

Bioaktywne związki grzybów z rodzaju *Lactarius* **Biologically active compounds of mushrooms genus *Lactarius***

Ryszard Marszałek¹, Katarzyna Paradowska¹, Iwona Wawer¹

¹Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Farmacji Fizycznej i Bioanalizy, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, e-mail: katarzyna.paradowska@wum.edu.pl

Słowa kluczowe: grzyby, *Lactarius vellereus*, seskwiterpeny, furanodiol, laktarorufina A i B
Key words: mushrooms, *Lactarius vellereus*, sesquiterpenes, furanodiol, lactarorufin A and B.

Streszczenie

Grzyby z rodzaju *Lactarius* są mało przebadane, bowiem badania składu chemicznego są prowadzone głównie dla gatunków jadalnych i uprawnych. Tymczasem grzyby *Lactarius* zawierają stosunkowo duże ilości białek, polisacharydów (chityna) oraz interesujących bioaktywnych związków seskwiterpenowych występujących w soku mlecznym i owocnikach. Wcześniejsze badania grzybów *Lactarius* wykazały obecność takich związków jak: velutinal, stearovelutinal, velleral, izovelleral. Furanodiol oraz laktarorufiny A i B znaleziono w *Lactarius rufus*. W tej pracy z grzybów *Lactarius vellereus* wyizolowano furanodiol oraz niewielkie ilości laktarorufiny A, izolarktarorufiny A i laktarorufiny B.

Summary

Mushrooms genus *Lactarius* are less widely studied, because the investigations of chemical composition are focused on edible and cultivated ones. *Lactarius* species are rich in proteins, polysaccharides (chitin) and interesting bioactive sesquiterpenes present in latex as well as in fruiting body. Previous studies on *Lactarius* revealed the presence of velutinal, stearovelutinal, velleral and izovelleral. Furanodiol, lactarorufin A, lactarorufin B were first isolated from *Lactarius rufus*. In the present work furanodiol, and small amounts of lactarorufin A, B were obtained from fruiting bodies of *Lactarius vellereus*.

Wstęp

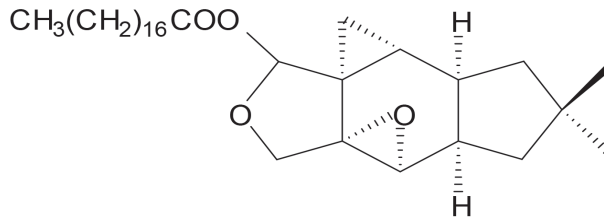
Rodzaj *Lactarius* należy do rodziny *Russulaceae* (gołąbkowate) i rzędu *Agaricales* (pieczarkowce) oraz klasy *Basidiomycetes* (podstawczaki). Grzyby z rodzaju *Lactarius* są mało przebadane [1, 2], bowiem badania składu chemicznego są prowadzone głównie dla gatunków jadalnych, a zwłaszcza uprawianych (pieczarka, bocznik). Owocniki grzybów rodzaju *Lactarius* zawierają dość duże ilości białka i węglowodanów oraz niewielkie ilości lipidów. Frakcja lipidowa otrzymana przez ekstrakcję owocników mleczaja rydza (*Lactarius deliciosus*) zawierała głównie kwas olejowy (41,3%) i stearynowy (25,3%), mniejsze ilości palmitynowego (12,1%), linolowego (17,1%) i linolenowego (0,3%). Mleczaj rydz (gatunek grzybów należący do rodziny gołąbkowatych) zawiera znaczne ilości mannitolu (13,7% suchej masy) oraz niewielkie ilości glukozy i trehalozy. Spośród polisacharydów w największej ilości występuje chityna, może ona stanowić nawet do 80–90% suchej masy. Podstawowym sterolem występującym w grzybach jest ergosterol, który pod wpływem promieniowania słonecznego ulega przemianie do witaminy D₂. Ergosterol jest charakterystycznym produktem dla całego królestwa grzybów [3]. W składzie chemicznym grzybów z rodzaju *Lactarius* szczególnie interesujące dla farmacji i medycyny są związki seskwiterpenowe zawarte zarówno w owocniku, jak i w mleczku.

