

# BEITRÄGE ZUR KENNNTNIS DER PROTEINE EINIGER SPEISEPILZE

Von

D. TÖRLEY

Lehrstuhl für Biochemie und Lebensmitteltechnologie, Technische Universität, Budapest

(Eingegangen am 15. Juli 1976)

Vorgelegt von Prof. R. LÁSZITTY

## Einleitung

Die Anwendung der Disk-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen ermöglicht eine sehr weitgehende und scharfe Trennung der Proteine, und die Verteilungsmuster der Proteine und Enzyme erlauben sogar die Erkennung von Sortenunterschieden in pflanzlichen und tierischen Extrakten. Im Nachfolgenden wird über die elektrophoretische Trennung von einigen Pilzproteinen berichtet und die angewandten Methoden werden beschrieben.

## Material und Methoden

*Material:* Als Untersuchungsmaterial dienten in erster Linie die Zuchtpilze von Ungarn: der Champignon (*Agaricus bisporus*) und der Austernseitling (Austernpilz, *Pleurotus ostreatus*), und einige wild wachsende Pilze: der Weiße Schneckling (*Limacium eburneum*), der Nackte Ritterling (*Lepista nuda*), zwei Puffball-(*Lycoperdon*-)Arten, die Nebelkappe (*Clitocybe nebularis*), der Riesenschirmling (*Macrolepiota procera*), der Körnchen-Röhrling (*Suillus granulatus*), der Garten-Tintling (*Coprinus micaceus*).

Die Untersuchungen wurden öfters — in einigen Fällen auch nach 1—2 Jahren wiederholt, um zu sichern, daß die Feststellungen regelmäßig vorkommende Erscheinungen decken. Diese strenge Kontrolle hat sich natürlich nur auf die Zuchtpilze bezogen, da die mehrjährige Wiederholung mit den wild wachsenden Arten nicht immer eindeutig ist; die Zusammensetzung der Fruchtkörper ändert sich mit dem Alter, den Züchtungsbedingungen usw.

*Methoden:* 1. Disk-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen. Die Elektrophorese wurde auf 7%igen, mit Ammoniumperoxidisulfat polymerisierten Gelen durchgeführt. Die Stammlösungen: Lösung 1 : n-HCl 48,0 ml, TRIS 36,6 g, TEMED 0,23 ml mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt; pH=8,9. Lösung 2: Acrylamid 28,0 g, BIS 0,735 g mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Lösung 3: Ammoniumperoxidisulfat 0,14 g/100 ml. Die Zusammensetzung des Gels: 1 Teil Lsg. 1, 2 Teile Lsg. 2, 1 Teil destilliertes Wasser. 4 Teile Lsg. 3. — Elektrodenpufferlösung: TRIS 6,0 g, Glycin

28,8 g, mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt; pH = 8,3. Farbstofflösung: Amidoschwarz 10B 1 g mit 7%iger Essigsäure auf 100 ml aufgefüllt. Entfärbung mit 7%iger Essigsäurelösung.

(Abkürzungen: TRIS: Tris-(hydroxymethyl)aminomethan. TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyldiamin. BIS: N,N'-Methylenbisacrylamid.) Die Elektrophorese wurde mit 5 mA Stromstärke durchgeführt, mit zehnfach verdünnter Elektrodenpufferlösung. [1, 2].

2. Herstellung des Pilz-Extraktes. Die Fruchtkörper wurden in eisgekühltem Porzellanmörser mit 0,1 Teil Elektrodenpuffer und Quarzsand verrieben. 0,1 ml des zentrifugierten Extraktes wurde auf die Gelsäule aufgebracht. Im Falle des Zuchtchampignons wurden Stiel und Hut auch separat aufgearbeitet, bei wild wachsenden Pilzen wurde das nicht immer durchgeführt.

### Ergebnisse

Die Proteinphorogramme der Disk-Elektrophorese zeigten, daß die Verteilung der Proteine in den Fruchtkörpern sehr mannigfaltig ist. Es gibt Pilze, die in ihrem Hut und Stiel dieselben Proteinfractionen haben, in den meisten Fällen aber findet man einen Unterschied in der Zahl der Banden, oder in der Intensität der Banden. Im Hut findet man fast immer mehr Banden, als im Stiel, doch gibt es auch Ausnahmefälle. Während der Reifung verschwinden einige Banden, oder ihre Farbintensität ändert sich. (Natürlich ändert sich die Zahl der Banden auch mit der Konzentration des aufgetragenen Musters.)

Bei einigen wild wachsenden Arten konnten folgende Unterschiede in der Zahl der Proteinfractionen in Hut:Stiel festgestellt werden: Körnchen-Röhrling 6:5, Garten-Tintling 12:11, Nebelkappe 15:17, Nackter Ritterling 17:11, Riesenschirmling 16:17.

