

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XIX, 39

SECTIO D

1964

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA, Stanisław BURZYŃSKI,
Zbigniew CZERNIAK

Wolne aminokwasy niektórych grzybów jadalnych

Свободные аминокислоты некоторых съедобных грибов

Free Amino Acids of some Edible Mushrooms

Wolne aminokwasy należą do związków występujących w organizmach żywych w bardzo małych ilościach. Oznaczenie ich stało się zasadniczo możliwe dopiero w ostatnich latach dzięki wprowadzeniu i udoskonaleniu metody chromatografii bibułowej. Dotychczas oznaczono skład wolnych aminokwasów przede wszystkim w grzybach niższych, jak *Phytophthora cactorum* i *Thamnidium elegans* (1) natomiast wyższe, za wyjątkiem niektórych (5), są pod względem chemicznym mało zbadane. Badania te mają jednak duże znaczenie ze względu na wartość spożywczą grzybów oraz na dość częste wypadki zatruc grzybami uważanymi dotychczas za jadalne. Jesienią 1952 roku na pograniczu województw poznańskiego i bydgoskiego zanotowano 100 zatruc zasłoniakiem rudym (*Cortinarius orellanus* Fries) (3, 4). Zidentyfikowanie więc substancji występujących w niektórych gatunkach grzybów może stać się pomocne w określeniu ich szkodliwości dla organizmu człowieka.

Wykrycie aminokwasów oraz metabolitów w ich przemianach ma również duży wpływ na zrozumienie, w jaki sposób powstają związki, o których metabolizmie w organizmie ludzkim wiemy jeszcze bardzo mało. Badając wolne aminokwasy w czernidłaku kołpakowatym (*Coprinus comatus* FR) P. H. List wykrył związek pośredni w przemianie ergotioneiny — hercyninę (Hercynin). Dzięki temu mógł ustalić, że ergotioneina powstaje z histydyny przez biologiczne metylowanie oraz podstawienie do wytworzonej w ten sposób hercyniny grupy sulfhydrylowej (7).

Głównym zadaniem naszej pracy jest chromatograficzne wykrycie wolnych aminokwasów, znajdujących się w czterech gatunkach grzybów jadalnych — w trzech z rodziny grzybowatych (*Boletaceae*) i w jednym z rodziny mleczajowatych (*Lactariaceae*) (2, 8, 10). Praca ta jest zarazem wstępem do dalszych badań jakościowych i ilościowych nad aminokwasami związanymi, węglowodanami, pierwiastkami masowymi i śladowymi.

MATERIAŁ I METODY

Stosowano wzorce aminokwasów wg spisu podanego w pracy Krzeczowskiej i współpracowników (6), sporządzając z nich sztuczne mieszaniny.

Materiał biologiczny: Rodzina *Boletaceae* — grzybowate: Grzyb prawdziwy — *Boletus edulis* Bull, Grzyb koźlarz — *Boletus scarber* Bull, Grzyb maślak — *Boletus luteus* (L) Fr i Rodzina *Lactariaceae* — mleczajowate: Mleczaj rydz — *Lactarius deliciosus* (L) Fr.

Materiał do badań zbierany przy końcu lata i na jesieni 1962 r. pochodził z lasów województwa lubelskiego. Przy wykrywaniu aminokwasów zastosowano dwie metody chromatograficzne: technikę wstępującą wg Williamsa i Kirby (12) oraz technikę krążkową wg Przybylskiej, Kociałkowskiego i Wiewiórowskiego (8, 11). Plan pracy obejmował: przygotowanie eluatów z grzybów, nakroplenie ich na bibułę, rozwijanie, wywołanie i odczytanie chromatogramów, ustalenie i omówienie wyników.

