4- β glukanaza – with the reduction method using 0,5% KMC-Na as a substrate	uzyskana glukoza w mg/g białka Obtained glucose in 1 mg/g of protein		
		J. aktywności* Unit of activity	KMC-Na w g upłynniona w 25% przez 1 g białka KMC-Na fluidized in 25% by 1 g of protein	J. aktywności** Unit of activity		
I wariant z dodatkiem 5% igliwia sosny po oddestylowaniu olejków eterycznych I variant with addition of 5% pine needles after distilling of volatile oils						
I						
ZO-11	2,71	0,0000350	28 571	4286	0,1232	8 116
AŚw-26	1,88	0,0000193	51 813	7772	0,1662	6 017
	1,99	0,0000187	53 476	8021	0,0918	10 893
II wariant z dodatkiem 5% igliwia sosny po oddestylowaniu olejków eterycznych wzbogaconego 3% mocznika II variant with addition of 5% pine needles after distilling of volatile oils and enriched with 3% urea						
I						
ZO-11	3,44	0,0000509	19 646	2946	0,2465	4 065
AŚw-26	2,95	0,0000214	46 728	7009	0,2899	3 450
	3,31	0,0000207	48 309	7246	0,1720	5 813

* J – za jednostkę aktywności endo-1, 4- β glukanazy (endo KMC-azy) przyjęto taką ilość białka w mg, która upłynnia 0,15 g KMC-Na w 25% w czasie 20 minut i temperaturze 30°C i pH 4,7. J – as a unit of activity of endo-1,4- β glucanase (endo-KMC-ase), such amount of protein (mg) was accepted which is fluidizing 0.15 g of KMC-Na in 25% after 20 min., time at 30°C temperature and 4.7 pH.

** J – za jednostkę aktywności egzo-1, 4- β glukanazy (egzo KMC-azy) przyjęto taką ilość białka w mg, która wytwarza 1 mg glukozy w czasie 2 godzin w temperaturze 37°C i pH 4,7. J – as a unit of the activity of exo-1,4- β of glucanase (exo KMC-ase), such amount of protein (mg) was accepted which produces 1 mg of glucose in 2 hr. time at 37° temperature and 4.7 pH.

Tabela 2

Charakterystyka celulołitycznej specyficznej aktywności właściwej (egzo-1,4- β glukanaż) w płynach pochodowlanych otrzymanych z dwóch wariantów hodowli różnych szczepów grzyba *Armillariella mellea* (Vahl ex Fr.) Karst.

Characteristics of cellulolytic specific activity (exo-1,4- β glucanases) in post culture fluids obtained from two variant submerged cultures of different strains of *Armillariella mellea* (Vahl ex Fr.) Karst.

Szczep grzyba Strain of fungus	J. aktywności* Unit of activity		Jednostki w ml płynu pochodowlanego Units of after culture fluids (ml)		Glukoza w mg/g białka Glucose in mg/g of protein	
	przed hydrolizą before of hydrolysis	po hydrolizie 1,85% HCl after hydrolysis with 1,85% of HCl	przed hydrolizą before of hydrolysis	po hydrolizie 1,85% HCl after hydrolysis with 1,85% HCl	przed hydrolizą before of hydrolysis	po hydrolizie 1,85% HCl after hydrolysis with 1,85% of HCl
I ZO-11 Aśw-26	0,0211	0,0186	0,9447	1,0712	47 235	53 560
	0,0258	0,0222	0,7741	0,9005	38 707	45 027
	0,0194	0,0178	1,0321	1,1254	51 506	56 370
II ZO-11 Aśw-26	II wariant z dodatkiem 5% igłwia sosny po oddestylowaniu olejków eterycznych i wzbogaconego 3% mocznika II variant with addition of 5% pine needles after distilling of volatile oils enriched with 3% urea.					
	0,0254	0,0225	0,7863	0,8885	39 335	44 447
	0,0289	0,0230	0,6893	0,8680	34 484	43 425
	0,0244	0,0217	0,8186	0,9197	40 392	45 986

* Za jednostkę celulołitycznej specyficznej aktywności właściwej (egzo-1, 4- β glukanaż) przyjęto taką ilość białka w mg, która wytwarza 1 mg glukozy ze specyficznego substratu (celuloz wyizolowanych z obydwóch rodzajów igłwia sosny) w czasie 36 godzin, temperaturze 40°C i pH 5.
As an unit of cellulolytic specific activity (exo-1,4- β glucanases), such amount of protein (mg) was accepted which produce 1 mg of glucose from specific substrate (cellulose) isolated from both kinds of pine needles in 36 hr time at 40°C temperature and 5 pH.

