

Aleksandra Karmańska, Jolanta Florczak, Bolesław Karwowski

BADANIE ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH ORAZ AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ RÓŻNYCH ODMIAN PIECZAREK*

Zakład Bromatologii, Katedry Bromatologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: dr hab. prof. nadzw. B. Karwowski

Oznaczono zawartość związków polifenolowych oraz aktywność przeciwutleniającą różnych odmian pieczarek (biała, brązowa, Portobello, A blazei, A campestris). Związki polifenolowe oznaczono za pomocą odczynnika Folina-Ciocalteu'a w przeliczeniu na kwas galusowy, a aktywność antyoksydacyjną grzybów z odczynnikiem DPPH.

Hasła kluczowe: grzyby, polifenole, aktywność przeciwutleniająca – DPPH.
Key words: mushrooms, polyphenols, antioxidant activity – DPPH.

Grzyby jadalne stanowią wartościowy składnik diety ze względu na zawartość wielu cennych składników odżywczych, takich jak: błonnik, sole mineralne, witaminy oraz atrakcyjny smak i aromat. Od niedawna znalazły się w grupie określonej jako żywność funkcjonalna, tzn. są one produktami wykazującymi korzystny wpływ na zdrowie. Badania wykazały obecność w grzybach związków biologicznie aktywnych o potwierdzonych właściwościach terapeutycznych (1).

Do tzw. żywności funkcjonalnej zaliczono również pieczarki, ze względu na wyjątkowe właściwości prozdrowotne. Oprócz wartościowego białka (zawierają prawie wszystkie aminokwasy), dobrze przyswajalnych węglowodanów i tłuszczów (w tym korzystnych dla zdrowia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych), pieczarki są dobrym źródłem potasu, miedzi, selenu, zawierają jod, błonnik, witaminy A, E, witaminy z grupy B (w tym kwas foliowy), a nawet witaminę D. W pieczarkach stwierdzono również obecność beta glukanu polisacharydu zaliczanego do rozpuszczalnej frakcji błonnika pokarmowego. Związek ten obniża poziom cholesterolu, ma modulujący i stymulujący wpływ na układ odpornościowy, działa przeciwnowotworowo poprzez aktywację komórek NK (natural killers) oraz czynnika martwicy nowotworów TNF- α . Ostatnie badania wykazały, że pieczarka zawiera również inne substancje o właściwościach antynowotworowych, takie jak: tyrozylnaza, inhibitor aromatazy (1, 2).

Pieczarki oprócz tego są źródłem związków fenolowych (polifenoli) oraz sprzężonego kwasu linolowego – CLA. Historia uprawy pieczarek sięga kilku

* Praca finansowana z działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Nr 503/3-045-02/503-01)

tysięcy lat, a jej pionierami byli Chińczycy. W Europie uprawę pieczarek rozpoczęto we Francji w XVI wieku. Obecnie na terenie Europy można spotkać ok. 60 rodzajów pieczarek, ale najbardziej popularna jest odmiana biała – pieczarka dwuzarodnikowa (*Agaricus bisporus*) oraz coraz większe zainteresowanie zdobywa pieczarka brązowa. Od klasycznych białych pieczarek różni się nie tylko mocniejszym kolorem, ale i aromatem. Pieczarki brązowe mają bardziej ziemisty smak niż pieczarki białe, znacznie więcej witaminy D i B₂, dzięki czemu wykazują działanie antystresowe i wzmacniające. Kolejna odmiana – Portobello – to pieczarki o bardzo dużym kapeluszu sięgającym nawet do 10 cm średnicy. Różni się stopniem dojrzałości, a przez to wielkością, kolorem, mięsistością i smakiem. Pieczarki Portobello mają wielkie, ciemnobrązowe kapelusze z aksamitnymi, brązowymi blaszkami. *Agaricus blazei* Murill (Pieczarka blazei, ABM) – występowała kiedyś jedynie w brazylijskich lasach tropikalnych (3–5). Potem ze względu na wyjątkowe zdolności lecznicze zaczęto ją uprawiać na dużą skalę. Obok witamin i składników mineralnych grzyb ABM zawiera przede wszystkim największą ilość polisacharydów ze wszystkich znanych grzybów witalnych, a przede wszystkim beta-D-glukan. Liczne badania wskazują na możliwość wykorzystania polisacharydów ABM w leczeniu nowotworów (6). Związane jest to ze zwiększeniem aktywności i efektywności tzw. makrofagów („żarłocznych” komórek układu fagocytarnego). Makrofagi odgrywają największą rolę przy stymulowaniu sił obronnych organizmu ludzkiego oraz tworzeniu interferonu, który działa hamująco na komórki nowotworowe. Oprócz właściwości przeciwnowotworowych *A. blazei* wykazuje właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i antyalergiczne. Ponadto, obniża poziom cholesterolu we krwi, stymuluje układ odpornościowy, a także jest skuteczny w leczeniu AIDS. Może być także stosowany w cukrzycy, nadciśnieniu tętniczymi wirusowym zapaleniu wątroby. Pieczarka brazylijska jest bardzo smacznym grzybem o migdałowym aromacie, który związany jest z obecnością kwasu benzoesowego oraz benzaldehydu. Owocniki zawierają glutaminian sodu, który jest odpowiedzialny za specyficzny pikantny smak (6, 7).

