



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

**Departamento de Biología Celular, Histología y
Farmacología**

TESIS DOCTORAL:

**“Extracción y caracterización de polisacáridos y
estudio del perfil de compuestos volátiles en hongos
comestibles”**

Presentada por Irene Palacios Romero para optar al grado
de

Doctora por la **Universidad de Valladolid**

Dirigida por: **Dña. María Fernanda Fernández León, D. Álvaro
Ramos Monreal y D. Tomás Girbés Juan.**

Valladolid 2015

D. Tomás Girbés Juan, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, Dña. María Fernanda Fernández León y D. Álvaro Ramos Monreal, Investigadores en el Centro Para la Calidad de los Alimentos de Soria (INIA), directores de esta Tesis Doctoral, certifican que el trabajo realizado por Dña. Irene Palacios Romero puede ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 1 de octubre de 2015

Fdo.: Tomás Girbés Juan

Fdo.: María Fernanda Fernández León

Fdo.: Álvaro Ramos Monreal

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación y al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la concesión de la beca de investigación FPI-INIA-2008, con la que he podido desarrollar mi Tesis Doctoral en el Centro para la Calidad de los Alimentos de Soria (CCA-Soria).

Agradecer a mis directores de Tesis, en especial a la Dra. María Fernanda Fernández León, directora y amiga, y a los Drs. Álvaro Ramos Monreal y Tomás Girbés Juan, por creer en mí y en este proyecto.

A todo el personal del Centro para la Calidad de los Alimentos de Soria, en especial a José Manuel, Félix, Laura, Miguel, Noelia y Matilde, sin ellos esto no habría sido posible.

A mi "Gabinete de crisis", Anuski, Ana Rana, María, Aurora, Eva, Carmen, Jesús y Belén, por estar siempre ahí. Os quiero.

A Ana y Jesús, y a sus pequeños retoños Jorge y Jaime, por estar ahí a pesar de mis ausencias. A Gabi y Pablo, por la amistad que nos une, por todos los buenos ratos que hemos pasado y por los que nos quedan. A mi punto verde.

A Naria, por aparecer en mi vida. *"Yo siempre more"*.

A Javi, por ayudarme a levantarme y saber siempre cómo hacerme reír.

A María, por querer tanto a Mariano, por estar ahí y por acompañarme todos estos años con una sonrisa. A mis sorianos y sorianas, por ser como son, os llevaré siempre en el corazón. A mis perrunas, por tener siempre una sonrisa preparada y hacer de nuestros paseos una maravillosa vía de escape.

A Jose, por todos los momentos que hemos pasado juntos, por su apoyo a pesar de las circunstancias y porque no se me ocurre mejor padre compartido para Mariano. A toda la familia Martínez Manzano, por ser parte de lo que soy, a todos muchas gracias.

A Carmelo Romero por apoyarme sin condición, a su hermano Arturo, por brindarme su ayuda, y en general a toda la familia Moro y Romero, por apoyarme y quererme. A Carlos, por su compañía en este proyecto común que ha sido Soria y la Tesis, muchas gracias de corazón.

A todas aquellas personas que han aparecido en mi vida a lo largo de estos años y me han ayudado sin saberlo a superar este bache con éxito, gracias por todo.

A mis tíos Antonio, José, Julia, Aurora, Mari Juli y Rafael, a todos mis primos, Javier, Elena, Aurora, Loreto, Lourdes, Rafael, Sergio, Nuria y Elvis, y a todos sus respectivos. A mi familia "Romereña", Beli y Jose María, Rosa María y Juan, Merchi y Pachi, María José y Florencio, a todos sus hijos, y en especial a los que ya no están, a mi Tía Rosa y mi Padrino Manolo.

A mis hermanos Antonio, Lupe y Emilio, a mis cuñadas Pilar e Isa y a mis sobrinos Sofía, Vera y Andrés, porque hacéis que la palabra familia tenga significado.

A mi madre, por aguantarme, por sufrirme, por cuidarme, por quererme, por ser MADRE con mayúsculas, porque si no hubiera estado aquí yo nunca lo habría conseguido y, sobretodo, porque la quiero.

Por último a mi padre, porque está presente en todo lo que hago y porque sé que se sentiría orgulloso de mi.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS EN REVISTAS

Los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a los trabajos siguientes:

- Irene Palacios Romero, Álvaro Ramos Monreal, Tomás Girbés Juan, María Fernanda Fernández León. "Caracterización de dos nuevos polisacáridos obtenidos a partir de la seta comestible *Lactarius deliciosus*". **Nutr. clín. diet. hosp. 2015; 35 (supl. 1): 219.**
- Irene Palacios Romero, Álvaro Ramos Monreal, Tomás Girbés Juan, María Fernanda Fernández León. "Caracterización de un nuevo complejo polisacárido-proteína obtenido a partir de la seta comestible *Boletus edulis*". **Nutr. clín. diet. hosp. 2015; 35 (supl. 1): 220.**
- Irene Palacios Romero, Álvaro Ramos Monreal, Tomás Girbés Juan, María Fernanda Fernández León. "The volatile compounds profile of four wild edible mushrooms". En realización para la revista **Journal of Functional Foods, (2016).**
- Irene Palacios Romero, Álvaro Ramos Monreal, Tomás Girbés Juan, María Fernanda Fernández León. "Changes in the volatile organic compounds profile of two edible mushrooms after freeze-drying treatment". En realización para la revista **Journal of Functional Foods, (2016).**