Analizując otrzymane wyniki (tab. 3), należy stwierdzić bardzo wysoki przyrost zawartości azotu ogólnego w II wariacie hodowli, to jest z dodatkiem 5% igliwia, wzbogaconego 3% mocznika. Równocześnie w przypadku tego wariantu hodowli (tab. 1) stwierdzono najwyższe zawartości białek oznaczonych metodą Lowry. Jednakże białka te (jak podają wyniki w tab. 1 i 2) wykazywały w zdecydowanej większości przypadków bez porównania niższe aktywności wszystkich bada-

Tabela 3

Zmiany zachodzące w niektórych składnikach chemicznych w 200 ml próbkach podłoży hodowlanych dwóch wariantów hodowli różnych szczepów grzyba *Armillariella mellea* (Vahl ex Fr.) Karst.

Changes occurring in some chemical components of 200 ml samples of two variants submerged cultures of different strains of *Armillariella mellea* (Vahl ex Fr.) Karst. fungus

Szczep grzyba	Sucha masa – ubytek w %	Azot ogólny przyrost w %	Celulozy – ubytek w %	Cukry redukujące jako glukoza, przyrost w %
Strain of fungus	Dry substance-loss in %	Generalnitrogen increase in %	Cellulose loss in %	Reduction sugars as glucose increase in %
I wariant z dodatkiem 5% igliwia sosny po oddestylowaniu olejków eterycznych				
I variant with addition of 5% pine needles after distilling of volatile oils				
1	26,35	18,58	37,87	20,55
ZO – 11	17,77	17,10	30,89	6,91
Aśw. – 26	28,14	20,07	39,80	26,14
II wariant z dodatkiem 5% igliwia sosny po oddestylowaniu olejków eterycznych wzbogaconego 3% mocznika				
II variant with addition of 5% pine needles after distilling of volatile oils and enriched with 3% urea				
1	41,99	217,95	44,47	49,63
ZO – 11	46,77	224,58	51,48	7,22
Aśw. – 26	39,21	267,40	40,43	23,85

nych kompleksów enzymów celulolitycznych. Można stąd wnioskować, że chcąc otrzymać przyrost biomasy grzybni bogatej w związki azotowe, należy hodować grzyb na pożywce z dodatkiem igliwia wzbogaconego w mocznik. Natomiast w celu otrzymania aktywnych kompleksów celulaz, odpowiedniejszy jest dodatek igliwia do hodowli grzyba nie wzbogacanego w mocznik. Analizując dalej wyniki w tabeli 3, należy stwierdzić, że w II wariacie hodowli szczepów grzyba *Armillariella mellea* w porównaniu z I wariantem ubytek celulozy był wyższy, wraz z równoczesnym wyższym przyrostem cukrów redukujących.

W wynikach tabeli 3 zwraca uwagę fakt najwyższego rozkładu celulozy przez kompleks enzymów szczepu ZO-11 (II wariant hodowli), przy równoczesnym bardzo niskim przyroście cukrów. Wynika z tego, że szczep ZO-11 hodowany w tych warunkach, wytwarza enzym upłynniający celulozę i mało aktywny kompleks enzymów scukrzających, co potwierdzają wyniki w tabeli 1.

Natomiast kompleks enzymów szczepu 1, również II wariant hodowli (tab. 3), spowodował wysoki rozkład celulozy z równoczesnym, najwyższym w tych badaniach przyrostem cukrów redukujących. Świadczy to o tym, że szczep ten wytwarza kompleks enzymów o najwyższej aktywności, hydrolizujących celulozę aż do cukrów prostych.

WNIOSKI

W rezultacie przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

1. W igliwiu sosny znajdują się substancje stymulujące biosyntezę celulaz oraz związków białkowych, gdyż w przypadku zastosowania igliwia jako induktora — głównego składnika dwóch wariantów hodowli wglębnych, różnych szczepów grzyba *Armillariella mellea*, stwierdzono wzmoczoną biosyntezę wysoce aktywnych kompleksów celulaz oraz obfity wzrost biomasy grzybni i przyrost zawartości azotu ogólnego.

2. Wszystkie szczepy grzyba *Armillariella mellea* są przydatne, zarówno do biosyntezy wysoce aktywnych kompleksów celulaz, w przypadku I wariantu hodowli, jak i otrzymywania biomasy grzybni i przyrost zawartości azotu ogólnego, w przypadku II wariantu hodowli.

3. Szczep Aśw-26 jest najbardziej efektywny spośród przebadanych szczepów, w obydwu wariantach hodowli, ze względu na najaktywniejsze wydzielanie kompleksów enzymów celulolitycznych.