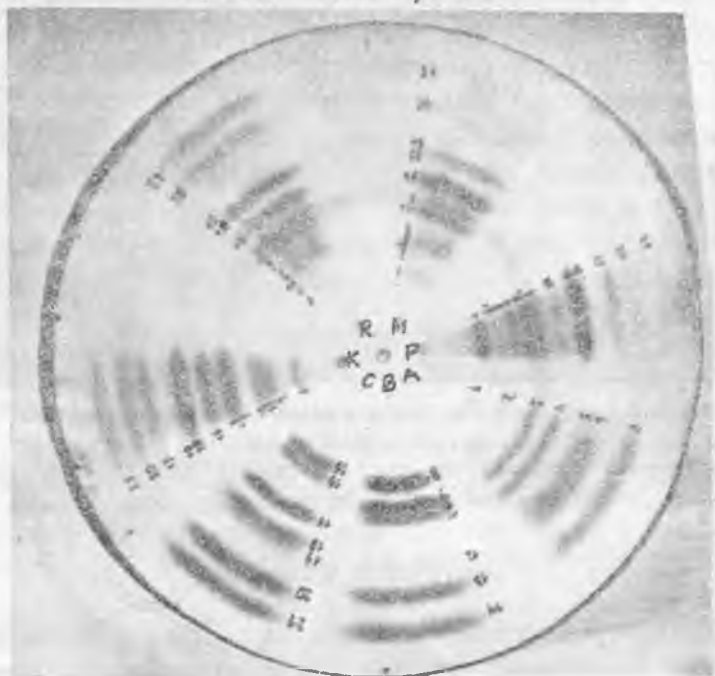
BADANIA WŁASNE

Z oczyszczonych świeżych grzybów sporządzano eluaty. W tym celu odważki 5 g trzonów lub kapeluszy umieszczano w roztworach 50, 60 i 70 % alkoholu etylowego. Co 24 godziny pobierano z eluatów próbki i badano chromatograficznie w celu ustalenia optymalnego czasu, potrzebnego na całkowite przejście wolnych aminokwasów do roztworu alkoholu. Czas ten powinien być dłuższy niż 48 godzin. Oprócz eluatów z grzybów świeżych przygotowano również eluaty z suszonych. Wysuszone kapelusze i trzony rozcierano w moździerzu i 500 mg tak przygotowanego materiału zalewano 30 ml 50, 60, 70 % alkoholu etylowego. Po odsączeniu zanieczyszczeń eluaty nakraplano, w ilości 0,015 ml, na arkuszach bibuły Whatman nr 3.

Do techniki wstępującej używano prostokątnych arkuszy bibuły Whatman nr 3 o wysokości 28 i 46,3 cm. 0,015 ml eluatów наносono na linię startową w formie pasm o długości 25 mm i jak najmniejszej szerokości, odległych od siebie o 25 mm, a od brzegów arkusza o 30 mm. Oprócz eluatów nakraplano na każdym arkuszu 3 sztuczne mieszaniny aminokwasowe, nazwane w teście „mapkami” A, B i C. Chromatogramy rozwijano w kamerach do techniki wstępującej przy użyciu fazy Patridge’a: n-butanol — kwas octowy lodowaty — woda w stosunku 4:1:1 (objęt.). Rozpuszczalnik przepuszczano dwukrotnie. Do całkowitego rozwinięcia w temperaturze 18° małe arkusze wymagały 10, a duże — 50 godzin. Rozwinięte i wysuszone chromatogramy wywoływano przez zanurzenie w roztworze ninhydryny w acetonie o stężeniu 0,0015 g/ml. Po wyschnięciu arkusze ogrzewano przez trzy minuty w suszarce w temperaturze 85°.

W metodzie krążkowej wg Przybylskiej i współpracowników wykorzystano krążki bibuły Whatman nr 3 o średnicy 23 cm. W środku krążka zakreślano koło o średnicy 23 mm i w równych odstępach nakraplano na nim 4 eluaty i 3 „mapki”. Średnica plamy nie przekraczała 5 mm. W środku krążka przebijano bagietką otwór w celu założenia knota. Knot o wymiarach 3×1.5 cm był zanurzony w rozpuszczalniku do głębokości 12 mm. Po sześciu godzinach chromatogramy suszono i ponownie przepuszczano rozpuszczalnik. Do tej metody jako kamer używano dużych eksykatorów, w których w krystalizatorach umieszczano rozpuszczalnik. Gotowe chromatogramy wywoływano roztworem ninhydryny w acetonie i po wysuszeniu ogrzewano przez 3 minuty w temperaturze 85° . Aminokwasy identyfikowano przy pomocy „mapek” składających się z 21 aminokwasów — standardów. „Mapki”

