HENRYK MŁODECKI, WANDA LASOTA, ZOFIA WŁODARCZYK

ZAWARTOŚĆ TRYPTOFANU W NIEKTÓRYCH GRZYBACH JADALNYCH

Z Zakładu Nauki o Środkach Spożywczych Akademii Medycznej w Łodzi
Kierownik: doc. dr *H. Młodecki*

Przeprowadzono oznaczenie tryptofanu w alkalicznych hydrolizatach niektórych grzybów jadalnych za pomocą metody kolorymetrycznej Spiessa i Chambersa oraz metody chromatograficznej.

Tryptofan, jako aminokwas egzogenny, musi być dostarczany organizmowi w pożywieniu. Niedobór tryptofanu powoduje zakłócenia w procesach metabolicznych i uniemożliwia odnowę substancji białkowych. Określenie zawartości tryptofanu ma duże znaczenie w ocenie wartości biologicznej badanego białka.

Celem niniejszej pracy było oznaczenie tryptofanu w najczęściej spotykanych gatunkach grzybów.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Oznaczenia tryptofanu wykonano metodą opracowaną przez *Spiessa i Chambersa* [1], stosowaną przez innych autorów dla produktów białkowych [2, 3]. Metoda ta polega na utlenieniu za pomocą azotynu sodowego produktu kondensacji tryptofanu z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym, a następnie na pomiarze gęstości optycznej otrzymanego roztworu barwy niebieskofioletowej. Do wykreślenia krzywej kalibracji posłużyły stężenia od 40 do 200 μg trypofanu w próbie. Statystyczna ocena oznaczeń ekstynkcji dla tych stężeń tryptofanu wykazała następujący błąd precyzji obliczony wg wzoru:

$$\text{B.p.} = \frac{\bar{S} \cdot 100}{\bar{X}} = 1{,}42\%$$

Przed przystąpieniem do właściwych oznaczeń wykonano badanie ilościowych zmian wolnego tryptofanu, jakie zachodzą podczas hydrolizy alkalicznej, w atmosferze powietrza, dwutlenku węgla i azotu. Równocześnie przeprowadzono badania wpływu hydrolizy alkalicznej na tryptofan w obecności chlorku cynawego mającego działać stabilizująco [2, 4, 5, 6]. Po 24-godzinnej hydrolizie alkalicznej za pomocą 5 n roztworu NaOH w temp. 100° oznaczona zawartość tryptofanu wynosiła:

w atmosferze powietrza		62,5% wartości początkowej
„	CO_2	70,0—72,5% „ „
„	N_2	74,2% „ „

Natomiast w obecności chlorku cynawego zawartość tryptofanu kształtowała się następująco:

w atmosferze powietrza		43,2%
„	CO_2	56,0%
„	N_2	75,8%

W ampułkach wypełnionych azotem stwierdzono najniższe straty tryptofanu zarówno w obecności chlorku cynawego jak i bez tego chlorku.

Ustalenie warunków hydrolizy grzybów przeprowadzono na dwóch gatunkach grzybów: pieczarce dwuzarodnikowej — *Agaricus bisporus Lange* i borowiku szlachetnym — *Boletus edulis Bull ex Fr.*

Owocniki pieczarki dwuzarodnikowej oraz oddzielnie borowika, wysuszone na powietrzu, rozdrobniono w młynku elektrycznym. Po dokładnym wymieszaniu surowiec odtłuszczono.

Do hydrolizy odważano od ok. 0,1 do 1, g grzyba. Hydrolizę alkaliczną wykonano w ampułkach za pomocą 5 n HaOH w atmosferze powietrza, CO_2, N_2 w temp. 100°, w różnych okresach (1/2, 6, 12, 24 godz.) z dodatkiem chlorku cynawego i czystego tryptofanu.