Die Untersuchungsergebnisse des Zuchtchampignons stammen von systematischen, mehrfach wiederholten Versuchen, wo immer junge (unreife) und reife Fruchtkörper verarbeitet wurden. In beiden Fällen wurden kleine, große und mittelgroße Fruchtkörper ausgewählt und parallel untersucht. Die Aufteilung wurde aufgrund folgender Größen gemacht:

kleine Pilze: Durchmesser der Hutes 2—3 cm, Gewicht 5—20 g

mittelgroße Pilze: Durchmesser der Hutes 3—5 cm, Gewicht 20—30 g

große Pilze: Durchmesser des Hutes über 5 cm, Gewicht über 30 g.

Der Grund dafür war, daß die Fruchtkörper beim Züchten nicht kontinuierlich erscheinen. Von einem guten, vom Myzel gut durchdrungenen Kompost werden die Pilze während einer Zeitspanne von ungefähr 4 Wochen in 5 Wellen geerntet. In den ersten zwei Wellen wachsen die Pilze groß, und reifen nur dann, wenn sie diese durchschnittliche Größe erreicht haben. In den späteren

Wellen erscheinen am Kompost immer weniger Pilze, und die Mehrzahl erreicht nicht mehr die Größe wie die Fruchtkörper der ersten zwei Wellen, und sie reifen mit einer kleineren Gestalt. Da es schon mehrfach nachgewiesen wurde, u. a. von DELMAS und Mitarbeitern [3], daß der Gehalt an freien Aminosäuren der Fruchtkörper schwankt, d. h. die Fruchtkörper der einzelnen Erntewellen unterschiedliche Zusammensetzung haben, die man mit der chemischen Zusammensetzung des Kompostes nicht in Zusammenhang bringen kann, wählten wir auch zu den Proteinuntersuchungen z. T. unreife (d. h. Pilze mit geschlossenem Hut und mit hellen Blättern) und z. T. reife Fruchtkörper (d. h. Pilze mit geöffnetem Hut und mit dunkel gefärbten Blättern, was die Sporenbildung andeutet.)

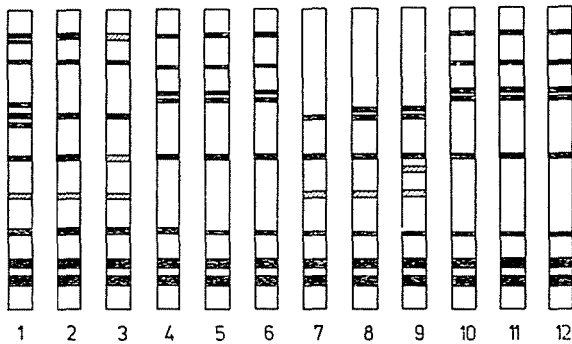


Abb. 1. Pherogramme des Zuchtchampignons. 1 — unreifer Fruchtkörper, großer Hut; 2 — unreifer Fruchtkörper, mittelgroßer Hut; 3 — unreifer Fruchtkörper, kleiner Hut; 4 — unreifer Fruchtkörper, groß, Stiel; 5 — unreifer Fruchtkörper, Stiel, mittelgroß; 6 — unreifer Fruchtkörper, Stiel, klein; 7 — reifer Fruchtkörper, großer Hut; 8 — reifer Fruchtkörper, mittelgroßer Hut; 9 — reifer Fruchtkörper, kleiner Hut; 10 — reifer Fruchtkörper, Stiel, groß; 11 — reifer Fruchtkörper, Stiel, mittelgroß; 12 — reifer Fruchtkörper, Stiel, klein

Die Pherogramme wurden auch densitometrisch ausgewertet. Die quantitativen Bestimmungen zeigten sehr oft große Schwankungen, selbst in Pilzen von gleichem Alter und gleicher Gestalt.

Die Proteinpherogramme wurden auf gleiche Trennstrecke umgezeichnet, wobei nur die starken Hauptbanden und die deutlichen Banden in Betracht genommen wurden. Abb. 1 zeigt die Pherogramme des Zuchtchampignons; 1—6 Hut und Stiel von unreifen, 7—12 Hut und Stiel von reifen Fruchtkörpern. Es ist ersichtlich, daß es selbst in den Pherogrammen der Hüte der unreifen Fruchtkörper zwischen den großen (1), mittelgroßen (2) und kleinen (3) Pilzen einen Unterschied gibt. Bei den entsprechenden Stielen (4, 5, 6) sind in den Hauptbanden keine Unterschiede. Die Hüte der großen (7), mittelgroßen (8) und kleinen (9) reifen Fruchtkörper enthalten wenigere Proteinfractionen, als die der unreifen, bei den entsprechenden Stielen (10, 11, 12) konnte dagegen kein wesentlicher Unterschied entdeckt werden.

