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

Irena KRZECZKOWSKA, Stanisław BURZYŃSKI
Zbigniew CZERNIAK

**Badania nad możliwością określania gatunków grzybów na podstawie
składu ich wolnych aminokwasów**

**Исследования возможности определения видов грибов на основании
состава их свободных аминокислот**

**Investigation on the Possibility of the Determination of Mushroom
Species on the Basis of the Composition of Their Amino Acids**

Do rodzaju *Amanita* należą jedne z najsilniej trujących grzybów na świecie. Niektóre z nich są morfologicznie bardzo podobne do gatunków powszechnie spożywanych, np. do pieczarek, co może wprowadzić w błąd niedoświadczonych zbieraczy. Pewne gatunki rodzaju *Amanita* również bardzo mało różnią się między sobą. Identyfikacja ich opiera się często na tak zawodnych kryteriach, jak subtelne różnice w zabarwieniu owocników, obecność plamek, czy też pierścienia na trzonie. W związku z tym niektórzy badacze próbowali ustalić przynależność gatunkową tych grzybów na podstawie zawartości pewnych związków chemicznych. Wykazano znaczne różnice w zawartości substancji trujących, jednak ich oznaczenie okazało się w praktyce stosunkowo skomplikowane (2). P. Catalfoma i V. E. Tyler (3) wykryli różnice w składzie wolnych aminokwasów w siedmiu gatunkach grzybów znalezionych w USA: *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina*, *Amanita gemmata*, *Amanita silvicola*, *Amanita porphyria*, *Amanita aspera* i *Amanita calyptroderma*. W jednej z naszych poprzednich prac (5) zauważyliśmy również różnice w zawartości wolnych aminokwasów w niektórych grzybach jadalnych.

Zadaniem naszej pracy było określenie składu wolnych aminokwasów niektórych gatunków grzybów z rodzaju *Amanita* oraz stwierdzenie, czy istnieje między gatunkiem grzyba i składem jego wolnych aminokwasów zależność, która dałaby się zastosować do identyfikacji grzybów rosnących w lasach Lubelszczyzny. Odróżnienie podobnych morfologicznie gatunków na podstawie różnic w składzie wolnych aminokwasów mogłoby stanowić bardzo duże udogodnienie w dokładnych badaniach naukowych, ze względu na stosunkowo dobry rozdział aminokwasów przy pomocy chromatografii bibułowej.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały i metody

Materiał biologiczny:

Amanita muscaria (L) FR. — Muchomor czerwony.

Amanita pantherina D. C. — Muchomor plamisty.

Amanita citrina Schaef ex. S. F. Gray — Muchomor cytrynowy.

Grzyby pochodziły z lasów Lubelszczyzny i zostały znalezione przy końcu lata 1964 r. Eluaty sporządzano podobnie jak P. Catalfomo i V. E. Tyler (3), aby móc lepiej porównać wyniki podane przez wyżej wymienionych badaczy z wynikami naszych badań. Badano zarówno grzyby świeże, jak i suszone. Do rozdziału aminokwasów zawartych w eluatach zastosowano dwie techniki chromatograficzne: wstępującą i krążkową. Dla wykazania obecności aminokwasów, których identyfikacja przy pomocy odczynnika ninhydrynowego natrafiała na trudności, używano reakcji specyficznych.

Do badań używano odczynników cz. d. a. produkcji polskiej. Pochodzenie aminokwasów podano w naszej pracy przyjętej do druku (5).

Aminokwasy identyfikowano przy pomocy wzorców o następującym składzie:

I	II
cysteina	cystyna
asparagina	lizyna
histrydina	arginina
kwas asparaginowy	glicyna
seryna	hydroksyprolina
kwas glutaminowy	treonina
α -alanina	prolina
kwas α -aminomasłowy	β -alanina
metionina	kwas γ -aminomasłowy
walina	tyrozyna
fenyloalanina	tryptofan
izoleucyna	norwalina
	leucyna

BADANIA WŁASNE

Grzyby suszono w temperaturze pokojowej. Próbkę o wadze 1 g grzybów suszonych i 10 g grzybów świeżych każdego gatunku zalewano 20 ml 70% alkoholu etylowego. Po 48 godz. eluaty nadawały się do analizy chromatograficznej i wykazywały taki sam skład aminokwasowy, jak po dłuższej elucji. W badaniach stosowano technikę chromatografii wstępującej i krążkowej. W technice wstępującej wg Williamsa i Kirby (10) używano arkuszy bibuły Whatman nr 3 o wymiarach 28×46 cm. Nakraplano po 0,12 ml eluatów na linii startowej w postaci prążków o długości 25 mm. Poszczególne prążki były oddalone od siebie o 25 mm, a od brzegów arkusza o 30 mm. Oprócz eluatów nakraplano na każdym arkuszu wzorce („mapki”) aminokwasowe.