K — koźlarz, M — maślak, R — rydż, P — prawdziwek
A, B, C — „mapki”



Ryc. 1. Chromatogram uzyskany techniką krążkową. Skład aminokwasowy: koźlarza oznaczony na krążku literą K, rydż — R, maślaka — M, prawdziwka — P.

A, B i C — sztuczne mieszaniny aminokwasów — „mapki”

The chromatogram obtained by means of circular chromatography presents four mushrooms: K — *Boletus scarber* Bull, R — *Lactarius deliciosus* (L) Fr, M — *Boletus luteus* (L) Fr, P — *Boletus edulis* Bull. A, B and C — the standard mixture of amino acids

układano w ten sposób, aby R_F poszczególnych aminokwasów zawartych w tej samej mieszaninie były w miarę możliwości wystarczająco odległe od siebie.

Skład sztucznych mieszanin użytych do identyfikacji: „Mapka” A: 1. cystyna, 2. asparagina, 3. d, l, seryna, 4. d, l-treonina, 5. d, l-prolina, 6. d, l-tryptofan, 7. d, l-feniloalanina. „Mapka” B: 8. histydyny chlorowodorek, 9. kwas asparaginowy, 10. glicyna, 11. oksyprolina, 12. α -alanina, 13. metionina, 14. izoleucyna oraz „Mapka” C: 15. lizyny chlorowodorek, 16. argininy chlorowodorek, 17. d, l-kwas glutaminowy, 18. d, l- α -alanina, 19. d, l-tyrozyna, 20. d, l-walina i 21. d, l-leucyna. Uzyskane wyniki podano w tabeli 1 oraz na ryc. 1 i 2.



Ryc. 2. Chromatogram wolnych aminokwasów grzybów jadalnych otrzymany przy użyciu techniki wstępującej

The chromatogram (obtained by one dimensional ascending chromatography) of free amino acids of edible mushrooms

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Otrzymane wyniki zostały ustalone na podstawie kilkunastu chromatogramów uzyskanych techniką krążkową i techniką wstępującą, z których dwa przedstawiono na ryc. 1 i 2. Ilość plam na chromatogramach jest mniejsza od ilości zidentyfikowanych aminokwasów, ponieważ niektóre aminokwasy, o zbliżonych R_F , dawały plamę wspólną np. leucyny i identyfikowano je po przeprowadzeniu rechromatografii oraz sprawdzano testem izatynowym i niektórymi wywołującymi specyficznymi.

Ponieważ z licznych badań wynikało, że skład aminokwasowy trzonów i kapeluszy był identyczny, natomiast stężenie aminokwasów w eluatach z kapeluszy okazało się znacznie większe, więc do badań użyto tylko tych eluatów.

Tab. 1. Wolne aminokwasy grzybów jadalnych: grzyba prawdziwego, koźlarza, maślaka i mleczaja rydza

The free amino acids of mushrooms: *Boletus edulis* Bull, *Boletus scarber* Bull, *Boletus luteus* (L) Fr. and *Lactarius deliciosus* (L) Fr.

l.p.	Nazwa aminokwasu	Grzyb prawdziwy	Grzyb koźlarz	Grzyb maślak	Mleczaj rydz
1	Cystyna	+	+	+	+
2	lizyna	+	+	+	+
3	histydyna	+	—	±	+
4	asparagina	—	±	—	—
5	arginina	—	+	—	—
6	kw. asparaginowy	+	+	—	+
7	glicyna	+	+	+	+
8	seryna	+	+	+	+
9	oksyprolina	+	—	—	—
10	kw. glutaminowy	+	+	+	+
11	treonina	+	+	+	+
12	α-alanina	+	+	+	+
13	β-alanina	—	—	—	—
14	prolina	—	—	—	±
15	tyrozyna	+	+	+	+
16	tryptofan	—	—	—	—
17	metionina	+	+	—	—
18	walina	+	+	+	+
19	fenylalanina	—	—	—	+
20	izoleucyna	+	+	+	+
21	leucyna	+	+	+	+
22	peptyd niezidentyfikowany	—	+	+	+

Legenda: + aminokwas obecny,
 — aminokwas nieobecny,
 ± zaobserwowano tylko na niektórych chromatogramach.

