

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

Irena KRZECZKOWSKA, Zbigniew CZERNIAK,  
Stanisław BURZYŃSKI

### Związane aminokwasy niektórych grzybów jadalnych

Гидролизованные аминокислоты некоторых съедобных грибов

### Bound Amino Acids of some Edible Mushrooms

W ostatnich latach wielu autorów zajmowało się oznaczaniem zarówno wolnych, jak i związanych aminokwasów, znajdujących się w roślinach, ale stosunkowo mało uwagi poświęcono oznaczaniu składu aminokwasowego grzybów wyższych. Grzyby od zamierzchłych czasów są używane jako pożywienie i, mimo że posiadają stosunkowo małą wartość kaloryczną i odżywczą (3, 7), poznanie ich składu aminokwasowego nie jest rzeczą obojętną ze względu na zawarte w nich aminokwasy egzogenne.

Close (1) w swojej pracy zajmował się oznaczaniem aminokwasów zawartych w grzybach niższych. Hughes i wsp. (2) oznaczali wolne aminokwasy w *Agaricus campestris* Lex i stwierdzili obecność  $\alpha$ -alaniny, seryny, proliny, lizyny, treoniny, waliny, kwasów asparaginowego i glutaminowego, izoleucyny i tyrozyny. List (5) oznaczał aminokwasy i aminy w czernidłaku kołpakowatym (*Coprinus comatus* Gréy). W naszej pracy zajęliśmy się ustaleniem składu związanych aminokwasów czterech gatunków, najbardziej znanych i najchętniej spożywanych, grzybów jadalnych.

Badaniom poddano trzy gatunki grzybów z rodziny grzybowatych (*Boletaceae*): 1) grzyb prawdziwy (*Boletus edulis* Bull), 2) grzyb kozłarz (*Boletus scarber* Bull), 3) grzyb maślak (*Boletus luteus* (L) Fr) oraz jeden z rodziny mleczajowatych (*Lactariaceae*): mleczaj rydz (*Lactarius deliciosus* (L) Fr).

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na grzybach zebranych w końcu sierpnia 1962 r. w okolicach Lublina. Do identyfikacji używano sztucznych mieszanin aminokwasów:

	Lp.	Nazwa aminokwasu	Pochodzenie
Mapka A.	1	cystyna	„Fluka” — Szwajcaria
	2	asparagina	„Lawson” — Anglia
	3	d,l-seryna	„Carl Roth — Karlsruhe
	4	d,l-treonina	„B. D. H.” — Anglia
	5	d,l-prolina	„Light” — Anglia
	6	d,l-tryptofan	„Dembach” — Niemcy
	7	d,l-fenylalanina	„B. D. H.” — Anglia
Mapka B.	8	histydyny chlorowodorek	„Schuchardt” — NRF
	9	kw. 1-asparaginowy	„Fluka” — Szwajcaria
	10	glicyna	„Labor” — Wrocław
	11	hydroksy-1-prolina	„Light” — Anglia
	12	$\beta$ -alanina	bez bliższych danych
	13	d,l-metionina	„Fluka” — Szwajcaria
	14	d,l-izoleucyna	„B. D. H.” — Anglia
Mapka C.	15	d,l-lizyny chlorowodorek	„B. D. H.” — Anglia
	16	l-argininy chlorowodorek	Chemapol.
	17	d,l-kwas glutaminowy	„Fluka” — Szwajcaria
	18	d,l $\alpha$ -alanina	Merck Darmstadt
	19	d,l-tyrozyna	„Fluka” — Szwajcaria
	20	d,l-walina	„Schuchardt” — NRF
	21	d,l-leucyna	„B. D. H.” — Anglia

Wykrywano i rozdzielano aminokwasy przy pomocy chromatografii rozdzielczej na bibule, stosując zarówno technikę wstępującą według Williams'a i Kirby (8), jak i krążkowa wg Przybylskiej i wsp. (6). Używano bibuły Whatman nr 3 i rozpuszczalnika o składzie: n-butanol — kwas octowy lod. — woda w stosunku objętościowym 4:1:1 (Partridge). Chromatogramy wywoływano przez zanurzenie w 0,2% acetonowym roztworze ninhydryny i suszono na wolnym powietrzu w temperaturze pokojowej.