Celem pracy była ocena możliwości wyizolowania związków seskwiterpenowych z grzybów z rodzaju *Lactarius vellereus* (mleczaj chrząstka) w ilości umożliwiającej modyfikacje ich struktury w kierunku otrzymania nowych związków, potencjalnie interesujących dla farmakologii. Zwłaszcza furanodiol i pochodne laktarorufiny mogłyby stanowić materiał wyjściowy do dalszych syntez.

Związki seskwiterpenowe z grzybów

Grzyby z rodzaju *Lactarius* zawdzięczają swoją nazwę sokowi o konsystencji mleka, niekiedy zabarwionemu na żółto, np. u *Lactarius chrysorrhoeus* lub czerwono-pomarańczowo, np. u *Lactarius deliciosus*. Grzyby o czerwono-pomarańczowym zabarwieniu soku mlecznego są jadalne i mają łagodny smak. Sok pojawia się w momencie uszkodzenia grzyba. Stanowi on mechanizm obronny, bowiem zawiera labilne związki obronne oraz zestaw enzymów przekształcający je w kolejne pochodne. Sok mleczny pełni funkcję obronną na dwa sposoby – poprzez zmianę koloru odstrasza pasożyty, a nieprzyjemny ostry i piekący smak odstrasza potencjalnych konsumentów [4]. Najczęściej spotykanym prekursorem o roli obronnej jest velutinal lub stearovelutinal (Rysunek 1).

Bioaktywne związki grzybów z rodzaju *Lactarius*



Rysunek 1. Wzór strukturalny stearovellutinalu

Pierwszymi produktami przemiany stearovellutinalu, powstającymi w kilka sekund po uszkodzeniu owocnika, są bardzo gorzkie związki: velleral i izovelleral (głównie izovelleral); w ciągu kilku minut zaczynają one ulegać redukcji do vellerolu i izovellerolu (Rysunek 2).



Rysunek 2. Produkty przemiany stearovellutinalu: a.) velleral oraz b.) izovelleral

Szwedzka grupa naukowców [5] zbadała przemiany velutinalu zachodzące po naruszeniu grzyba *Lactarius vellereus* z użyciem związków znaczonego deuterem. Jednak po 30 minutach nie znaleziono nawet śladowych ilości znaczonego velutinalu, co oznacza, że przereagował on całkowicie. Estryfikacja jest sposobem ochrony velutinalu przed enzymami, aby nie ulegał on przekształceniom przed naruszeniem owocnika. Przemiany zachodzące pod wpływem systemu enzymatycznego w grzybach z rodzaju *Lactarius* badano za pomocą spektroskopii Ramana [6]. Obserwując zmiany intensywności sygnałów w czasie stwierdzono, że reakcje w mleczku są zakończone praktycznie po upływie

12–15 minut. Porównując widma Ramana soku mlecznego różnych gatunków rodzaju *Lactarius*, można w przybliżeniu określić skład próbki.

Grzyby jadalne, takie jak mleczaj rydz, są lubiane ze względu na walory smakowe. W przypadku grzybów niejadalnych uwagę zwraca ich działanie toksyczne, a nawet halucynogenne. Stwierdzono, że wiele gatunków z rodzaju *Lactarius* jest odpornych na szkodniki, a także nie są zjadane przez zwierzęta. Zauważono drażniące działanie niektórych grzybów na błonę śluzową żołądka i jelit, powodujące zatrucia. Właściwości antyfidantne seskwiterpenów zależą od ich budowy [4]. Wykazano dużo większą aktywność marazmanów i laktaranów niż izolaktaranów. Stwierdzono także słabe działanie cytotoksyczne niektórych seskwiterpenów o szkielecie guajanu występujących u gatunków jadalnych, np. *Lactarius deliciosus*. Związki te są termolabilne i nie przetrzymują procesów gotowania, nie są więc groźne dla ludzi.

Znane są doniesienia o działaniu przeciwnowotworowym gatunków z rodzaju *Lactarius*; wyciąg etanolowy z *Lactarius volemus* hamuje rozwój niektórych komórek nowotworowych *in vitro* [7]. *Lactarius necator* zawiera nekatorynę, seskwiterpen o silnym działaniu mutagennym. Stwierdzono, że większość nienasyconych aldehydów seskwiterpenowych (np. velleral, lactardial, piperdial) nie wykazuje właściwości mutagennych. Właściwości takie wykazuje jednak izovelleral i izovellerol. Metanolowy ekstrakt z *Lactarius vellereus* wykazuje natomiast właściwości przeciwmutagenne [8].