Do rozwijania chromatogramów stosowano fazę *Patridge'a*: n-butanol — kwas octowy lodowaty — woda w stosunku objętościowym 4 : 1 : 1. Po dwukrotnym rozwinięciu chromatogramy wywoływano przez zanurzenie w 0,15% acetonowym roztworze ninhydryny. Po pojawieniu się prążków aminokwasów chromatogramy ogrzewano przez 3 min. w temperaturze 85° w celu wykrycia β -alaniny.

W technice krążkowej według *Przybylskiej*, *Kociałkowskiego* i *Wiewiórowskiego* (6) stosowano krążki bibuły *Whatman* nr 3 o promieniu 11,5 cm. Eluaty nakraplano w postaci okrągłych plam o średnicy mniejszej niż 5 mm na linii startowej, odległej od środka krążka o 12 mm. W środku każdego krążka wybijano otwór, w który wkładano bagietkę z knotem o wymiarach $3 \times 1,5$ cm. Chromatogramy rozwijano dwukrotnie przy użyciu fazy *Patridge'a*. Technika krążkowa służyła do ustalenia optymalnych stężeń nakraplanych eluatów i do wykonania reakcji specyficznych dla tych aminokwasów, których zidentyfikowanie jedynie przy pomocy odczynnika ninhydrynowego napotykało na trudności.

Reakcje specyficzne wykonano dla wykazania obecności argininy, cystyny, proliny i hydroksyproliny. Argininę wykryto przy pomocy reakcji podanej przez *Achera* i wsp. (1). W tym celu sporządzono dwa roztwory:

Roztwór I: 0,01% roztwór α -naftolu i 5% mocznika w etanolu. Przed wykonaniem reakcji dodano 5% KOH.

Roztwór II: 0,7 ml Br_2 w 100 ml 5% KOH.

Chromatogram spryskano roztworem I, podsuszono przez kilka minut w temperaturze pokojowej, a następnie lekko spryskano roztworem II. Arginina wystąpiła w postaci czerwonej plamy.

W celu wykrycia cystyny wykonano reakcję z nitroprusydkiem sodu (9). W związku z tym przygotowano dwa roztwory:

Roztwór I: 1,5 g nitroprusydku sodu rozpuszczano w 5 ml 2 N H_2SO_4 , dodano 95 ml metanolu i 10 ml 28% amoniaku. Roztwór przesączano i przechowywano w lodówce.

Roztwór II: 2 g KCN rozpuszczano w 5 ml wody i uzupełniano do 100 ml metanolem.

Chromatogram zanurzano w roztworze I, a następnie po podsuszeniu w roztworze II. W wypadku obecności cystyny występowała pomarańczowa plama.

Dla potwierdzenia obecności proliny i hydroksyproliny przeprowadzono reakcję z izatyną. Chromatogram zanurzano w 0,2% roztworze izatyny w acetonie z dodatkiem kwasu octowego (7), a następnie ogrzewano przez 10 minut w temperaturze 85°. Prolina i hydroksyprolina wystąpiły w postaci intensywnych niebieskich plam.

WYNIKI I WNIOSKI

Skład wolnych aminokwasów ustalony na drodze badań eluatów sporządzonych tak ze świeżych, jak i suszonych grzybów okazał się identyczny, co potwierdza wyniki uzyskane przez C a t a l f o m o P. (3), oraz Krzeczowską I. i wsp. (5).

Tab. 1. Wolne aminokwasy trzech gatunków grzybów z rodzaju *Amanita*: *Amanita citrina* Schaeff ex S. F. Gray, *Amanita muscaria* (L) FR, *Amanita pantherina* DC

The composition of free amino acids of the three mushroom species from the *Amanita* genus: *Amanita citrina* Schaeff ex S. F. Gray, *Amanita muscaria* (L) FR, and *Amanita pantherina* DC

