

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

Irena KRZECZKOWSKA, Zbigniew CZERNIAK,
Stanisław BURZYŃSKI

Wolne i związane aminokwasy niektórych grzybów jadalnych.

**III. Określenie składu wolnych i związanych aminokwasów
w grzybach jadalnych *Cantharellus cibarius* Fr., *Armillaria
mellea* Vahl oraz *Agaricus campestris* Fr.**

**Свободные и связанные аминокислоты некоторых съедобных
грибов (III)**

Free and Bound Amino Acids of some Edible Mushrooms (III)

W poprzednich naszych pracach (3, 4) przedstawiono skład wolnych i związanych aminokwasów czterech jadalnych gatunków grzybów: grzyb prawdziwy *Boletus edulis* Bull., grzyb koźlarz *Boletus scaber* Bull., grzyb maślak *Boletus luteus* (L) Fr. i *Lactarius deliciosus* (L) Fr. — mleczaj rydz. Badając skład aminokwasowy zwrócono szczególną uwagę na aminokwasy niezbędne dla człowieka — egzogenne, a to ze względu na dużą rolę spożywczą grzybów i możliwość dostarczania tą drogą dla organizmu wspomnianych wyżej substancji. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić występowanie wielu egzogennych aminokwasów, a szczególnie w dużych ilościach lizyny, treoniny i waliny, a więc aminokwasów o łańcuchach rozgałęzionych.

Obecne badania objęły dalsze gatunki grzybów jadalnych: I — pieprznik jadalny (*Cantharellus cibarius* Fr.), II — opieńka miodowa (*Armillaria mellea* Vahl) oraz III — pieczarka (*Agaricus campestris* Fr.), które są w Polsce bardzo rozpowszechnione i często spożywane. Prócz oznaczania składu wolnych i związanych aminokwasów zestawiono wyniki prac naszych z rezultatami uzyskanymi przez Hughesa i wsp. (2) ze względu na interesujący nas (5) problem: czy skład aminokwasowy grzybów, należących do tego samego gatunku, jest identyczny niezależnie od środowiska i miejsca występowania (1).

W poprzedniej naszej pracy określono skład związanych aminokwasów jedynie na podstawie analizy hydrolizatów kwaśnych, jednak ze względu na dostrzeżone

duże straty takich aminokwasów jak tryptofan i fenyloalanina uznano za wskazane poddanie analizie również hydrolizatów zasadowych. Pozwoli to na dokładniejsze ustalenie składu związanych aminokwasów, występujących w białkach grzybów.

MATERIAŁ I METODY

Materiał biologiczny: *Cantharellus cibarius* Fr. Pieprznik jadalny (I), *Armillaria mellea* Vahl. Opieńka miodowa (II) i *Agaricus campestris* Fr. Pieczarka polna (III). Grzyby pierwszych dwóch gatunków zostały zebrane w lecie i na jesieni 1964 roku w lasach województwa lubelskiego, natomiast owocniki pieczarki polnej pochodziły z hodowli znajdujących się na terenie miasta Lublina. Skład wolnych aminokwasów ustalano na drodze analizy chromatograficznej alkoholowych eluatów suszonych grzybów (w poprzednich pracach (3, 4) wykazano, że skład grzybów świeżych i suszonych jest identyczny). Grzyby suszono w temperaturze pokojowej, a następnie jednogramowe ilości startego materiału zalewano 20 ml 70% alkoholu etylowego. Analizę przeprowadzano po 48 godz. elucji.

BADANIA WŁASNE

Dla określenia związanych aminokwasów zastosowano hydrolizę, kwaśną, zasadową, oraz enzymatyczną. Materiał biologiczny użyty do hydrolizy uzyskano po wyeluowaniu wolnych aminokwasów 70% alkoholem etylowym przez okres dwu tygodni.