#### BADANIA WŁASNE

Grzyby (trzonki i kapelusze) suszono w temperaturze pokojowej, a następnie rozcierano w porcelanowym moździerzu. Tak przygotowany materiał poddawano w ciągu 48 godzin hydrolizie w dwojaki sposób: a) w kolbie o pojemności 50 ml, okrągłodennej z chłodnicą zwrotną i b) w zatopionych ampułkach. Na 500 mg materiału dodawano około 20 ml 6n HCl. Po zakończeniu hydrolizy roztwór przesączano dwukrotnie.

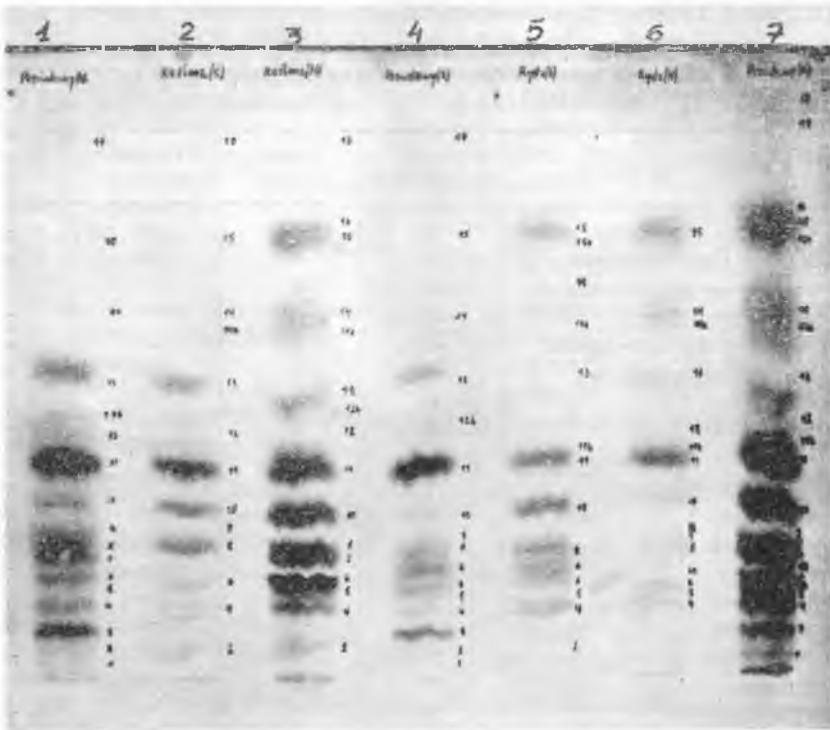
Tab. 1. Skład związanych aminokwasów czterech gatunków grzybów jadalnych: grzyba prawdziwka, koźlarza, maślaka i rydza

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

Lp	Nazwa aminokwasu	Grzyb prawdziwy	Grzyb koźlarz	Grzyb maślak	Mleczaj rydza
1	cystyna	+	+	+	+
2	o lizyny chlorowodorek	+	+	+	+
3	histydyny chlorowodorek	+	+	+	+
4	asparagina	+	+	+	+
5	argininy chlorowodorek	+	+	—	—
6	kwas l-asparaginowy	+	+	+	+
7	glicyna	+	+	+	+
8	seryna	+	+	+	+
9	hydroksy — l-prolina	+	+	—	—
10	kwas glutaminowy	+	+	+	+
11	o treonina	+	+	+	+
12	α-alanina	+	+	+	+
13	prolina	+	—	—	+
14	o tyrozyna	+	+	+	+
15	o tryptofan	+	+	+	+
16	o metionina	+	+	—	—
17	o walina	+	+	+	+
18	o fenyloalanina	+	+	+	+
19	o izoleucyna	+	+	+	+
20	o leucyna	+	+	+	+

Legenda: + obecność aminokwasu,  
 — nieobecność aminokwasu,  
 o aminokwasy egzogenne.