Celem pracy było oznaczenie w różnych odmianach pieczarek: białej, brązowej, Portobello, *A. blazei* i łąkowej całkowitej zawartości polifenoli z odczynnikiem *Folina-Ciocalteu*'a w przeliczeniu na kwas galusowy oraz aktywności antyoksydacyjnej grzybów za pomocą odczynnika DPPH.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły pieczarki białe (*Agaricus bisporus*) zakupione w handlu detalicznym na terenie Łodzi (Auchan, Tesco, Lidl), brązowe, Portobello (Lidl), *A. blazei* (zakupione przez Internet) oraz pieczarki łąkowe – *Agaricus campestris* zebrane jesienią 2015 r. w miejskim parku łódzkiego osiedla Retkinia.

W badaniach korzystano z suszu grzybowego z którego przygotowano ekstrakty wodne i etanolowe wg Gan i współpr. (8). Zawartość związków fenolowych oznaczano z zastosowaniem odczynnika *Folina-Ciocalteu*'a wg Singelton i współpr. (9, 10).

Wyniki wyrażono jako mg równoważnika kwasu galusowego w przeliczeniu na 100 g suszu. W obliczeniach statystycznych korzystano z programu STATISTICA 9,0, stosując test Studenta. Różnice istotne pomiędzy ekstraktami wodnymi i etanolowymi w obrębie jednej odmiany weryfikowano przy poziomie istotności $p \leq 0,001$. Dla wykazania różnic pomiędzy poszczególnymi odmianami wykonano test Anova przy poziomie istotności $p < 0,01$. Odmienne litery występujące w tabeli wskazują na różnice pomiędzy ekstraktami w obrębie jednej odmiany (A,a) oraz pomiędzy poszczególnymi odmianami (A, B, C, D, E, F,G).

Oznaczanie pojemności przeciwutleniającej prowadzono metodą pomiaru zdolności wygaszania rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl, Sigma) (10–14).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Większość publikacji na temat aktywności przeciwutleniającej grzybów pochodzi z dalekiego wschodu (Japonia, Korea, Chiny, Tajwan, Indie). Grzyby badanych gatunków wykazywały zdolności przeciwutleniające bardzo zróżnicowane w zależności od gatunku (13–16).

Tab e l a I. Zawartość polifenoli w wyciągach wodnych i etanolowych badanych grzybów

Tab l e I. Contents of total phenols in ethanolic and water extracts of mushroom species

Gatunek grzyba/miejsce zakupu	Zawartość polifenoli mg GAE/100 g suszu	
	wyciągi wodne	wyciągi etanolowe
Pieczarka dwuzarodnikowa LIDL	183,00±1,46 ^A	117,81±2,50 ^a
Pieczarka dwuzarodnikowa TESCO	136,00±0,52 ^B	102,19±0,35 ^b
Pieczarka dwuzarodnikowa AUCHAN	167,50±1,15 ^C	119,30±0,53 ^c
Agaricus blazei Internet	168,20±2,44 ^D	111,75±0,89 ^d
Pieczarka Portobello LIDL	223,33±2,66 ^E	128,12±1,46 ^e
Pieczarka brązowa LIDL	248,57±2,84 ^F	133,40±1,58 ^f
Pieczarka łąkowa Kapelusze + trzony	162,67±4,01 ^G	109,82±3,60 ^g
Pieczarka łąkowa Kapelusze	220,50±1,87 ^{G₁}	122,50±1,92 ^{g₁}
Pieczarka łąkowa Trzony	121,50±0,89 ^{G₂}	90,30±1,05 ^{g₂}