Aminokwasy	<i>Amanita citrina</i> I	<i>Amanita muscaria</i> II	<i>Amanita pantherina</i> III
Cystyna (2)	+	—	+
Lizyna (4)	+	+	+
Asparagina (5)	+	—	—
Arginina (6)	—	+	+
Histydyna (7)	+	+	+
Kw. asparaginowy (8)	+	+	+
Glicyna (9)	+	+	—
Seryna (10)	—	+	+
Hydroksypolina —	—	±	+
Kw. glutaminowy (11)	+	+	+
Treonina (12)	+	+	+
α-alanina (14)	+	+	+
Prolina —	—	+	—
Tyrozyna (15)	+	—	—
Kw. γ-aminomasł. (16)	—	—	+
Walina (17)	+	+	+
Fenylalanina (18)	+	+	+
Leucyna (19)	+	+	+

Legenda: + aminokwas obecny, — brak aminokwasu

W tab. 1 zestawiono na podstawie testu ninhydrynowego, testu izoty-nowego przeprowadzonego głównie dla sprawdzenia obecności proliny i hydroksyproliny, oraz reakcji specyficznych na argininę i cystynę. Liczby umieszczone w nawiasach przy poszczególnych aminokwasach odpowiadają ich numeracji na chromatogramie przedstawionym na ryc. 1. Na wyżej podanym chromatogramie widzimy wolne aminokwasy 3 gatunków grzybów z rodzaju *Amanita*: *Amanita citrina* (na ryc. oznaczone I), *Amanita muscaria* (II), *Amanita pantherina* (III). Chromatogram

uzyskano techniką wstępującą i wywołano 0,15% acetonowym roztworem ninhydryny. Eluaty nakroplono w różnych stężeniach: *Amanita citrina* 0,16 ml, *Amanita muscaria* 0,08 ml, *Amanita pantherina* 0,12 ml, aby uwidocznić aminokwasy występujące w *Amanita citrina* i *Amanita pantherina* w mniejszych stężeniach. Z podanych w tab. 1 aminokwasów na chromatogramie są niewidoczne i nie oznaczone prolina i hydroksyprolina, zidentyfikowano je na podstawie testu izatynowego.



Ryc. 1. Chromatogram wolnych aminokwasów trzech gatunków grzybów z rodzaju *Amanita*: *Amanita citrina* Schaeff ex. S. F. Gray (I), *Amanita muscaria* (L) FR (II), *Amanita pantherina* DC (III)

Chromatogram showing the composition of free amino acids of three mushrooms from the *Amanita* genus: *Amanita citrina* Schaeff ex. S. F. Gray (I), *Amanita muscaria* (L) FR (II), *Amanita pantherina* DC (III)

Z przebadanych trzech gatunków grzybów rodzaju *Amanita* największe stężenie aminokwasów i dużą ich liczbę zawiera *Amanita muscaria*, mniejszą *Amanita pantherina* i *Amanita citrina*. Różnice jakościowe w składzie wolnych aminokwasów są wyraźne i łatwe do stwierdzenia przy pomocy samego testu ninhydrynowego. Szczególnie należy zwrócić uwagę na to, że w *Amanita citrina* i *Amanita pantherina* aminokwasy o R_F większym od tyrozyny występują w bardzo małych ilościach lub zupełnie nie występują. Leucyny, fenyloalanina i walina występują w nich w dużo mniejszych stężeniach niż w *Amanita muscaria*. Natomiast kwas γ -aminomasłowy stanowi wyjątek i obecny jest tylko w *Amanita pantherina*. Metioniny i tryptofanu nie udało się wykryć w żadnym z trzech badanych gatunków.

Oprócz podanych aminokwasów dostrzeżono w *Amanita muscaria* ninhydrynowopozytywną plamę poniżej cystyny, oraz drugą plamę nie zidentyfikowaną o R_F zbliżonym do α -alaniny. Ponadto na wszystkich chromatogramach wystąpiła ninhydrynowopozytywna plama o R_F mniejszym od lizyny.

Po przeprowadzeniu reakcji specyficznej na cystynę przy użyciu nitroprusydku sodu i cyjanku potasu, oraz po ogrzaniu pasków bibuły do 100°C przez 10 min. stwierdzono, że plamy charakterystyczne dla cystyny wystąpiły w *Amanita citrina* i *Amanita pantherina*, a także na każdym pasku zabarwionym na kolor niebieski pojawiała się biała plama. Wartość jej R_F we wszystkich trzech gatunkach była jednakowa i zbliżona do R_F glicyny i seryny. Ponadto wykryto w *Amanita muscaria* obecność glicyny i hydroksyproliny, a w *Amanita pantherina* cystynę i hydroksyprolinę (tę ostatnią w dużym stężeniu), aminokwasów tych nie wykryli Catalfomo P. i Tyler V. E.