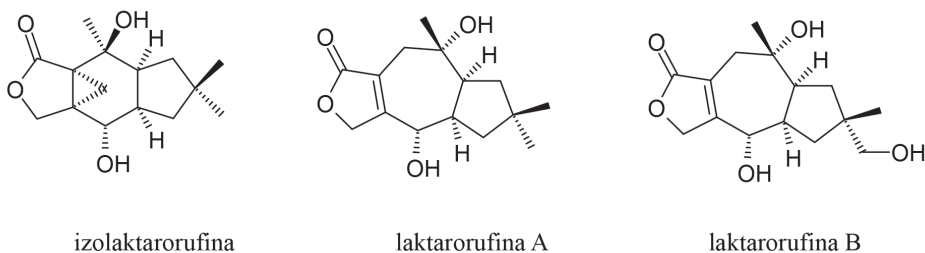
Właściwości antyoksydacyjne grzybów zależą w dużej mierze od zawartości polifenoli, a także od stadium rozwoju grzyba. W przeprowadzonych badaniach [9, 10] określano właściwości antyoksydacyjne wyciągów metanolowych z grzybów. Za działanie to odpowiedzialne są głównie pochodne fenolowe, a także obecne w niewielkich ilościach: kwas askorbinowy, beta-karoten oraz likopen (w *Lactarius piperatus*).

Gatunki z rodzaju *Lactarius* produkują nienasycone seskwiterpenowe dialdehydy, które wykazują aktywność biologiczną. Szczególnie silnie działa velleral i izovelleral, jednak ich zastosowanie jest praktycznie ograniczone, ponieważ są bardzo niestabilne i łatwo ulegają redukcji do nieaktywnych alkoholi. Stwierdzono, że *Lactarius vellereus* hamuje wiązanie lipopolisacharydu (toksyna bakteryjna) do receptora CD-14 na komórkach odpornościowych. Stwierdzono także aktywność mutagenną w odniesieniu do szczepów *Salmonella* oraz działanie na komórki nowotworowe (zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej).

Właściwości antybiotyczne, bakteriobójcze i cytostatyczne seskwiterpenów skłoniły profesora W.M. Daniewskiego i jego zespół do lepszego poznania

Bioaktywne związki grzybów z rodzaju *Lactarius*

seskwiterpenów z rodzaju *Lactarius*. Prace prowadzono w latach 70., a pierwszymi seskwiterpenami wyizolowanymi z grzybów *Lactarius rufus* były: izolaktarorufina [11], laktarorufina A [12, 13] i laktarorufina B [14] (Rysunek 3).



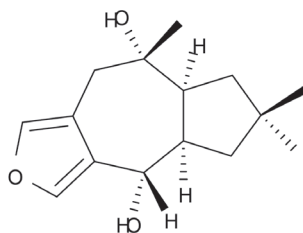
Rysunek 3. Pierwsze seskwiterpeny wyizolowane z grzybów z rodzaju *Lactarius* [10–14]

W latach 80. wyizolowano szereg interesujących biologicznie seskwiterpenów, które mają zróżnicowaną budowę szkieletu węglowego. Seskwiterpeny o szkieletach kariofylenu, guajanu, draminu spotykane są tylko w niektórych grzybach *Lactarius*. Związki o szkielecie kariofylenu wyizolowano z grzybów *Lactarius camphoratus* [15]. Szkielet guajanu jest specyficzny dla seskwiterpenów pochodzących z *Lactarius sanguiflus* [16], *Lactarius deterrimus* [17], *Lactarius indigo* [18], *Lactarius deliciosus* [19, 20,], zaś szkielet drimanu dla związków wydzielonych z *Lactarius uvidus* [21, 22]. Seskwiterpeny o szkielecie guajanu izolowano głównie z gatunków o intensywnym zabarwieniu mleczka, np. *Lactarius deliciosus* czy *Lactarius indygo*. Sekwiterpeny o szkielecie kariofylenu znaleziono tylko w grzybach gatunku *Lactarius camphoratus*, a o szkielecie drimanu w *Lactarius uvidius*. Wśród związków seskwiterpenowych występujących w grzybach są marazman, laktaran, sekolaktaran i izolaktaran. Najliczniejszą grupą seskwiterpenów wyizolowanych z grzybów rodzaju *Russula* i *Lactarius* stanowiły związki o szkielecie laktaranu. Trzy nowe związki, subvellerolaktany, wyizolowano w 2010 roku z owocników *Lactarius subvellereus* [23] razem z czterema znanymi laktaranami. Natomiast nowe badania owocników rydza *Lactarius deliciosus* pokazały obecność seskwiterpenoidów o strukturze typu azulenu [24].