(A,a); (B,b); (C,c); (D,d); (E,e); (F,f); (G,g) – *** różnice statystycznie istotne w obrębie jednej odmiany;

(a,b,c,d,e,f,g) – różnice istotne (**) pomiędzy ekstraktami etanolowymi, oprócz (d i g) oraz (a i c);

(A,B,C,D,E,F,G) – różnice statystycznie istotne między ekstraktami wodnymi poszczególnych odmian (**), oprócz C i D.

Table II. Procent inhibicji rodnika DPPH przez etanolowe ekstrakty badanych grzybów

Table II. DPPH scavering (%) by ethanol extracts of the mushroom species

Gatunek grzyba	% INHIBICJI									
	stężenie wyciągu grzybowego w próbce mg/0,1 cm ³									
	0,8	1,6	2,0	2,4	3,2	4,0	8,0	12,0	16,0	
Pieczarka LIDL	9,08±0,50	30,59±0,8	35,67±0,6	39,29±1,1	47,28±1,2	62,15±1,89				
Pieczarka Tesco	11,83±0,40	18,05±0,5	27,19±0,7	37,19±0,8	50,73±0,7	69,27±0,90				
Pieczarka Auchan	13,96±0,40	20,28±0,8	24,28±0,9	27,32±1,9	50,93±0,6	51,19±0,80				
Agaricus blazei	8,29±0,81	15,00±0,6	17,46±1,2	20,95±1,3	27,11±1,5	33,16±1,50	48,37±2,1	55,90±1,8	59,30±2,2	
Pieczarka łąkowa	10,21±0,90	20,10±0,7	25,18±0,6	30,50±1,1	39,51±0,7	50,07±1,10				
Pieczarka łąkowa kapelusze	18,22±0,60	25,33±0,9	32,22±0,9	54,20±1,2	60,18±1,3	69,14±1,60				
Pieczarka łąkowa trzony	9,32±0,80	12,48±0,7	18,43±1,1	27,43±1,3	30,22±1,6	40,27±1,80				

Table III. Procent inhibicji rodnika DPPH przez wodne ekstrakty badanych grzybów

Table III. DPPH scavering (%) by water extracts of the mushroom species

Gatunek grzyba	% INHIBICJI									
	stężenie wyciągu grzybowego w próbce mg/0,1 cm ³									
	0,8	1,6	2,0	2,4	3,2	4,0	8,0	12,0	16,0	
Pieczarka LIDL	27,84±0,6	35,24±0,8	40,74±0,7	51,61±1,4	65,35±1,9	74,43±2,01				
Pieczarka Tesco	16,83±0,5	32,93±0,5	40,24±0,7	49,14±0,9	53,17±0,7	56,09±0,90				
Pieczarka Auchan	20,28±0,4	32,48±0,0	39,50±0,9	42,89±1,9	45,91±1,3	55,00±1,60				
Agaricus blazei	8,16±0,8	20,27±0,6	25,34±1,1	27,62±1,9	31,47±1,5	37,51±0,90	50,55±1,6	52,89±1,9	61,13±1,2	
Pieczarka łąkowa	14,66±0,2	26,28±0,5	30,51±0,8	33,58 ± 1,7	46,28±0,9	59,29±1,20				
Pieczarka łąkowa kapelusze	27,05±0,6	34,06±0,9	46,01±0,7	55,24±1,1	68,44±1,4	76,43±1,10				
Pieczarka łąkowa trzony	13,46±0,5	15,22±0,8	24,28±0,8	32,07±0,5	37,63±1,3	45,91±1,90				

Potencjał przeciwutleniający, istotny pod względem żywieniowym związany jest przede wszystkim z zawartością związków fenolowych (5, 14, 15, 16). W badanych pieczarkach stwierdzono od 130 do 250 mg tych związków w 100 g suszu (w przeliczeniu na kwas galusowy) (tab. I).