Hydroliza kwaśna

Do 200 mg suszonego materiału dodawano 5 ml 6 n HCl. Reakcja przebiegała w zatopionych fiolkach umieszczonych w łaźni wodnej (temp. ok. 100°C). Hydroliza trwała 55 godz. i ten okres czasu należy przyjąć za wystarczający, ponieważ dłuższe prowadzenie reakcji nie zmieniało końcowych wyników. Uzyskane w ten sposób hydrolizaty odparowywano kilkakrotnie pod promiennikami, aż do usunięcia nadmiaru kwasu solnego. Masę pozostałą po odparowaniu rozpuszczano w 5 ml wody podwójnie destylowanej i badano na drodze analizy chromatograficznej.

Hydroliza zasadowa

Hydrolizę tę wykonywano podobnie jak Trojanowski J. i wsp. (9). 200 mg suszonych grzybów zalewano 4 ml 6 n NaOH, po czym hydrolizę przeprowadzano w zatopionych fiolkach w atmosferze azotu. Azot uzyskiwano w reakcji azotynu sodu z chlorkiem amonu, dodając kroplami nasycony roztwór NaNO_2 , do ogrzanego nasyconego roztworu NH_4Cl . Zatopione fiolki umieszczano w łaźni wodnej (temp. ok. 100°C) i prowadzono hydrolizę przez 6 godzin (9). Otrzymane hydrolizaty zobojętniano HCl i częściowo odparowano pod promiennikami. Część powstałego NaCl krystalizowała na ścianach parowniczk. Pozostałość przenoszono pipetą

do drugiej parowniczkii i dodawano 96% alkoholu etylowego, w którym słabo rozpuszcza się NaCl (6). Po kilkakrotnym powtórzeniu tych czynności hydrolizaty nadawały się do analizy chromatograficznej.

Tab. 1. Wolne aminokwasy grzybów jadalnych — The free amino acids of edible mushrooms:

I — *Cantharellus cibarius* Fr, II — *Armillaria mellea* Vahl, III — *Agaricus campestris* Fr

	I- <i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	II- <i>Armillaria mellea</i> Vahl.	III- <i>Agaricus campestris</i> Fr.
Cysteina	+	+	+
Cystyna	+	+	+
Lizyna	+	—	+
Histydyna	+	+	+
Asparagina	—	—	+
Arginina	+	+	+
Kwas asparaginowy	+	+	+
Glicyna	+	+	+
Seryna	+	—	+
Kwas glutaminowy	+	+	+
Treonina	+	+	+
α -alanina	+	+	+
Prolina	+	+	+
Tyrozyna	+	+	+
Tryptofan	—	—	—
Kwas α -aminomasłowy	—	—	+
Kwas γ -aminomasłowy	+	—	+
Metionina	—	—	+
Walina	+	+	+
Fenylalanina	—	—	+
Leucyna	+	+	+

+ oznacza występowanie aminokwasu, — oznacza brak aminokwasu.

Hydroliza enzymatyczna

Zbadano możliwości przeprowadzenia hydrolizy białek grzybów na drodze enzymatycznej. Do tego celu użyto trypsyny. Do 200 mg suszonych grzybów dodawano 5 ml 0,25% roztworu trypsyny. Hydroliza trwała 48 godzin i zachodziła w temperaturze 22°C. Równocześnie z badanymi próbkami nastawiano ślełą próbę. Po przeprowadzeniu analizy chromatograficznej okazało się, że białka nie rozłożyły się do aminokwasów, lecz do peptydów, co potwierdzają badania Riesen i współ. (8).