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Las técnicas utilizadas han permitido la presentación de una comunicación a congreso:

- XV Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas afines-SECYTA 2015. VII Reunión Científica de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas-SEEM 2015. 27-30 de octubre del 2015, Castellón (España).
 - Póster. Irene Palacios Romero, Álvaro Ramos Monreal, Tomás Girbés Juan, María Fernanda Fernández León. "The volatile compounds profile of four wild edible mushrooms"
 - Póster. Irene Palacios Romero, Álvaro Ramos Monreal, Tomás Girbés Juan, María Fernanda Fernández León. "Changes in the volatile organic compounds profile of two edible mushrooms after freeze-drying treatment".

- XIX Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica, 18-19 de Febrero del 2015, Madrid (España).
 - Póster. Irene Palacios Romero, Álvaro Ramos Monreal, Tomás Girbés Juan, María Fernanda Fernández León. "Caracterización de dos nuevos polisacáridos obtenidos a partir de la seta comestible *Lactarius deliciosus*".
 - Póster. Irene Palacios Romero, Álvaro Ramos Monreal, Tomás Girbés Juan, María Fernanda Fernández León. "Caracterización de un nuevo complejo polisacárido-proteína obtenido a partir de la seta comestible *Boletus edulis*".
- 26th International Carbohydrate Symposium (ICS), 22-27 de julio del 2012, Madrid (España).
 - Póster. Irene Palacios, Miguel Lozano, Matilde D'Arrigo, J. Alfredo Martínez, Ana García-Lafuente, Eva Guillamón, Ana Villares. "Isolation of novel water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Cantharellus cibarius*".
- 5th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH), 17-20 de octubre del 2011, Sitges (España).
 - Póster. Carlos Moro, Irene Palacios, Matilde D'Arrigo, Eva Guillamón, Ana Villares, J. Alfredo Martínez, Ana García-Lafuente. "Anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264".
- The 6th International Medicinal Mushroom Conference, 29-29 de septiembre del 2011, Zagreb (Croacia).
 - Poster. Irene Palacios, Miguel Lozano, Matilde D'Arrigo, J. Alfredo Martínez, Ana García-Lafuente, Eva Guillamón, Ana Villares. "Isolation of a water-soluble polysaccharide from the King Bolete, *Boletus edulis*".
- 10th International Functional food and Nutraceuticals Conference, 2-8 de septiembre del 2010, Praga (República Checa).
 - Comunicación oral. Irene Palacios, Miguel Lozano, Ana García-Lafuente, Mauricio A. Rogtasno, Matilde D'Arrigo, J. Alfredo Martínez, Eva Guillamón, Ana Villares. "Natural Occurrence of Phenolic Compounds in Edible Mushrooms".

- Póster. Irene Palacios, Miguel Lozano, Carlos Moro, Matilde D'Arrigo, Mauricio A. Rogtasno, J. Alfredo Martínez, Ana García-Lafuente, Eva Guillamón, Ana Villares. "Isolation of Polysaccharides from the Fruiting Bodies of Edible Mushrooms".

ABREVIATURAS

AAPMs. Acetatos de Alditol Parcialmente Metilados

BeFA. Fracción Alcalina de *B. edulis*

BeFAP. Fracción Alcalina de *B. edulis* hidrolizada con Pronasa E

BeFC. Fracción Caliente de *B. edulis*

BeFCP. Fracción Caliente de *B. edulis* hidrolizada con Pronasa E

BeFF. Fracción Fría de *B. edulis*

BeFFP. Fracción Fría de *B. edulis* hidrolizada con Pronasa E

BSA. Albúmina de Suero Bovina

CcFA. Fracción Alcalina de *C. cibarius*

CcFAP. Fracción Alcalina de *C. cibarius* hidrolizada con Pronasa E

CcFC. Fracción Caliente de *C. cibarius*

CcFCP. Fracción Caliente de *C. cibarius* hidrolizada con Pronasa E

CcFF. Fracción Fría de *C. cibarius*

CcFFP. Fracción Fría de *C. cibarius* hidrolizada con Pronasa E

CgFA. Fracción Alcalina de *C. gambosa*

CgFAP. Fracción Alcalina de *C. gambosa* hidrolizada con Pronasa E

CgFC. Fracción Caliente de *C. gambosa*

CgFCP. Fracción Caliente de *C. gambosa* hidrolizada con Pronasa E

CgFF. Fracción Fría de *C. gambosa*

CgFFP. Fracción Fría de *C. gambosa* hidrolizada con Pronasa E

COVs. Compuestos Orgánicos Volátiles

Da. Dalton

DMSO Dimetilsulfóxido

EI. Impacto Electrónico ("*Electron Impact*")

eV. Electronvoltio

FA. Fracción Alcalina

FC. Fracción Caliente

FF. Fracción Fría

GC-MS. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas ("*Gas Chromatography-Mas Spectrometry*")