Zaobserwowano, że rodzaj rozpuszczalnika ma wpływ na właściwości przeciwutleniające i ogólną zawartość związków polifenolowych w ekstraktach. Większą ilość polifenoli oznaczono w wodnych ekstraktach. Najwięcej polifenoli oznaczono w ekstrakcie wodnym pieczarki brązowej 248,57 mg/100 g suszu, mniej w Portobello – 223,33 mg/100 g suszu. Podobne ilości polifenoli stwierdzono w *A. blazei* 168,12 i pieczarce łąkowej (*A. campestris*) 162,67 mg/100 g suszu. W pieczarkach białych w zależności od miejsca zakup stwierdzono różnice od 136,00 mg/100 g suszu w pieczarkach zakupionych w Tesco do 183,0 mg/100 g suszu w grzybach z Lidla. Zaobserwowane różnice mogą wynikać z odmiennych warunków wzrostu, uprawy, przechowywania grzybów. W wyciągach etanolowych poziom związków polifenolowych jest niższy od 102,19 mg/100 g suszu w pieczarkach zakupionych w Tesco do 119,3 mg (Auchan). Między badanymi odmianami pieczarek występują różnice istotne statystycznie (przy poziomie istotności $p \leq 0,001$).

Przeprowadzono również badania zawartości związków polifenolowych z uwzględnieniem części morfologicznej owocników (trzonów i kapeluszy) pieczarki łąkowej. Stwierdzono, że związki fenolowe nie są rozmieszczone w grzybach równomiernie i ich zawartość w poszczególnych częściach owocników różni się, kapelusze zawierają ich więcej – 220 mg/100 g suszu, zaś trzony 121,5 mg/100 g suszu. Występują różnice statystycznie istotne między zawartością polifenoli w kapeluszach i trzonach (zarówno w ekstraktach wodnych, jak i etanolowych).

Właściwości przeciwutleniające określono na podstawie zdolności do wygaszania rodnika DPPH. Wyniki oznaczonej aktywności antyoksydacyjnej z użyciem syntetycznego rodnika DPPH• wyrażono jako liczbę mg suszu grzybowego w 0,1 cm³ wyciągu wodnego lub etanolowego, który redukuje 50% rodnika DPPH• (obliczono parametr IC₅₀) (tab. II, tab. III). Siła działania wyciągów wodnych była wyższa niż etanolowych, co koreluje z większą zawartością związków polifenolowych. Najsilniejsze właściwości oksydacyjne stwierdzono w wyciągu wodnym pieczarki zakupionej w Lidlu i Auchan IC₅₀ = 2,4 mg/0,1 cm³. Siła działania wyciągów etanolowych i wodnych pieczarki *blazei* była niższa IC₅₀ (wyciąg etanolowy 10 mg, wodny 8 mg/0,1 cm³). Kapelusze pieczarki łąkowej wykazują wyższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu do trzonów.

Porównując ogólną zawartość związków fenolowych w badanych grzybach dzikorosnących (11) i uprawowych, zaobserwowano większą ich ilość w pieczarkach.

Podsumowując należy stwierdzić, że badane odmiany pieczarek mogą być źródłem związków polifenolowych. Na uwagę zasługuje wysoki poziom polifenoli w pieczarce brązowej.

WNIOSKI

1. Badane odmiany pieczarek odznaczają się zróżnicowaną zawartością związków fenolowych ogółem oraz różnymi właściwościami przeciwutleniającymi.

2. Zawartość polifenoli jest większa w ekstraktach wodnych niż etanolowych.
3. Pieczarka brązowa zawiera największą ilość związków polifenolowych, pieczarka dwuzarodnikowa zakupiona w marketach ma wyższy poziom polifenoli i większą aktywność przeciwutleniającą niż zakupiona przez Internet pieczarka blazei.
4. Stwierdzono zależność pomiędzy całkowitą zawartością związków polifenolowych, a zdolnością do inaktywacji rodnika DPPH●.
5. Badane pieczarki mogą stanowić źródło polifenoli w diecie.