Najwyższą zawartość tryptofanu w pieczarce i borowiku stwierdzono po 24-godzinnej hydrolizie w obecności chlorku cynawego w atmosferze azotu. Odzysk dodanego czystego tryptofanu do badanego grzyba przedstawia się następująco:

w atmosferze powietrza w obecności pieczarki					71,1%
w atmosferze powietrza w obecności borowika					59,5%
„	„	„	„	+ $SnCl_2$	61,0%
CO_2	„	„	„	—	62,0%
CO_2	„	„	„	+ $SnCl_2$	62,6%
N_2	„	„	„	+ $SnCl_2$	66,6%

Oznaczenie tryptofanu w proszku jaja kurzego. W celu sprawdzenia metody oraz warunków hydrolizy przeprowadzono w sposób opisany hydrolizę alkaliczną proszku jaja kurzego i oznaczenie tryptofanu. Uzyskane wyniki — średnio 1,53% w przeliczeniu na białko, są zgodne z danymi piśmiennictwa [8].

Oznaczenie tryptofanu w niektórych grzybach. Wykonano oznaczenie tryptofanu w 8 gatunkach grzybów jadalnych:
borowik szlachetny — *Boletus edulis Bull ex Fr.*
pieczarka dwuzarodnikowa — *Agaricus bisporus Lange*
pieprznik jadalny — *Cantharellus cibarius Fr.*
piestrzenica kasztanowata — *Gyromitra esculenta* *
krowiak podwinięty — *Paxillus involutus Batsch. Fr.**
koźlarz-babka — *Leccinum scabrum Nat. Gr*
podgrzybek — *Xerocomus badius Fr. Kuhn*
maślak — *Suillus luteus L ex Fr.*

Po oznaczeniu zawartości wilgoci w wysuszonych owocnikach, odtłuszczono je w aparacie Soxhleta. Do hydrolizy odważano ok. 1 g grzyba. Hydrolizę alkaliczną przeprowadzono w atmosferze azotu w temp. 100° w ciągu 24 godz. w obecności $SnCl_2$ i bez $SnCl_2$. Hydrolizat przenoszono ilościowo do kolb miarowych, następnie zobojętniano go stężonym kwasem siarkowym, uzupełniano wodą destylowaną do odpowiedniej objętości i sączono.

W próbach, gdzie dodano chlorku cynawego jako stabilizatora, po zakończonej hydrolizie, wytrącano go za pomocą siarczanu srebrowego [2].

Przebieg oznaczenia: Do kolby miarowej o poj. 25 ml wprowadzono 1 ml 3%-owego roztworu aldehydu p-dwumetyloaminobenzoesowego, 10 ml stężonego

* Grzyb warunkowo jadalny.

kwasu siarkowego i 10 ml wody destylowanej. Po 3 min. dodano 1 ml roztworu tryptofanu ciągle mieszając i chłodząc (aby utrzymywała się temperatura topniejącego lodu) w ciągu pięciu min., licząc od chwili wprowadzenia do kolbki roztworu aldehydu. Kolbę z mieszaniną umieszczono w cieplarce w temp. 25° na okres 4 godz. Jak podają Krauze i współpr. [2] jest to czas optymalny dla tej reakcji. Następnie dodano 0,1 ml 0,04%-owego roztworu azotynu sodowego i wstawiono do cieplarki o temp. 25° na pół godziny, po czym uzupełniono wodą do kreski. Gęstość optyczną barwnego roztworu oznaczono na spektrometrze Colemana przy długości fali 620 mu. Roztwór porównawczy przygotowano z tych samych hydrolizatów tylko bez dodatku aldehydu p-dwumetyloaminobenzoesowego i azotynu sodowego. Procentową zawartość tryptofanu w przeliczeniu na suchą substancję, białko oraz związki azotowe rozpatrywane jako „białko" * przedstawiono w tab. I

Oznaczenie tryptofanu w hydrolizatach grzybowych metodą chromatografii bibułowej. Na paski bibuły Whatman 1 naniesiono alkaliczne hydrolizaty badanych grzybów. Rozdział aminokwasów przeprowadzono w temperaturze pokojowej metodą wstępującą [7] stosując rozpusz-