In den Pherogrammen des Austernpilzes (Abb. 2) sieht man, daß der kleine unreife Fruchtkörper (1) dieselben Hauptbanden enthält, wie der große (2), nur die Intensität einiger Banden erscheint umgekehrt. Die unterschiedliche Intensität zeigt sich auch in den kleinen (3) und großen (4) reifen Fruchtkörpern, aber diese Pherogramme weisen schon viel größere Unterschiede

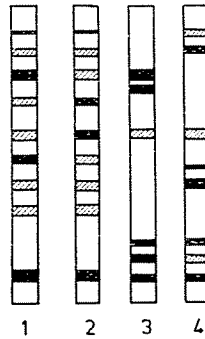


Abb. 2. Pherogramme des Austernpilzes. 1 — kleiner unreifer Fruchtkörper; 2 — großer unreifer Fruchtkörper; 3 — kleiner reifer Fruchtkörper; 4 — großer reifer Fruchtkörper

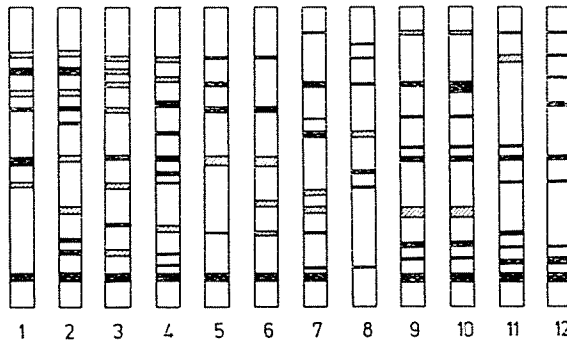


Abb. 3. Pherogramme von wild wachsenden Pilzen. 1 — Nackter Ritterling, Hut; 2 — Nackter Ritterling, Stiel; 3 — Riesenschirmling, Hut; 4 — Riesenschirmling, Stiel; 5 — Körnchen-Röhrling, Hut; 6 — Körnchen-Röhrling, Stiel; 7 — Garten-Tintling, Hut; 8 — Garten-Tintling, Stiel; 9 — Weißer Schneckling, Hut; 10 — Weißer Schneckling, Stiel; 11 — Nebelkappe, Hut; 12 — Nebelkappe, Stiel

auf. In den reifen Fruchtkörpern vorkommende Proteine sind im Pherogramm in viel schärfere Banden getrennt; das Pherogramm vom kleinen und großen Fruchtkörper enthält neben den gemeinsam vorkommenden Banden auch solche, die nur in einem oder im anderen erscheinen.

Abb. 3 zeigt die Pherogramme von Hut und Stiel folgender wild wachsender Pilze: Nackter Ritterling (1, 2), Riesenschirmling (3, 4), Körnchen-Röhrling (5, 6), Garten-Tintling (7, 8), Weißer Schneckling (9, 10), Nebelkappe (11, 12). Es ist interessant, daß nur in den Pherogrammen des Weißen Schnecklings im Hut und Stiel genau dieselben Hauptbanden vorkommen.

Die Proteinpherogramme der Extrakte von den ganzen Fruchtkörpern folgender Pilze: Riesenschirmling (1), Körnchen-Röhrling (2), Weißer Schneckling (3), Austernpilz (4), Puffball (5), Garten-Tintling (6), Nackter Ritterling (7), Nebelkappe (8), Zuchtchampignon (9) sind in Abb. 4 dargestellt. Aus den Pherogrammen kann ersehen werden, daß die Verteilung der Hauptbanden für die einzelnen Pilzarten charakteristisch ist. Durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese gelingt also eine scharfe Trennung der Pilzproteine,

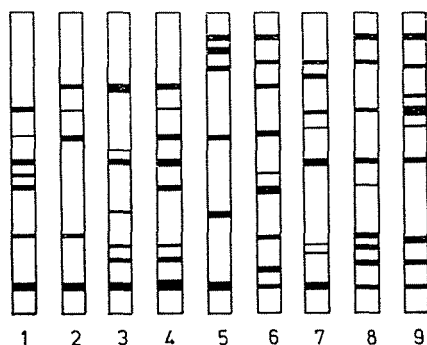


Abb. 4. Pherogramme von ganzen Pilzen. 1 — Riesenschirmling; 2 — Körnchen-Röhrling; 3 — Weißer Schneckling; 4 — Austernpilz; 5 — Puffball, 6 — Garten-Tintling; 7 — Nackter Ritterling; 8 — Nebelkappe; 9 — Zuchtchampignon

welche zur Erkennung verschiedener Pilzarten benutzt werden kann. Die Untersuchungen wurden mehrere Jahre lang wiederholt, und die Ergebnisse geben einen Beweis für die Reproduzierbarkeit der Methode.

### Zusammenfassung

Mit Hilfe der Disk-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen wurden Proteine von verschiedenen Speisepilzen fraktioniert. Es zeigte sich, daß die Pherogramme der reifen und unreifen Fruchtkörper meistens nicht identisch sind. In den Pherogrammen der Extrakte der Pilzhüte und Stiele sind in den meisten Fällen auch Unterschiede vorhanden. Die Pherogramme der Extrakte von ganzen Fruchtkörpern zeigen verschiedene Verteilung der Hauptbande, welche für die verschiedenen Pilzarten charakteristisch sind.

### Literatur

1. ORENSTEIN, L.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **121**, 321, 1964.
2. DAVIS, V. J.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **121**, 404, 1964.
3. DELMAS, J.—POITOU, N.—DELPECH, P.: Comptes rendus **267/D**, 2147, 1968.

Dr. Dezső TÖRLEY, H-1521 Budapest