Wyniki zebrano w tab. 1, w której ułożono aminokwasy wg wzrastających współczynników R_F . Jak widać z tej tabeli we wszystkich gatunkach grzybów występuje: cystyna, lizyna, glicyna, seryna, kwas glutaminowy, treonina, α-alanina, tyrozyna, walina i leucyna. Pozostałe aminokwasy były obecne tylko w niektórych grzybach: arginina i asparagina w koźlaku, oksyprolina tylko w prawdziwku, prolina i fenyloalanina tylko w rydzu, a metionina w rydzu i koźlarzu, w tym ostatnim natomiast nie wykryto histydyny, a kwasu asparaginowego nie było

w maślaku. Tryptofanu i β -alaniny nie dostrzeżono w żadnym z badanych grzybów. W koźlarzu, maślaku i rydzu był obecny jakiś niezidentyfikowany peptyd o R_F mniejszym od cystyny.

Jak widać z omawianej tabeli, większych różnic jakościowych w składzie wolnych aminokwasów w badanych grzybach nie dało się wykryć, natomiast zaobserwowano różnice ilościowe w zawartości aminokwasów zarówno w poszczególnych gatunkach grzybów, jak i w obrębie jednego gatunku. Wszystkie grzyby posiadały największe ilości glicyny, kwasu glutaminowego i α -alaniny. W przeciwieństwie do pozostałych, grzyb prawdziwy posiada stosunkowo dużo cystyny, natomiast waliny mniej od koźlarza i rydza. Najwięcej wolnych aminokwasów i największe ich stężenie posiada prawdziwek, najmniej maślak.

Obecność tylu egzogennych aminokwasów w eluatach, zdaje się wskazywać na występowanie ich również w hydrolizatach białkowych, co ze względu na duże sezonowe spożycie grzybów nie jest sprawą bez znaczenia i zachęca do dalszych badań.

Wnioski

1. Nie zaobserwowano większych zmian w składzie wolnych aminokwasów w czterech grzybach jadalnych: prawdziwku, koźlarzu, maślaku i rydzu.

2. Nawet wizualnie widoczna jest różnica w stężeniach aminokwasów zarówno w obrębie jednego, jak i we wszystkich czterech gatunkach.

3. Najwięcej wolnych aminokwasów i największe stężenie posiada grzyb prawdziwy, najmniej maślak.

4. Nie wykryto w żadnym gatunku badanych grzybów tryptofanu i β -alaniny.

5. Grzyby jadalne, ze względu na obecność w nich aminokwasów egzogennych, posiadają znaczenie dla ustroju.

PIŚMIENICTWO

1. Close R.: Nature, **185**, 609—610, 1960.
2. Gramberg E.: Pilze der Heimat, Leipzig 1913, 1, 13; 2, 4—7.
3. Grzymała S.: Badania nad zasłoniakiem rudym (*Cortinarius orellanus* FR), Higiena wsi, **2**, 57—65, 1961.
4. Grzymała S.: Ostrożnie grzyb trujący, PZWL, Warszawa 1958, 6—7.
5. Hughes D. H., Lynch D. L., Somers G. H.: J. Agric. and Food Chem. **11**, 850—853, 1958.
6. Krzeczowska I., Czerniak Z., Burzyński S.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. D. **19**, 329—336, 1964.
7. List P. H.: Arch. Pharmazie, **291**, 502—513, 1958.
8. Orłoś R., Nehring M.: Atlas grzybów jadalnych i trujących, PWRiL, Warszawa 1957, 2—4, 7.