Analiza chromatograficzna

Zastosowano dwie techniki: krążkową i wstępującą, obie przy użyciu bibuły Whatman nr 3. Chromatografię wstępującą przeprowadzano wg



Ryc. 1. Chromatogram hydrolizatów kwaśnych związanych aminokwasów grzybów jadalnych: I — *Cantharellus cibarius* Fr., II — *Armillaria mellea* Vahl., III — *Agaricus campestris* Fr. (1 — cystyna, 2 — lizyna, 3 — histydyna, 4 — arginina, 5 — kwas asparaginowy, 6 — glicyna, 7 — seryna, 8 — kwas glutaminowy, 9 — treonina, 10 — α -alanina, 11 — walina, 12 — leucyna)

The chromatogram of bound amino acids of edible mushrooms: I — *Cantharellus cibarius* Fr., II — *Armillaria mellea* Vahl., III — *Agaricus campestris* Fr. from acid hydrolyzates; (1 — cystine, 2 — lysine, 3 — histidine, 4 — arginine, 5 — aspartic acid, 6 — glycine, 7 — serine, 8 — glutamic acid, 9 — threonine, 10 — α -alanine, 11 — valine, 12 — leucine)

Williamsa i Kirby (10). Na arkusze bibuły Whatman nr 3 o wymiarach 28×46 cm nakraplano po 0,12 ml alkoholowych eluatów oraz po 0,028 ml hydrolizatów w postaci pasm o długości 25 mm. Pasma oddalone były od siebie o 25 mm, a od brzegu arkusza o 30 mm. Dla łatwiejszej identyfikacji aminokwasów na każdym arkuszu bibuły nakraplano również dwie mieszaniny wzorcowych aminokwasów („mapki”). Skład „mapek” oraz pochodzenie aminokwasów zostało podane w naszej pracy (4). Jako rozpuszczalnika użyto fazę Patridge’a: n-butanol — kwas octowy lodowaty — woda, w stosunku obj. 4 : 1 : 1. Chromatogramy rozwijano dwukrotnie, a następnie wywoływano 0,15% roztworem acetonowym ninhydryny. Dla uwidocznienia β -alaniny chromatogramy ogrzewano przez 3 min. w temperaturze 85°C .

Analizę krążkową wykonano wg Przybylskiej i wsp. (7). Użyto krążki bibuły Whatman nr 3 o średnicy 23 cm. Roztwory nakraplano na linii startowej w odległości 12 mm od środka krążka w postaci okrągłych plam o średnicy nie większej niż 5 mm. Chromatogramy rozwijano dwukrotnie przy użyciu fazy Patridge’a i wywoływano 0,15% acetonowym roztworem ninhydryny. Metodę krążkową stosowano głównie dla ustalenia optymalnych stężeń, wstępnej analizy oraz sprawdzenia identyfikacji aminokwasów. Wykryte wolne aminokwasy są przedstawione w tab. 1, a związane w tab. 2. Otrzymane wyniki ustalono na podstawie kilkunastu chromatogramów wykonanych techniką wstępującą i krążkową.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zauważono dość znaczne różnice w zawartości wolnych aminokwasów w poszczególnych gatunkach grzybów. Najwięcej aminokwasów zawiera pieczarka polna (*Agaricus campestris* Fr.). Ustalony przez nas skład aminokwasowy tego grzyba różni się od podanego przez Hughesa i wsp. (2). W naszych badaniach nie wykryliśmy obecności hydroksyproliny i tryptofanu, które zidentyfikowali wyżej wymienieni badacze, natomiast wykazaliśmy występowanie cysteiny, asparaginy, kwasu glutaminowego, kwasu α -aminomasłowego i kwasu γ -aminomasłowego, które nie zostały podane w pracy wyżej cytowanych autorów.

Pieprznik jadalny (*Cantharellus cibarius* Fr.) zawiera 16 wolnych aminokwasów, tzn. o cztery mniej niż pieczarka polna. Różni się on od niej brakiem asparaginy, kwasu α -aminomasłowego, metioniny i fenyloalaniny. Najmniej, bo tylko 13 wolnych aminokwasów występuje w opieńce miodowej (*Armillaria mellea* Vahl.). W gatunku tym oprócz wyżej wymienionych aminokwasów nie ma również lizyny, seryny i kwasu γ -aminomasłowego.