Tabela I

Gatunek grzyba	Procentowa zawartość tryptofanu w przeliczeniu na:			Procentowe odchylenie zawartości tryptofanu obliczone w stosunku do zawartości w białku jaja kurzego	
	suchą substancję	białko	związki azotowe rozpatrywane jako „białko"	białko	„białko"
Borowik	0,246	0,871	0,672	—42,0	—55,2
Borowik+$SnCl_2$	0,255	0,902	0,697	—39,9	—53,6
Pieczarka	0,325	1,29	0,743	—14,0	—50,5
Pieczarka+$SnCl_2$	0,325	1,29	0,743	—14,0	—50,5
Pieprznik jadalny	0,031	0,206	0,173	—86,3	—88,5
Pieprznik jadalny+$SnCl_2$	0,044	0,292	0,246	—80,5	—83,6
Krowiak podwinięty	0,159	0,975	0,833	—35,0	—44,5
Krowiak podw.+$SnCl_2$	0,159	0,975	0,833	—35,0	—44,5
Piestrzenica kasztanowata	0,180	0,810	0,671	—46,0	—55,3
Piestrzenica kaszt.+$SnCl_2$	0,193	0,873	0,720	—41,8	—52,0
Koźlarz-babka	0,208	0,823	0,655	—45,0	—56,4
Koźlarz+$SnCl_2$	0,216	0,854	0,680	—43,0	—54,7
Podgrzybek	0,245	0,891	0,684	—40,5	—54,4
Podgrzybek+$SnCl_2$	0,289	1,050	0,805	—30,0	—46,4
Maślak	0,104	0,427	0,357	—71,6	—76,2
Maślak+$SnCl_2$	0,115	0,469	0,396	—68,8	—73,6

* W tym przypadku za azot białkowy uważa się również substancje azotowe, które mogą brać udział w syntezie białek (wolne aminokwasy oraz niektóre aminy jako prekursory). N-białkowy = N-ogólny — N-chitynowy.

czalnik: n-butanol + kwas octowy + woda w stosunku 4:1:1. Po 24 godz. chromatogramy wyjęto, wysuszono w ciągu 2 godz. na powietrzu i powtórnie umieszczono w komorze, powtarzając tę czynność dwukrotnie. Wysuszone paski wywoływano, przeciągając je przez roztwór ninhydryny, następnie po wywołaniu ich — utrwalono, przeciągając przez roztwór azotanu miedziowego. Wysuszone chromatogramy z różowoczerwonymi plamami kompleksu miedziowego użyto do oznaczeń ilościowych. Barwne plamy tryptofanu eluowano alkoholem metylowym w ciągu 1 godz. Ekstynkcję barwnych eluatów oznaczano na fotokolorymetrze Pulfricha stosując filtr zielony S 53 i używając kuwety o długości 5 cm. Jako ślepą próbę użyto eluat z bibuły bez aminokwasu.

Krzywą kalibracji wykreślono biorąc średnie wartości ekstynkcji różnych stężeń eluatów czystego tryptofanu. Uzyskane wyniki ilustruje tab. II.

Tabela II

Gatunek grzyba	Procentowa zawartość tryptofanu w przeliczeniu na:			Procentowe odchylenie zawartości tryptofanu obliczone w stosunku do zawartości w białku jaja kurzego	
	suchą substancję	białko	związki azotowe rozpatrywane jako „białko"	białko	„białko"
Borowik	0,245	0,867	0,670	—42,2	—55,4
Borowik+$SnCl_2$	0,273	0,966	0,749	—35,6	—50,1
Pieczarka	0,317	1,26	0,725	—16,0	—51,7
Pieczarka+$SnCl_2$	0,333	1,33	0,763	—11,4	—49,2
Pieprznik jadalny	0,087	0,579	0,486	—61,9	—67,6
Pieprznik jadalny+$SnCl_2$	0,131	0,869	0,732	—42,1	—51,2
Krowiak podwinięty	0,160	0,981	0,837	—34,6	—44,2
Krowiak podw.+$SnCl_2$	0,192	1,11	1,0	—26,0	—33,4
Piestrzenica kasztanowata	0,225	1,01	0,839	—32,7	—41,1
Piestrzenica kaszt.+$SnCl_2$	0,249	1,12	0,921	—25,4	—38,6
Koźlarz-babka	0,297	1,17	0,933	—22,0	—37,8
Koźlarz+$SnCl_2$	0,314	1,24	0,987	—17,4	—34,2
Podgrzybek	0,322	1,17	0,896	—22,0	—40,3
Podgrzybek+$SnCl_2$	0,363	1,32	1,01	—12,0	—32,7
Maślak	0,133	0,541	0,457	—64,0	—69,6
Maślak+$SnCl_2$	0,159	0,647	0,547	—56,9	—63,6