Porównując otrzymane wyniki z wynikami uzyskanymi przez Catalfomo P. i wsp. zauważyliśmy pewne rozbieżności. Autorzy ci uważają, że na podstawie ustalenia obecności proliny, fenyloalaniny i kwasu γ -aminomasłowego można określić gatunek badanego grzyba, a w szczególności jego przynależność do rodzaju *Amanita*, bądź *Vaginata*. Z tego wynika, że wyżej cytowani autorzy uważają te aminokwasy za najbardziej charakterystyczne dla poszczególnych gatunków. Tab. 2 ilustruje wartości proliny, fenyloalaniny i kwasu γ -aminomasłowego wg badań Catalfomo P. i wsp. (3) oraz wg badań własnych.

W tab. 2 porównano skład wolnych aminokwasów *Amanita citrina* i *Amanita porphyria* w celu stwierdzenia czy podane przez Singera R. (8) duże podobieństwo morfologiczne posiada analogię w podobieństwie składu wolnych aminokwasów. Podano również skład wolnych aminokwasów w *Amanita citrina* wg badań własnych oraz w *Amanita porphyria* wg badań Catalfomo P. i Tylera V. E. Wyniki

dotyczące fenyloalaniny i kwasu γ -aminomasłowego pokrywają się, natomiast istnieją różnice, gdy chodzi o prolinę. W badaniach naszych obecność tego aminokwasu wykryto zarówno testem ninhydrynowym, jak i izatynowym i w obu wypadkach uzyskano identyczne wyniki.

Tab. 2. Zestawienie wyników badań własnych z wynikami Catalfomo P. i Tyler V. E. odnośnie obecności proliny, fenyloalaniny i kwasu γ -aminomasłowego
The authors' results compared with those obtained by Catalfomo P. and Tyler V. E. with regard to the presence of proline, phenylalanine and butyric γ -amino acid

	<i>Amanita citryna</i>		<i>Amanita muscaria</i>		<i>Amanita pantherina</i>		<i>Amanita porphyria</i>	
	a	b	a	b	a	b	a	b
prolina	—	nie badano	+	—	—	±	nie badano	—
fenyloalanina	+	nie badano	+	+	+	+	nie badano	—
kw. γ -aminomasłowy	—	nie badano	—	—	+	+	nie badano	—

Legenda: a — wg badań własnych, b — wg badań Catalfomo P. i Tylera V. E., + aminokwas obecny, — aminokwas nieobecny i ± aminokwas występował nie na wszystkich chromatogramach.

Otrzymane przez nas wyniki nie upoważniają do przyjęcia kryteriów podanych przez Catalfomo P. i wsp., do wyznaczania w systematyce miejsca grzyba na podstawie obecności lub nieobecności trzech wolnych aminokwasów: proliny, fenyloalaniny i kwasu γ -aminomasłowego. Niemożność zastosowania w naszych warunkach podanych przez Catalfomo P. i wsp. zasad dla określenia gatunku grzyba nie wyklucza jednak znaczenia składu aminokwasowego przy ustalaniu gatunku. Należy przypuszczać, że nie wszystkie aminokwasy odgrywają tu jednakową rolę i tylko niektóre z nich można uważać za charakterystyczne, obecność innych prawdopodobnie zależy od środowiska i tym podobnych czynników. Podany przez nas skład aminokwasowy dotyczy tylko grzybów z terenów województwa lubelskiego. Czy jest on charakterystyczny dla grzybów z innych terenów Polski muszą wykazać dalsze badania.

Jak bardzo podobny jest skład wolnych aminokwasów grzybów należących do innych rodzajów wykazuje tab. 3.

Z tab. 3 widzimy, że zachodzą różnice w obecności tylko niektórych aminokwasów. Należałoby ustalić w dalszych badaniach, które różnice

Tab. 3. Zestawienie wolnych aminokwasów trzech gatunków grzybów: *Amanita muscaria*, *Lactarius deliciosus*, *Agaricus campestris*
Survey of free amino acids in *Amanita muscaria*, *Lactarius deliciosus*, *Agaricus campestris*

Aminokwasy	<i>Amanita muscaria</i> w/g badań własnych	<i>Lactarius deliciosus</i> w/g Krzeczko- wskiej i wsp.	<i>Agaricus campestris</i> w/g Hughesa i wsp.
Cystyna	—	+	+
Lizyna	.+	+	+
Asparagina	—	—	+
Arginina	+	—	+
Histydyna	+	+	+
Kw. asparaginowy	+	+	+
Glicyna	+	+	+
Seryna	+	+	+
Hydroksyprolina	±	—	—
Kw. glutaminowy	+	+	+
Treonina	+	+	+
α-alanina	+	+	+
Prolina	+	+	+
Tyrozyna	—	+	+
Metionina	+	—	+
Tryptofan	+	—	+
Walina	+	+	+
Fenylalanina	+	+	+
Leucyna	+	+	+