Część eksperymentalna

Grzyby z gatunku *Lactarius vellereus* (mleczaj chrząstka) zebrano w lasach należących do nadleśnictwa Chojnów, tworzących Leśny Kompleks „Lasy warszawskie” w województwie mazowieckim.

Sposób izolacji bioaktywnych związków polegał na ekstrahowaniu rozdrobnionych grzybów za pomocą alkoholu etylowego. Świeżo zebrane, oczyszczone i rozdrobnione grzyby (70 kg) umieszczono w stalowym pojemniku i zalano 90% etanolem. Po miesiącu maceracji grzybów w temperaturze pokojowej, alkoholowy roztwór przesączono pod ciśnieniem przez cellit i odparowano otrzymując ekstrakt **1**. Przeprowadzono porcjami ekstrakcję **1** do chlorku metylenu, ekstrakty odparowano do sucha (ekstrakt **2**, w ilości 37,17 g). Ekstrakt ten oczyszczono na kolumnie z tlenku glinu w celu usunięcia kwasów tłuszczowych. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 23 g suchego ekstraktu **3**. Ekstrakt **3** rozpuszczono w 70% roztworze metanolu w wodzie i ekstrahowano n-heksanem. Otrzymano metanolowo-wodny ekstrakt **4a** zawierający związki o większej polarności i n-heksanowy ekstrakt **4b** zawierający związki o mniejszej polarności. Roztwory odparowano do sucha, otrzymując 10,45 g **4a**. Poprzez rozdział chromatograficzny (pod normalnym ciśnieniem w systemie gradientowym, w układzie chlorek metylenu:aceton (7:3), na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym) z ekstraktu **4a** otrzymano pięć frakcji F1-F5. Frakcje F1, F2, F3, F4 rozdzielono, ale nie identyfikowano otrzymanych związków. Frakcję F5, która stanowiła ponad 50% masy rozdzielanej mieszaniny poddano analizie na kolumnie preparatywnej. Frakcja ta zawierała furanodiol (Rysunek 4), związek seskwiterpenowy obecny w ekstrakcie w największych ilościach.



Rysunek 4. Wzór strukturalny furanodiolu

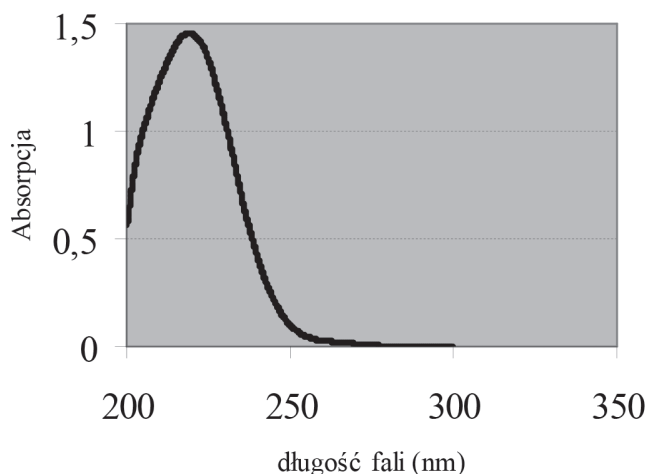
Wyniki

Z frakcji F5 otrzymano furanodiol, a także niewielkie ilości laktarorufiny A ($C_{15}H_{22}O_4$), izolaktarorufiny A ($C_{15}H_{22}O_4$) i laktarorufiny B ($C_{15}H_{22}O_5$). Strukturę otrzymanych związków potwierdzono, mierząc ich temperatury topnienia (z wyjątkiem furanodiolu, który był olejem, Tabela 1), i porównując je z danymi literaturowymi [25].