9. Przybylska J., Kociałkowski Z., Wiewiórkowski M.: Roczniki Nauk Rolniczych, 79-A-1, 1—17, 1958.
10. Skirgiełło A.: Grzyby, PWN, Warszawa 1960, 12—23.
11. Wiewiórkowski M., Przybylska J., Kociałkowski Z.: Roczniki Nauk Rolniczych, 79-A-2, 453—465, 1958.
12. Williams R. T., Kirby H.: Sciences, 107, 481—482, 1948.

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе определяется состав свободных аминокислот четырех видов съедобных грибов, трех из семьи *Boletaceae*: 1) *Boletus edulis* Bull., 2) *Boletus scarber* Bull., 3) *Boletus luteus* (L) Fr и одного из семьи *Lactariaceae*: *Lactarius deliciosus* (L) Fr. При исследованиях использована восходящая и круговая бумажная хроматография; последняя — также при рехроматографии. Хроматограммы (на бумаге Whatman № 3) передвигались при помощи смеси растворителей: *n*-бутанол-уксусная ледяная кислота-вода (4:1:1).

Во всех исследованных видах грибов обнаружены аминокислоты: треонин, лизин, глицин, серин, глютаминовая кислота, треонин, α -аланин, тирозин, валин, изолейцин и лейцин, остальные аминокислоты находились только в некоторых грибах. Триптофан и β -аланин найден не был. Вместо того в *Boletus scarber* Bull., *Boletus luteus* (L) Fr и *Lactarius deliciosus* (L) Fr замечено неизвестный пептид с R_F , меньшим чем у цистеина. Замечена большая разница в концентрации аминокислот: 1) во всех видах исследованных грибов больше всего было глицина, глютаминовой кислоты и α -аланина, 2) самый богатый аминокислотами был *Boletus edulis* Bull и имел самую большую их концентрацию, 3) самый убогий аминокислотами был *Boletus luteus* (L) Fr.

Рис. 1. Хроматограмма получена при помощи круговой хроматографии. Состав аминокислот грибов: К — *Boletus scarber* Bull, R — *Lactarius deliciosus* (L) Fr, М — *Boletus luteus* (L) Fr, Р — *Boletus edulis* Bull. А, В и С — искусственные смеси аминокислот.

Рис. 2. Хроматограмма свободных аминокислот съедобных грибов получена при помощи вступительной хроматографии.

Табл. 1. Свободные аминокислоты съедобных грибов: *Boletus edulis* Bull, *Boletus scarber* Bull, *Boletus luteus* (L) Fr и *Lactarius deliciosus* (L) Fr.

SUMMARY

In the present work the composition of free amino acids of four species of edible mushrooms is determined. The species of mushrooms are as follows: three of the family *Boletaceae*: 1. *Boletus edulis* Bull, 2. *Boletus scarber* Bull, 3. *Boletus luteus* (L) Fr and one of the family

Lactariaceae: Lactarius deliciosus (L) Fr. The amino acids were separated by circular and ascending paper chromatography (on Whatman paper N3) with the application of solvent mixture: n-butanol — acetic acid glacial — water (4 : 1 : 1).

In all these species of mushrooms there occurred amino acids—cystine, lysine, glycine, serine, glutamic acid, threonine, α -alanine, tyrosine, valine, isoleucine, the remaining amino acids were present only in some mushrooms. Tryptophan and β -alanine were not detected, but in *Boletus scarber* Bull, *Boletus luteus* (L) Fr, and *Lactarius deliciosus* (L) Fr an unidentified peptid with R_f smaller than cystine was found. A great difference was observed in the concentration of amino acids: 1) in all the species of the examined mushrooms glycine, glutamic acid and α -alanine dominated, 2) the richest in amino acids was *Boletus edulis* Bull, it had the greatest concentration of them, 3) *Boletus luteus* (L) Fr proved the poorest in amino acids.

Pracę otrzymano 20 XI 1962.