Porównując wyniki obecnej pracy z wynikami jednej z naszych poprzednich prac, dotyczącej wolnych aminokwasów grzyba prawdziwego,

koźlarza, maślaka i mleczaja rydza (3), zauważono bardzo znaczne podobieństwo w składzie aminokwasowym mleczaja rydza i pieczarki polnej oraz grzyba koźlarza i pieprznika jadalnego. Pieczarka polna różni się od mleczaja rydza obecnością jedynie trzech aminokwasów: cystyny, kwasu α -aminomasłowego i γ -aminomasłowego, a pieprznik jadalny od koźlarza występowaniem cystyny, histydy, prolina i kwasu γ -aminomasłowego oraz brakiem asparaginy.

Wszystkie poprzednio badane grzyby zawierały asparaginę, gdy tymczasem w obecnej pracy asparaginę wykryto tylko w jednym (III. *Agaricus campestris* Fr.). Natomiast prolina występująca obecnie we wszystkich gatunkach, była przedtem zidentyfikowana jedynie w mleczaju rydzu.

Tab. 2. Związane aminokwasy grzybów jadalnych — The bound amino acids of edible mushrooms:

I — *Cantharellus cibarius* Fr, II — *Armillaria mellea* Vahl, III — *Agaricus campestris* Fr

	Hydroliza kwaśna			Hydroliza zasadowa			Aminokwasy występujące w obu hydrolizatach		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Cysteina	+	—	+	—	—	—	±	—	±
Cystyna	+	+	+	—	—	—	±	±	±
Lizyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Histydyna	+	+	+	—	—	—	±	±	±
Asparagina	+	—	+	—	—	—	±	—	±
Arginina	+	—	+	—	—	+	±	—	+
Kwas asparaginowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Seryna	+	+	+	—	—	—	±	±	±
Kwas glutaminowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Treonina	+	+	+	—	—	—	±	±	±
α -alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prolina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tyrozyna	+	+	+	—	+	+	±	+	+
Tryptofan	—	—	—	—	+	+	—	±	±
Kw. α -aminomasłowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kw. γ -aminomasłowy	—	+	+	—	—	—	—	±	±
Metionina	—	+	+	—	—	—	—	±	±
Walina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenyloalanina	—	—	—	+	+	+	±	±	+
Leucyna	+	+	+	+	+	+	+	+	±

+ oznacza występowanie aminokwasu, — oznacza brak aminokwasu, ± występował tylko w jednym hydrolizacie.

Różnice w zawartości związanych aminokwasów między trzema badanymi gatunkami nie są tak znaczne, jak w składzie wolnych aminokwasów. W tym wypadku należy jednak rozważyć zarówno hydrolizaty kwaśne, jak i zasadowe. Różnice w składzie aminokwasów hydrolizatów kwaśnych, otrzymanych z badanych grzybów, nie są zbyt duże. Najwięcej aminokwasów występuje w pieczarce polnej. Od pieprznika jadalnego różni się ona zawartością kwasu γ -aminomasłowego i metioniny, a od opieńki miodowej — cysteiny, argininy i asparaginy. Różnice te są widoczne na ryc. 1, będącej fotografią, jednego z chromatogramów. Szczególnie dobrze widać brak cysteiny i argininy w opieńce miodowej (numery 1 i 4 na ryc.). Na zdjęciu nie wszystkie aminokwasy są widoczne, przyczyną tego są zbyt małe stężenia niektórych aminokwasów. Skład aminokwasowy hydrolizatów kwaśnych mało różni się od zawartości aminokwasów w hydrolizatach kwaśnych grzybów, badanych przez nas poprzednio (4): mleczaży rydza, grzyba prawdziwego, kozłarza i maślaka. Do zasadniczych różnic należy brak w tych ostatnich: cystyny, kwasu α -aminomasłowego i γ -aminomasłowego.