Legenda: + aminokwas obecny, — aminokwas nieobecny i ± aminokwas występował nie na wszystkich chromatogramach.

są charakterystyczne. Przepuszczalnie zwrócenie uwagi również na różnice ilościowe może się okazać dużą pomocą w określaniu niektórych gatunków grzybów.

PIŚMIENNICTWO

1. Acher R., Crocker C.: *Biochim. et Biophys Acta* 9, 704—705, 1952.
2. Block S. S., Stephens R. L., Borrets A., Morrill W. A.: *Science* 121, 505, 1955.
3. Catalfomo P., Tyler V. F.: *J. Pharm. Science* 50, 689—692, 1961.
4. Hughes D. H., Lynch D. L., Somers G. H.: *J. Agric. Food. Chem.* 6, 11, 850—853, 1958.
5. Krzeczowska I., Burzyński St., Czerniak Z.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D*, 19, 321—328, 1964.
6. Przybylska J., Kociałkowski Z., Wiewiórowski M.: *Rocz. Nauk. Rolniczych* 79-A-1, 1—17, 1958.
7. Saifer A., Oresker I.: *Anal. Chem.* 28, 501—504, 1956.

8. Singer R.: Lilloa 22, 388, 1948.
9. Toennies G., Kolb J. J.: Anal. Chem. 23, 823, 1951.
10. Williams R. J. i Kirby H.: Science 107, 481—483, 1948.

Pracę otrzymano 20 II 1965.

РЕЗЮМЕ

Определен состав свободных аминокислот в грибах из рода *Amanita*: 1) *Amanita citrina* Schaeff ex S. F. Gray, 2) *Amanita muscaria* (L) FR, 3) *Amanita pantherina* DC из лесов Люблинского воеводства.

Результаты настоящей работы не уполномочивают к определению видов грибов из рода *Amanita* на основании присутствия или отсутствия свободных аминокислот: пролина, фенилаланина и γ -аминомасляной кислоты, как утверждали Catalfomo P. и Tyler V. E.

В *Amanita muscaria* выявлено присутствие глицина и оксипролина, а в *Amanita pantherina* цистина и оксипролина. Этих аминокислот не обнаружили Catalfomo P. и Tyler V. E.

Рис. 1. Хроматограмма состава свободных аминокислот в грибах из рода *Amanita*: *Amanita citrina* Schaeff ex S. F. Gray (I), *Amanita muscaria* (L) FR. (II), *Amanita pantherina* DC (III).

Табл. 1. Состав свободных аминокислот в грибах из рода *Amanita*: 1) *Amanita citrina* Schaeff ex S. F. Gray, 2) *Amanita muscaria* (L) FR, 3) *Amanita pantherina* DC.

Табл. 2. Сопоставление результатов нашей работы с результатами работ Catalfomo P. и Tyler V. E.

Табл. 3. Состав свободных аминокислот трех родов грибов: *Amanita muscaria*, *Lac. deliciosus*, *Ag. campestris*.

SUMMARY

The composition of free amino acids in the following mushrooms of the *Amanita* genus were determined: 1. *Amanita citrina* Schaeff ex S. F. Gray, 2. *Amanita muscaria* (L) Fr, 3. *Amanita pantherina* Dc. All the mushrooms came from the woods of the Lublin district. Contrary to the reports of Catalfomo P. and Tyler V. E. the authors of this paper are of the opinion that presence or absence of such free amino acids as: proline, phenylalanine and gamma amino butyric acid is not sufficient to determine the species of the mushrooms from the *Amanita* genus. Glycine and hydroxyproline was found in the *Amanita muscaria*, and cystine as well as hydroxyproline in *Amanita pantherina*. Their presence has not been reported by Catalfomo P. and Tyler V. E.

Papier druk. sat. III kl. 80 g.
Annales UMCS Lublin 1965
800 + 50 egz. L-3

Format 70 × 100
I.ZGraf. im. PKWN, Lublin, Unicka 4
Manuskrypt otrzymano 17.II.66

Druku str. 10
Zam. 686. 17.II.66
Data ukończenia 29.X.66