Tabela 1. Temperatura topnienia otrzymanych związków z frakcji F5

Nazwa związku	FURANODIOL	LAKTARORUFINA A	IZOLAKTARORUFINA A	LAKTARORUFINA B
	$C_{15}H_{22}O_3$	$C_{15}H_{22}O_4$	$C_{15}H_{22}O_4$	$C_{15}H_{22}O_5$
T_{top} [°C]	–	166–167°C	195°C	213°C

Wykonano dla nich widma UV (Rysunek 5) oraz badania metodą spektrometrii mas. Zarejestrowano widma 1H i ^{13}C NMR w deuterowanym metanolu (CD_3OD) oraz korelację HSQC (spektrometr Varian, 300 MHz).



Rysunek 5. Widmo UV-vis, maksimum absorpcji laktarorufiny B wynosi $\lambda_{max} = 219$ nm

Z 70 kg grzybów otrzymano 3,98 g furanodiolu, który stanowił 76% frakcji F5. Wydajność izolacji furanodiolu wyniosła 0,0057% (masa otrzymanego związku/masa grzybów*100%). Mała wydajność procesu izolacji spowodowana jest niewielką zawartością stearovelutinalu, estryfikowanego prekursora

w owocniku. Należy też pamiętać, że powstałe po uszkodzeniu grzyba seskwiterpeny nie przechodzą całkowicie do etanolu. Znacznie większą wydajność można by uzyskać, izolując seskwiterpeny bezpośrednio z soku mlecznego, jednak jego zebranie sprawia większe trudności.

Podsumowanie

Grzyby z gatunku *Lactarius* (mleczaj) występują powszechnie w polskich lasach; zbiera się je późną jesienią, w październiku. Popularnym grzybem jadalnym jest mleczaj rydz (*Lactarius deliciosus*). W ostatnich latach ukazuje się dużo prac na temat składu chemicznego grzybów, zarówno jadalnych, jak i niejadalnych. Pokazują one, że w owocnikach grzybów jest wiele biologicznie aktywnych związków. Z punktu widzenia farmacji i medycyny, szczególnie interesujące są polisacharydy oraz seskwiterpeny. Mleczny sok pojawiający się w momencie uszkodzenia grzyba zawiera składniki, które stanowią mechanizm obronny. Seskwiterpenoidy obecne w soku i w owocnikach są warte szczegółowych badań chemicznych, biochemicznych i farmakologicznych. Niejadalne grzyby *Lactarius vellereus* mogą być źródłem potencjalnych substancji leczniczych oraz związków wyjściowych do dalszych syntez. Głównym związkiem otrzymanym z grzybów był furanodiol (ok. 4 g), ilości laktatororufin były poniżej 0,1 g. Ze względu na małą ilość laktatororufin w surowcach naturalnych warto podjąć próby otrzymania ich drogą syntezy poprzez utlenianie związków furanowych (furanodiolu) do odpowiednich laktonów.

Literatura

- [1] Kalač P., Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review, *Food Chemistry*, 2009, 113, s. 9–16.
- [2] Kalač P., A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms, *Journal Science Food Agriculture*, 2013, 93(2) s. 209–218.
- [3] Mattila P., Lampi A.M., Ronkainen R., Toivo J., Piironen V., Sterol and vitamin D₂ contents of wild and cultivated mushroom, *Food Chemistry*, 2002, 76, s. 293–298.
- [4] Daniewski W.M., Gumułka M., Przesmycka D., Ptaszyńska K., Błoszyk E., Drożdż B., Sesquiterpenes of *Lactarius* origin, antifeedant structure-activity relationship, *Phytochemistry*, 1995, 38 (5), s. 1161–1168.
- [5] Hansson T., Pang Z., Sterner O., The conversion of [12-³H]-labelled velutinal in injured fruit bodies of *Lactarius vellereus*. Further insight into the biosynthesis of Russulaceae sesquiterpenes, *Acta Chemica Scandinavica*, 1993, 47, s. 403–405.
- [6] De Gussem K., Verbeke A., Vandenaabee P., De Gelder J., Moens L., Raman spectroscopic monitoring of *Lactarius latex*, *Phytochemistry*, 2006, 67, s. 2580–2589.
- [7] Yue J.M., Chen S.N., Lin Z.W., Sun H.D., Sterols from fungus *Lactarius volemus*, *Phytochemistry*, 2001, 56, s. 801–806.