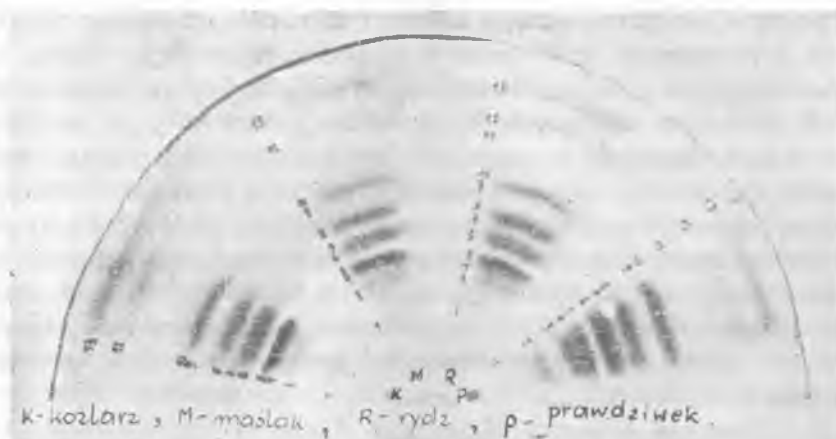
W celu usunięcia kwasu solnego przesącz odparowywano do suchości pod promienikami w temp. ok. 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w wodzie redetylowanej i nakraplano (0,015 ml) pasmowo na arkusze bibuły o wymiarach 46 × 58 cm lub krążki o średnicy 23 cm. W pierwszym wypadku szerokość pasma i odległość między pasmami wynosiła 2,5 cm, a od brzegów bibuły 3 cm, w drugim wprowadzano na krążek 7 pasm, dzięki czemu w obu wypadkach można było przeprowadzać badania w identycznych warunkach, ponieważ równocześnie rozwijały się chromatogramy hydrolizatów czterech badanych grzybów i trzy sztuczne mieszaniny aminokwasów — „mapki” A, B i C o wyżej podanym składzie. Ten sposób przeprowadzania doświadczeń ułatwiał identyfikację oraz pozwalał na dostrzeżenie podobieństw i różnic między materiałem i standardami. W wypadkach wątpliwych stosowano rechromatografię. Uzyskane wyniki zebrano w tab. 1 oraz przedstawiono na ryc. 1 i 2. Na ryc. 1 nakroplono równocześnie eluaty



Ryc. 1. Chromatogram eluatów i hydrolizatów uzyskany techniką wstępującą; Kolumna 1 i 7 — hydrolizat, kolumna 4 — eluat grzyba prawdziwego, kolumna 2 — eluat, kolumna 3 — hydrolizat koźlarza, kolumna 5 — eluat, kolumna 6 — hydrolizat rydza

The chromatogram of eluates and hydrolyzates obtained by ascending and circular technique. Column 1 and 7 — hydrolyzate, column 4 — eluate from *Boletus edulis* Bull., column 2 — eluate, column 6 — hydrolyzate from *Boletus scarber* Bull., column 5 — eluate, column 6 — hydrolyzate from *Lactarius deliciosus*

(uzyskane 60% alkoholem etylowym), oraz hydrolizaty w celu porównania składu aminokwasów w identycznych warunkach. Począwszy od strony lewej, widzimy w 1 i 7 kolumnie hydrolizaty, a w 4 eluat grzyba prawdziwego; w kolumnie 2 eluat, a w 3 hydrolizat koźlarza; w 5 eluat a w 6 hydrolizat rydza. Ryc. 2 przedstawia chromatogram krążkowy hydrolizatów czterech badanych grzybów oznaczonych literami: K — koźlarz, M — maślak, R — rydz, P — prawdziwek. Na tym chromatogramie widać tylko 13 aminokwasów, ponieważ niektóre, np. leucyny, dawały jedną plamę i dopiero po dokonanej rechromatografii został ustalony skład aminokwasowy.