4. W II wariacie hodowli stosowano dodatek mocznika, w który wzbogacono igliwie. Związek ten powodował wzrost biomasy grzybni oraz przyrost zawartości azotu ogólnego u wszystkich badanych szczepów grzybów.

Praca wpłynęła do Redakcji
w styczniu 1984 r.

LITERATURA

1. Biełozierski H., Proskuriakow N.: Ćwiczenia z biochemii roślin. WPRiL, Warszawa 1954. s. 40.
2. Chrapkowska K. J.: Scukrzanie naturalnych substratów celulozowych zbóż zabiegami fizyko-mechaniczno-chemicznymi oraz enzymatycznymi celulaz grzybowych. PTPN, Wyd. Nauk Roln. i Leśn. Pr. Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśn., 1977, t. XLIII, s. 13 - 19.
3. Chrapkowska K. J.: Application of Cellulases of the Fungus *Armillariella mellea* (Fr. ex. Wahl) P. Karsten for Isolation of Aleuronic Layer Rye Grain Bran. Bull Acad. Polon. Sci., Sér. Sci-Biol. 1979, t. 27, z. 10 s. 795 - 801.
4. Chrapkowska K. J.: Application of Cellulases of the Fungus *Armillariella mellea* (Fr. ex. Wahl) P. Karsten for the Isolation of Proteins from the Aleuronic Layer of Wheat Grain Bran. Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Sci. Biol. 1980, t. 28, No 4, s. 195 - 201.
5. Chrapkowska K. J.: Cellulolytic Activity of White, Brown and Gray Wood Rot Fungi. Acta Microbiol. Polon. 1984. v. 33, No 2 137 - 145.
6. Chrapkowska K. J.: Hydrolysis of the Purified Cellulose Fraction from Barley Bran with Cellulases of Various Strains of the Fungus *Armillariella mellea* (Fr. ex. Wahl) P. Karsten. Bull. Acad. Polon. Sci, Ser. Sci. Biol. 1984 v. 32, No. 3 - 4, p. 89 - 97.
7. Chrapkowska K. J., Gembicka D., Janicki J.: Effectiveness of Cellulases of *Armillariella mellea* (Fr. ex. Wahl) P. Karsten in Releasing Proteins from the Aleuronic Layer in Barley and Oats Bran. Acta Alimentaria Polonica. 1979, t. V (XXIX) No 3, p. 217 - 225.
8. Chrapkowska K. J., Janicki J., Kubzdela Z.: Rola magnezu i potasu w biosyntezie celulaz u grzybów, w warunkach hodowli wglębnej. PTPN, Wyd. Nauk Roln. i Leśn. Pr. Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśn. 1977, t. XLII, s. 21 - 28.
9. Consultation Report S. F. V.: Vremiennyje jedinyje metody opredelenija celluloliticzeskoj aktivnosti. Centr. Issledovat Inst. Pisc. Prom. V. N. R. Budapest 1966, 1 - 16.