- [8] Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Jülich W.D., The pharmacological potential of mushrooms, Oxford University Press 2005.
- [9] Sirikurkcu C., Tepe B., Yamac M., Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the central Anatolia, Eskisehir – Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinu*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*, *Bioresource Technology*, 2008, 99, s. 6651–6655.
- [10] Barros L., Baptista P., Ferreira I.C.F.R., Effects of fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays, *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45, s.1731–1737.
- [11] Daniewski W.M., Kocór M., Thoren S., Isolactarorufin, a novel tetracyclic sesquiterpene lactone from *Lactarius rufus*, *Polish Journal of Chemistry*, 1978, 52, s. 561–572.
- [12] Daniewski W.M., Kocór M., Isolation and structure of some new sesquiterpenes from *Lactarius rufus*, *Bulletin de l'Academie Polonaise de Sciences, Serie des Sciences Chimiques*, 1970, 18(10), s. 585–589.
- [13] Baranowska E., Daniewski W.M., Mass spectrometric investigations of lactarorufin A and its derivatives, *Bulletin de l'Academie Polonaise de Sciences, Serie des Sciences Chimiques*, 1972, 20(4), s. 313–319.
- [14] Daniewski W.M., Kocór M., Żółtowska B., Structure of lactarorufin B., *Bulletin de l'Academie Polonaise de Sciences, Serie des Sciences Chimiques*, 1973, 21(11), s. 785–791.
- [15] Daniewski W.M., Grieco P.A., Huffman J.C., Rymkiewicz A., Wawrzun A., Isolation of 12-hydroxycaryophyllene-4,5-oxide a sesquiterpene from *Lactarius camphoratus*, *Phytochemistry*, 1981, 20(12), s. 2733–2734.
- [16] De Rosa S., De Stefano S., Guaiane sesquiterpene from *Lactarius sanguifluus*, *Phytochemistry*, 1987, 26(7), s. 2007–2009.
- [17] Harmon A.D., Weisgraber K.H., Weiss U., Preformed azulene pigments of *Lactarius indigo* (Schw.) Fries (Russulaceae, Basidiomycetes), *Experientia*, 1980, 36(1), s. 54–56.
- [18] Koul S.K., Taneya S.C., Ibrahim S.P., Dhar K.L., Atal C.K., A C-formylated azulene from *Lactarius deterrimus*, *Phytochemistry*, 1985, 24(1), s. 181–182.
- [19] Bergendorff O., Sterner O., The sesquiterpenes of *Lactarius deliciosus* and *Lactarius deterrimus*, *Phytochemistry*, 1988, 27(1), s. 97–100.
- [20] Anke H., Bergendorff O., Sterner O., Assays of the biological activities of guaiane sesquiterpenoids isolated from the fruit bodies of edible *Lactarius* species, *Food and Chemical Toxicology*, 1989, 27(6), s. 393–397.
- [21] De Bernardi M., Mellerio G., Vidari G., Vita-Finzi P., Fronza G., Fungal metabolites. Part 5. Uvidins, new drimane sesquiterpenes from *Lactarius uvidus* Fries, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1980, s. 221–226.
- [22] De Bernardi M., Mellerio G., Vidari G., Vita-Finzi P., Fronza G., Fungal metabolites. Part 15. Structure and chemical correlations of uvidin C, D, and E, new drimane sesquiterpenes from *Lactarius uvidus* Fries, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1983, s. 2739–2743.
- [23] Kim K.H., Noh H.J., Choi S.U., Park K.M., Seok S.J., Lee K.R., Lactarane sesquiterpenoids from *Lactarius subvellereus* and their cytotoxicity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20(18), s. 5385–5388.
- [24] Feussi Tala M., Qin J., Ndongo J.T., Laatsch H., New Azulene-Type Sesquiterpenoids from the Fruiting Bodies of *Lactarius deliciosus*, *Natural Products and Bioprospecting*, 2017, 7(3), s. 269–273.
- [25] Skibicki P., Składniki grzyba *Lactarius mitissimus*, *Polska Akademia Nauk, Instytut Chemii Organicznej, Warszawa 1990*.

Do cytowania:

Marszałek R., Paradowska K., Wawer I., Bioaktywne związki grzybów z rodzaju *Lactarius*, *Herbalism*, 2018, 1 (4), s. 65–73