Ryc. 2. Chromatogram uzyskany metodą krążkową przedstawia cztery hydrolizaty:

K — koźlarz, M — maślak, P — prawdziwek, R — rydz

The chromatogram obtained by circular technique presents 4 hydrolyzates:

K — *Boletus scarber* Bull., M — *Boletus luteus* (L) Fr., P — *Boletus edulis* Bull. R — *Lactarius deliciosus* (L) Fr.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

We wszystkich czterech zbadanych przez nas gatunkach grzybów były obecne: cystyna (w niektórych w ilościach śladowych), lizyna, histydyna, asparagina, kwas asparaginowy, glicyna, seryna, kwas glutaminowy, treonina,  $\alpha$ -alanina, tyrozyna, tryptofan, walina, fenyloalanina i leucyny. Oksyprolinę, metioninę i argininę wykryto tylko w grzybie prawdziwym i koźlarzu. Zmiana w odcieniu barwy fioleto pozwala przypuszczać, że w prawdziwku i rydzu są obecne małe ilości proliny.

Jakkolwiek celem niniejszej pracy nie było oznaczenie ilościowe aminokwasów w badanych grzybach, to jednak należy zwrócić uwagę na duże różnice w stężeniach poszczególnych aminokwasów, widoczne na chromatogramach w postaci różnego natężenia barw plam odpowiadających poszczególnym aminokwasom. Widoczne jest największe stężenie kwasu glutaminowego, glicyny i  $\alpha$ -alaniny, nieco mniejsze waliny, leucyn i kwasu asparaginowego, natomiast w bardzo małych ilościach występuje tryptofan, metionina, fenyloalanina, cystyna (nieco większa ilość w grzybie prawdziwym i koźlarzu), prolina, oksyprolina i histydyna. Należy zaznaczyć, że grzyb prawdziwy, koźlarz i rydz zawierają więcej aminokwasów niż maślak, a więc są bardziej wartościowe dla ustroju oraz, że stężenie aminokwasów jest największe w grzybie prawdziwym.

Porównując wyniki uzyskane w naszej pracy z wynikami prac Closea (1), Hughesa (2), Lista (5) oraz własnej pracy poświę-

conej wolnym aminokwasom (4) należy podkreślić, że między składem wolnych i związanych aminokwasów zachodzą przeważnie różnice ilościowe. Jakościową różnicę stwierdzono tylko odnośnie tryptofanu, którego nie udało się wykryć, badając wolne aminokwasy, a znajdował się on w hydrolizatach. Interesujący jest również fakt braku różnicy w składzie jakościowym aminokwasów u grzybów wyższych i niższych oraz mała zawartość aminokwasów egzogennych: a) metioniny i b) aminokwasów o pierścieniu aromatycznym. Aminokwasy egzogenne o łańcuchach rozgałęzionych występują w dużym stężeniu. W czasie badań wykryto w hydrolizatach grzyba prawdziwego i koźlarza nie zidentyfikowany aminokwas o  $R_F$  większym od leucyn (na ryc. 1 oznaczony liczbą 17)

#### WNIOSKI

1. Między składem wolnych i związanych aminokwasów w czterech gatunkach grzybów jadalnych: prawdziwek, koźlarz, maślak i rydz większych różnic jakościowych nie zaobserwowano (tryptofanu nie wykryto w składzie wolnych aminokwasów).

2. Najbogatszy skład aminokwasów oraz największe ich stężenie posiada grzyb prawdziwy, a więc jest najbardziej wartościowy dla ustroju, najuboższy w aminokwasy jest maślak.

3. Zaobserwowano małą zawartość takich egzogennych aminokwasów, jak metionina i aminokwasy posiadające pierścień aromatyczny.