10. Fjedorov N. I., Badjaj S. V.: Cellulolityczeskaja aktivnost opienka ossjennewo *Armillariella mellea* (Fr.) Karst. Příkladnaja Bioch. i Mikrob. 1973, t. IX, wyp. 3, s. 408 - 413.
11. Grochowski W.: Uboczna produkcja leśna. PWN Warszawa 1976, 259 - 286.
12. Kalninš A. J., Ievinš K. i inni: Suszka drewnianej zelieni i proizvodstwo witaminnoj muki i furfuroła iz otchodow lesozagotowok. Kompleksnaja miechanizacija rubok uchoda. Zinatnie, Riga 1975.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurment with the folinphenol reagent. Journ. Biol. Chem. 1951, t. 193, 265 - 275.
14. Mandels M., Reese E. T.: Induction of Cellulase in *Trichoderma viride* as Influenced by Carbon Sources and Metals. J. Bacterial. 1957, t. 73 (1), 269 - 278.
15. Mańka K.: Badania terenowe i laboratoryjne nad opieńką miodową — *Armillaria mellea* (Vahl) Quél., Prace IBL, Warszawa 1951, nr 94.
16. Mańka K.: Fitopatologia Leśna. PWRiL, Warszawa 1976, 98, 100, 269 - 279.
17. Mańka K.: Z badań nad opieńką miodową *Armillariella mellea* (Vahl) Karst. i jej występowaniem w drzewostanach świerkowych. Międzynarodowa konferencja w sprawie zwalczania chorób korzeni drzew leśnych powodowanych przez grzyby *Armillariella mellea* i *Formes annosus*. Poznań 1971, IX, 1 - 13.
18. Nikitin N. J.: Chimija drierwesiny i celjułozy. A. N. SSSR, Moskwa—Leningrad 1962.
19. Prosiński S.: Chemia drewna. PWRiL, Warszawa 1969, 142 - 274.
20. Rautel G. S., Cowling E. B.: Simple Cultural Test for Relative Colluloytic Activity of Fungi. Appl. Microb. 1966, t. 14 (6), 892 - 898.
21. Reese E. T., Levinson H. S.: A Comparative Study of the Breakdown of Cellulose by Micro-Organism. Physiol. Plantarum. 1952, t. 5, 345 - 366.
22. Reese F. T., Siu R. G. H., Levinson H. S.: The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives and its Realationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis. J. Bacteriol. 1950, t. 59, 485 - 497.
23. Rykowski K.: Obserwacja nad owocowaniem opieńki w kulturach czystych. Międzynarodowa konferencja w sprawie zwalczania chorób korzeni drzew leśnych powodowanych przez grzyby *Armillariella mellea* i *Fomes annosus*. Poznań 1971, IX, 1 - 14.
24. Sołodkij F. T.: Witaminy iz lesnego syria. Moskwa—Leningrad 1947.
25. Somogyi M.: Notes on Sugar-Determination. J. Biol. Chem., 1952, t. 1, 19 - 23; Nelson N.: A. Photomeric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *ibid.*, 1944, t. 153, 375 - 380.
26. Żurakowski M.: Badania nad możliwościami wzbogacania igliwia sosny i świerka jako produktów paszowych w substancje białkowe. Folia Forestalia Polonica, 1980; z. 13, B, s. 69-76.
27. Żurakowski M., Chrapkowska K. J.: Możliwości wzbogacania igliwia sosny (*Pinus silvestris* L.) w substancje azotowe przez zastosowanie mocznika i wysokiego ciśnienia. Folia Forestalia Polonica 1986, Seria B Z. 17, s. 61 - 66.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОСНОВОЙ ХВОИ *PINUS SILVESTRIS* L.
В КАЧЕСТВЕ СЫРЬЯ БИОСИНТЕЗА ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ
ФЕРМЕНТОВ ГРИБОМ *ARMILLARIELLA MELLEA* (VAHL ex FR.) KARST.

Резюме

Исследовано глубокое выращивание трех штаммов гриба *Armillariella mellea* (Vahl ex Fr.) Karst. на двух вариантах субстрата с добавкой сосновой хвои (*Pinus silvestris* L.) как натурального компонента богатого питательными и биологически активными веществами.

Первый вариант — с добавкой 5% хвои после отгонки эфирных масел, второй вариант — с добавкой 5% хвои после отгонки эфирных масел обогащенный 3% мочевины (NH_2CONH_2).

Оба варианта оказались полезными для получения активных комплексов целлюлолитических ферментов всех исследуемых штаммов грибов. Лучшие результаты были обнаружены на субстрате первого варианта, так получены почти в 2 раза высшие значения активности эндо и экзо-1,4- β глюкеназ, а также на около 50% высшие специфические удельные активности в сравнении со значениями второго варианта. Второй вариант оказался более эффективным для увеличения биомассы мицелия и прироста общего азота.

APPLICATION OF SCOTS PINE (*PINUS SILVESTRIS* L.) NEEDLES
AS A RAW-MATERIAL IN BIOSYNTHESIS OF CELLULOLYTIC ENZYMES USING
*ARMILLARIELLA MELLE*A (VAHL ex FR.) KARST. FUNGUS

Summary

Three strains of *Armillariella mellea* (Vahl ex Fr.) Karst. fungus were used in the preparation of submerged cultures on two variants of substrate with the addition of Scots Pine (*Pinus silvestris* L.) needles as a natural component rich in biologically active nutritive substances. The first variant was prepared with the addition of 5% needles from which volatile oils were distilled off while the second one, also without volatiles, containing 5% needles was enriched with 3% of urea (NH_2CONH_2).

Both these variants of substrates proved to be advantageous for obtaining complexes of cellulolytic enzymes from all three strains of investigated fungus. Better results were obtained using first variant of substrate because nearly double values of endo- and exo-1,4- β glucanases and about 50% higher specific activities were found in comparison with values characteristic for the second variant. On the other hand, the second variant was beneficial in the growth of mycelium biomass and increment of nitrogen content.

Adres autorki:

dr Krystyna J. Chrapkowska
Akademia Rolnicza w Poznaniu
Instytut Technologii Żywności
Pochodzenia Roślinnego
ul. Wojska Polskiego 31
60-624 Poznań