Dość znaczne różnice zauważono przy porównaniu wyników hydrolizy kwaśnej i zasadowej. We wszystkich hydrolizatach zasadowych stwierdzono brak cysteiny, cystyny, histydyny, asparaginy, seryny, treoniny, kwasu γ -aminomasłowego i metioniny, które prawdopodobnie rozłożyły się podczas długotrwałego ogrzewania w środowisku zasadowym. Oprócz tego zauważono brak argininy i tyrozyny w pieprzniku jadalnym, mimo że te aminokwasy występowały w hydrolizatach kwaśnych. Może to wskazywać na małą zawartość tych dwu aminokwasów w białkach i peptydach wyżej wymienionego grzyba i na silniejszy ich rozkład w środowisku zasadowym niż w kwaśnym. W hydrolizatach zasadowych wykryto ponadto tryptofan (z wyjątkiem pieprznika jadalnego) oraz fenyloalaninę, które rozłożyły się podczas hydrolizy kwaśnej.

Porównując wyniki średnie z hydrolizy kwaśnej i zasadowej stwierdzono, że najwięcej, tzn. 21 związanych aminokwasów występuje w pieczarce polnej. W dwu pozostałych grzybach znajduje się po 18 związanych aminokwasów, przy czym w porównaniu z pieczarką polną charakterystyczny jest brak tryptofanu, kwasu γ -aminomasłowego i metioniny w pieprzniku jadalnym oraz cysteiny, asparaginy i argininy w opieńce miodowej.

W porównaniu z aminokwasami wolnymi, badane grzyby zawierają więcej aminokwasów związanych. Stosunkowo najmniejsze różnice występują w składzie aminokwasowym pieczarki polnej, której zasadowe hydrolizaty zawierają nie występujący w stanie wolnym tryptofan. Większe rozbieżności stwierdzono w wypadku pieprznika jadalnego, w którym liczba aminokwasów związanych jest większa o dwa od wol-

nych, a jeszcze większa w opieńce miodowej, która posiada 18 związanych, a tylko 13 wolnych aminokwasów.

Szczególnie ważne są różnice w zawartości aminokwasów egzogennych. Wśród aminokwasów związanych pieczarki i opieńki miodowej znajduje się aż 7 egzogennych: lizyna, treonina, tryptofan, metionina, walina, fenyloalanina, leucyna. Pieprznik jadalny posiada ich już tylko 5: lizynę, treoninę, walinę, fenyloalaninę i leucynę. Jeszcze uboższe w aminokwasy egzogenne są eluaty. W żadnym z nich nie ma tryptofanu, a jedynie w pieczarce polnej jest metionina i fenyloalanina. W opieńce miodowej stwierdzono ponadto brak lizyny.

Dane te potwierdzają wysoką wartość spożywczą pieczarki polnej, zawierającej prawie wszystkie aminokwasy egzogenne, szczególnie ważne dla ustroju. Biorąc pod uwagę, że organizm spożywa przede wszystkim aminokwasy związane, dwa pozostałe grzyby też posiadają pewne znaczenie jako źródła aminokwasów egzogennych. Pełniejsza ocena ich przydatności do tego celu będzie mogła być jednak zrobiona dopiero po dalszych badaniach, a przede wszystkim po analizie ilościowej aminokwasów egzogennych.

WNIOSKI

Na podstawie wyników naszych badań można przyjąć, że:

1. Eluaty zawierają mniej aminokwasów niż hydrolizaty.
2. Hydrolizaty zasadowe różnią się od kwaśnych występowaniem tryptofanu i fenyloalaniny oraz brakiem cysteiny, cystyny, histydyny, asparaginy, seryny, treoniny, kwasu γ -aminomasłowego i metioniny.
3. Najwięcej aminokwasów zarówno wolnych, jak i związanych zawiera pieczarka polna.
4. Skład wolnych aminokwasów pieczarki polnej różni się od podanego przez Hughesa i wsp. (2), co potwierdza nasze dawniejsze badania (5) na temat niemożności określenia gatunku grzyba na podstawie zawartości jego wolnych aminokwasów.
5. Wszystkie grzyby zawierają dość dużo aminokwasów egzogennych, szczególnie związanych, co bez wątplenia wpływa na ich dużą wartość spożywczą.