4. Aminokwasy egzogenne o łańcuchach rozgałęzionych występują w dużym stężeniu.

5. W największym stężeniu występował kwas glutaminowy, glicyna i  $\alpha$ -alanina (stężenie określano wizualnie).

6. W prawdziwku i koźlarzu wykryto nie zidentyfikowany aminokwas o  $R_F$  większym od leucyn.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Close R.: *Nature* **185**, 609—610, 1960.
2. Hughes D. H., Lynch D. L., Somers G. H.: *J. Agric. and Food Chem.* **11**, 850—853, 1958.
3. Kierst W.: *Nauka o żywieniu zdrowego i chorego człowieka*. PWZL, 1960, s. 283—284 oraz 706.
4. Krzeczowska I., Burzyński S., Czerniak Z.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. D*, **19**, 321—328, 1964.
5. List P. H.: *Arch. Pharmazie*, **291**, 502—513, 1958.
6. Przybylska J., Kociałkowski Z., Wiewiórowski M.: *Rocz. Nauk. Roln.* **79**, 1—17, 1958.
7. Szabuniewicz B., Kierst W.: *Tabele i normy odżywiania*. Gdańskie Tow. Nauk. Wyd. II, 1958.
8. Williams R. T., Kirby H.: *Sciences*, **107**, 481—482, 1948.

## РЕЗЮМЕ

В процессе анализа были гидролизованы грибы четырех съедобных видов, три из семьи *Boletaceae*: *Boletus edulis* Bull, *Boletus scarber* Bull, *Boletus luteus* (L) Fr и один из семьи *Lactariaceae*: *Lactarius deliciosus* (L) Fr. Гидролизаты исследовались при помощи хроматографического анализа (техникой хроматографии вступительной и круговой) на бумаге Whatman 3. Бутанол — уксусная кислота — вода в пропорции 4:1:1 были употреблены как разрежающий раствор. Хроматограммы проявлялись 0,2% раствором нингидрина в ацетоне. Идентифицировано 16 аминокислот и обнаружена одна неизвестная аминокислота, которая имеет  $R_F$  больше, чем лейцины. Между составом свободных и связанных аминокислот нет большого качественного различия. (Не обнаружен триптофан как свободная аминокислота). Самый богатый состав аминокислот и самая большая их концентрация выступают в грибе *Boletus edulis*; самый незначительный состав аминокислот был определен в *Boletus luteus*. Указываются некоторые аминокислоты, необходимые для человека: метионин и аминокислоты с ароматическим кольцом выступают в небольших количествах, зато аминокислоты с разветвленной цепью присутствовали в большой концентрации.

Рис. 1. Хроматограмма элюатов и гидролизатов, полученных при помощи восходящей хроматографии 1 и 7 — гидролизат, 4 — элюат *Boletus edulis* Bull; 2 — элюат, 3 — гидролизат *Boletus scarber* Bull; 5 — элюат, 6 — гидролизат *Lactarius deliciosus* (L) Fr.

Рис. 2. Хроматограмма получена методом круговой хроматографии, представляет четыре гидролизата грибов: К — *Boletus scarber* Bull, М — *Boletus luteus* (L) Fr, Р — *Boletus edulis* Bull, R — *Lactarius deliciosus* (L) Fr.

Табл. 1. Состав связанных аминокислот четырех съедобных видов грибов: *Boletus edulis* Bull, *Boletus scarber* Bull, *Boletus luteus* (L) Fr и *Lactarius deliciosus* (L) Fr.

## SUMMARY

Mushrooms of four edible species, three of the family *Boletaceae*: *Boletus edulis* Bull, *Boletus scarber* Bull, *Boletus luteus* (L), Fr., and one from the family *Lactariaceae*: *Lactarius deliciosus* (L), Fr. were hydrolyzed. The hydrolyzates were examined by means of chromatographic analysis (ascending and circular technique) on chromatographic paper Whatman N 3. Butanol — acetic acid — water in a ratio 4:1:1 was used as the resolving solution. The filter paper sheets were developed by a 0.2% ninhydrin in acetone. Sixteen amino acids were identified and one unknown amino acid was detected in *Boletus edulis*

Bull. and *Boletus scarber* Bull. Its R<sub>F</sub> value was greater than that of leucine. No greater qualitative differences between the composition of free and bound amino acids were stated. Tryptophan was not detected as a free amino acid. The greatest number of amino acids and the highest concentration of them was found in *Boletus edulis*. *Boletus luteus* was the poorest in amino acids.

Some of the amino acids, i. e. methionine and amino acids with an aromatic ring were present in small amounts, while amino acids with branched chain were found to occur in high concentration.

The concentration of glutamic acid and  $\alpha$ -alanine was also high.

Pracę otrzymano 25 XI 1962.