A. Karmańska, J. Florczak, B. Karwowski

DETERMINATION OF THE CONTENTS OF POLYPHENOL COMPOUNDS IN SEVERAL VARIETIES OF CHAMPIGNONS AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY

Summary

Total contents of polyphenols, in terms of gallic acid, were determined in various varieties of champignons (*Agaricus bisporus*, *A.portobello*, *A.blazei* and *A.campestris*) with Folina-Ciocalteu reagent, and the antioxidant activity of the mushrooms was determined by DPPH reagent. The levels of polyphenolic compounds in the water extracts were higher than in ethanol. The highest content of polyphenols was 248.57 mg/100g in the *A.portobello* water extract, while the lowest value of 136 mg/100g was recorded in water extract for dried champignons purchased from Tesco. In ethanol extracts, the level of polyphenol compounds was lower and ranged from 102.19 mg/100g of dried mushrooms purchased in Tesco to 119.3 mg (Auchan). The observed differences may be due to different conditions of mushroom growth and storage. The antioxidant properties were determined from the ability to scavenge the DPPH radical. The strongest oxidative properties were found for the water extract of the mushroom purchased at Lidl and Auchan, IC₅₀ = 2.4mg/0.1cm³. The antioxidant potential of *A.blazei* ethanol and aqueous extracts was lower, IC₅₀ for ethanol extract 10 mg, for aqueous 8 mg/0.1 ml. The studied champignons may serve as a dietary source of polyphenol compounds. *A.portobello* variety is notable for its high levels of polyphenols.

PIŚMIENNICTWO

1. Kalbarczyk J., Radzki W.: Uprawiane grzyby wyższe jako cenny składnik diety oraz źródło substancji aktywnych. *Herba Polonica*, 2009; 55(4): 224-232. – 2. Siwulski M., Sobieralski K., Sas-Golak I. Wartość odżywcza i prozdrowotna grzybów. *Żywność . Nauka.Technologia. Jakość*. 2014; 1(92): 16-28. – 3. Turlo J.: Grzyby wielkoowocnikowe – niedoceniane źródło substancji leczniczych . *Studia i Materiały CEPL w Rogowie*, 2015; 17(44). – 4. Largeteau M.L., Llarena-Hernandez R.C., Regnauly-Roger C., Savoie J.M.: The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil, biology, cultivation and non-medicinal valorization. *Appl.Microbiol. Biotechnol.* 2011; 92(5): 3630-7. – 5. Mizuno T.: *Agaricus blazei* Murrill medicinal and dietary effects. *Food Rev. Int.* 1995; 11: 167-172. – 6. Kimura Y., Kido T., Takaku T., Sumiyoshi M., Baba K.: Isolation of an antiangiogenic substances from *Agaricus blazei* Murrill, its antitumor and antimetastatic actions. *Cancer Sci*. 2004; 95(9): 758-64. – 7 Menoli RCNL, Mantovani M.S.,Ribeiro L.R., Speit G., Jordao B.Q., Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutation Res.* 2001; 496: 5-13. – 8. Gan, C. H., Nurul Amira, B. and Asmah, R. Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporous* and *Agaricus brasiliensis*). *International Food Research Journal* 2013; 20(3): 1095-1102. – 9.Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdcicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 1965; 16: 144-158. – 10. Florczak J, Karmańska A., Karwowski B.: Badanie zawartości związków polifenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej niektórych jadalnych gatunków grzybów dziko rosnących. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2016; 49(4): 719-724.

11. *Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.*: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology* 1995; 28: 25-30. – 12. *Polak J., Bartoszek M., Stanimirova I.*: A study of the antioxidant properties of beers using electron paramagnetic resonance. *Food Chemistry* 2013; 141(3): 3042-3049. – 13. *Molyneux P.*: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Scitechnol*, 2004; 26(2): 211-19. – 14. *Cheung L.M., Cheung P.C.K., Ooi V.E.C.*: Antioxidant activity and total phenolics of edible mushrooms extracts. *Food Chem.*, 2003, 81, 249-255. – 15. *Choi W.S., Sapers G.M.*: Effects of washing on polyphenols and polyphenol oxidase in commercial mushrooms (*Agaricus bisporus*), *Agaric. Food. Chem.* 1994, 42 (10): 2286-2290. – 16. *Dubost N.J., Ou B., Beelman R.B.*: Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem.*, 2007, 105: 727-735.

Adres: 90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1