PIŚMIENNICTWO

1. Catalfomo P., Tyler V. E.: *J. of Pharm. Sciences.* 50, 689—609, 1961.
2. Hughes D. H., Lynch D. L., Somers G. F.: *J. Agric and Food Chem.* 6, 850—853, 1958.
3. Krzeczowska I., Burzyński S., Czerniak Z.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D*, 19, 321—328, (1964).

4. Krzeczowska I., Czerniak Z., Burzyński S.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **19**, 329—336, (1964).
5. Krzeczowska I., Burzyński S., Czerniak Z.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **20**, 221—230, (1965).
6. Krzeczowska I., Iskierko J.: Med. Dośw. i Mikrobiol. **2**, 185—188, 1957.
7. Przybylska J., Kociałkowski Z., Wiewiórowski M.: Roczn. Nauk. Rol. **79**, 1—17, 1958.
8. Riesen W. H., Elvehjen C. A.: Arch. Biochem. Biophys. **25**, 395, 1950.
9. Trojanowski J., Łobarzewski J.: Biuletyn Lubelskiego Towarzystwa Naukowego w Lublinie, **1**, 169—178, 1961.
10. Williams R. J., Kirby H.: Paper Chromatography Using Capillary Ascent. Science, **107**, 481—483, 1948.

Pracę otrzymano 25 II 1965.

РЕЗЮМЕ

Определен состав свободных и связанных аминокислот съедобных грибов: I — *Cantharellus cibarius* Fr., II — *Armillaria mellea* Vahl, III — *Agaricus campestris* Fr.

Связанные аминокислоты обнаружены в кислотных и основных гидрализатах. В кислотных гидрализатах не обнаружен триптофан и фенилаланин, в основных: цистин, гистидин, аспарагин, треонин, гамма-аминомасляная кислота и метиланин. Больше всего аминокислот свободных и связанных имеет *Agaricus campestris* Fr., наименее *Armillaria mellea* Vahl.

Во всех исследованных грибах выступает много аминокислот, необходимых для человека (особенно связанных), что оказывает влияние на повышение их продовольственной ценности.

Рис. 1. Хроматограмма кислотных гидрализатов связанных аминокислот съедобных грибов: I — *Cantharellus cibarius* Fr., II — *Armillaria mellea* Vahl, III — *Agaricus campestris* Fr. (1 — цистин, 2 — лизин, 3 — гистидин, 4 — аргинин, 5 — аспарагиновая кислота, 6 — глицин, 7 — серин, 8 — глутаминовая кислота, 9 — треонин, 10 — α -аланин, 11 — валин, 12 — лейцин).

Табл. 1. Свободные аминокислоты съедобных грибов: I — *Cantharellus cibarius* Fr., II — *Armillaria mellea* Vahl, III — *Agaricus campestris* Fr.

Табл. 2. Связанные аминокислоты съедобных грибов: I — *Cantharellus cibarius* Fr., II — *Armillaria mellea* Vahl, III — *Agaricus campestris* Fr.

SUMMARY

The composition of free and bound amino acids of the following edible mushrooms was determined: I — *Cantharellus cibarius* Fr., II — *Armillaria mellea* Vahl, III — *Agaricus campestris* Fr. Bound amino acids

were detected in acidic and basic hydrolizates. Tryptophan and phenylalanine were not found in acidic hydrolizates; cysteine, cystine, histidine, asparagine, serine, threonine, γ -aminobutyric acid, and methionine were not detected in basic hydrolizates. Most of the free and bound amino acids were found to occur in *Agaricus campestris* Fr.; the least amounts of them were recorded in *Armillaria mellea* Vahl. All mushrooms contained large amounts of amino acids essential for man (especially those of bound amino acids) which heighten their palatability.