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzone badania wstępne wykazały, że tryptofan ulega najmniejszej destrukcji w atmosferze azotu. Wynik ten jest zbieżny z danymi piśmiennictwa [2].

Ustalono, że najwyższą zawartość trypofanu w grzybach uzyskuje się po 24 godzinnej hydrolizie alkalicznej w obecności chlorku cynowego w atmosferze azotu.

Na podstawie wykonanych oznaczeń tryptofanu w 8 gatunkach grzybów, stwierdzono najwyższą zawartość tego aminokwasu w pieczarce dwuzarodnikowej, borowiku, podgrzybku i koźlarzu. Równolegle przeprowadzona analiza chromatograficzna potwierdza oznaczenia wykonane za pomocą metody kolorymetrycznej *Speissa* i *Chambersa* [1]. Metoda ta może być stosowana do oznaczania tryptofanu w grzybach, a więc do materiału roślinnego, nie będącego typowym produktem białkowym.

Wykonane przez nas oznaczenia tryptofanu w proszku jaja kurzego są zgodne z danymi piśmiennictwa [8].

Porównując zawartość tryptofanu w badanych grzybach z zawartością tego aminokwasu w białku jaja kurzego stwierdza się niedobory wahające się w granicach od —14 do —86,3%.

Х. Млодецки, В. Лясота, З. Влодарчик

СОДЕРЖАНИЕ ТРИПТОФАНА В НЕКОТОРЫХ СЪЕДОБНЫХ ГРИБАХ

Содержание

Определено приптофан в щелочных гидролизатах некоторых съедобных грибов (8 видов) при помощи колориметрااческого метода по Spiss'y и Chambers'y а также по методу бумажной хроматографии. Самое содержание триптофана констатировано в Agnicus bisporus, xerocamus badius и Laecimum scabrum.

H. Młodecki, W. Lasota, Z. Włodarczyk

TRYPTOFAN CONTENT OF SOME EDIBLE MUSHROOMS

Summary

Tryptophan was assayed in alkaline hydrolysates of eight species of mushrooms, the colorimetric method of Spiess and Chambers, and chromatographic procedures being employed. The highest tryptophan contents have been ascertained in Agaricus bisporus, Xerocomus bachius and Leclinum scabrum.

PIŚMIENNICTWO

1. *Spiess J. R., Chambers D. C.:* Anal. Chem., 1948, 20, 30. — 2. *Krauze S., Piekarski L., Maksymczuk J.:* Roczn. PZH, 1960, 11, 385. — 3. *Porter C., Högl O.:* Mitt. 1952, 43, 505. — 4. *Brand E., Kassel B.:* J. Biol. Chem., 1939, 131, 483 — 5. *Drere A.:* Bull. Soc. Chim. Biol.: 1956, 38, 243. — 6. *Lugg J.:* Biol. J., 1937, 31, 1422. — 7. *Szymikowski J.:* Praca doktorska Wydz. Farm. AM. w Gdańsku 1963. — 8. *Szczygieł A.:* Podstawy fizjologii żywienia, Warszawa 1956.

Dn. 9.I.1966 r.
Łódź, ul. Kilińskiego 24.