GR. Grado de Ramificación

HPLC. Cromatografía Líquida de Alta Resolución ("*High Performance Liquid Chromatography*")

HPSEC. Cromatografía de Exclusión Molecular de Alta Resolución ("*High Performance Size Exclusion Chromatography*")

HS. Espacio de Cabeza ("*Head Space*")

IG. Índice Glucémico

KDa. Kilodalton

LdFA. Fracción Alcalina de *L. deliciosus*

LdFAP. Fracción Alcalina de *L. deliciosus* hidrolizada con Pronasa E

LdFC. Fracción Caliente de *L. deliciosus*

LdFCP. Fracción Caliente de *L. deliciosus* hidrolizada con Pronasa E

LdFF. Fracción Fría de *L. deliciosus*

LdFFP. Fracción Fría de *L. deliciosus* hidrolizada con Pronasa E

Log10. Logaritmo neperiano en base 10

M. Molar

MeOH. Hidróxido Sódico

MRBs. Modificadores de la Respuesta Biológica

NaBH₄. Bromuro de Sodio

NaN₃. Azida

NaNO₃. Nitrato de Sodio

NIST. Instituto Nacional de Estándares y Tecnología ("*National Institute of Standards and Technology*")

nm. Nanómetro

psi. Libra-fuerza por pulgada cuadrada ("*Pounds-force per square inch*")

PAGE. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida ("*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*")

PAS. Ácido Peryódico de Schiff

PSA. Persulfato de Amonio

RID. Detector de Índice de Refracción ("*Refraction Index Detector*")

rpm. Revoluciones por minuto

SDS. Sodio Dodecil Sulfato

T.mol. Tamaño Molecular

TCA. Ácido Tricloroacético

TEMED. Tetrametiletilendiamina

TFA. Ácido Trifluoroacético

TR. Tiempo de Retención

tr. Trazas

UV-Visible. Ultravioleta-Visible

VIH-I. Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo I

λ_{max} . Longitud de onda de absorción máxima

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS	7
2.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS SETAS	9
2.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE LAS SETAS	10
2.3. FORMAS DE VIDA DE LOS HONGOS	11
2.4. CLASIFICACIÓN Y BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS HONGOS SOMETIDOS A ESTUDIO	12
3. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS HONGOS COMESTIBLES EN CASTILLA Y LEÓN	20
4. PROPIEDADES DE LOS HONGOS	22
4.1. INTRODUCCIÓN.....	22
4.2. PROPIEDADES NUTRICIONALES	24
4.2.1. <i>Humedad, cenizas y aporte energético</i>	25
4.2.2. <i>Contenido en proteínas</i>	25
4.2.3. <i>Contenido en grasas</i>	26
4.2.4. <i>Contenido en vitaminas</i>	26
4.2.5. <i>Contenido en minerales</i>	27
4.2.6. <i>Contenido en carbohidratos y fibra alimentaria</i>	27
4.3. PROPIEDADES MEDICINALES	28
4.3.1. <i>Compuestos de hongos con propiedades bioactivas</i>	28
4.3.1.1. <i>Polisacáridos</i>	28
4.3.1.2. <i>Complejos polisacárido-proteína</i>	30
4.3.1.3. <i>Otros compuestos bioactivos</i>	30
4.3.2. <i>Propiedades medicinales de los hongos</i>	31
4.3.2.1. <i>Actividad antitumoral e inmunomoduladora</i>	31
4.3.2.2. <i>Actividad antimicrobiana</i>	33
4.3.2.3. <i>Actividad antiviral</i>	34
4.3.2.4. <i>Efecto hipocolesterolémico, hipoglucémico y prebiótico</i>	34
4.3.2.5. <i>Efecto antioxidante</i>	35
4.3.3. <i>Relación estructura y actividad biológica de los polisacáridos de hongos</i>	35

5. COMPUESTO ORGÁNICOS VOLÁTILES DE HONGOS COMESTIBLES	36
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	41
CAPÍTULO I: Aislamiento y extracción de polisacáridos de hongos comestibles	45
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. MATERIAL BIOLÓGICO Y REACTIVOS	47
2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS A PARTIR DE HONGOS COMESTIBLES.....	48
3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE GLICOPROTEÍNAS	51
4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	51
5. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES.....	52
6. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MOLECULAR.....	54
6.1. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR DE ALTA RESOLUCIÓN (HPSEC) .	54
6.2. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MOLECULAR	55
7. IDENTIFICACIÓN DE MONÓMEROS DE LA CADENA POLISACARÍDICA	57
7.1. HIDRÓLISIS ÁCIDA	57
7.2. DERIVATIZACIÓN DE MONOSACÁRIDOS A ACETATOS DE ALDITOL.....	57
7.3. CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)	58
8. ANÁLISIS ESTRUCTURAL	59
8.1. ANÁLISIS DE METILACIÓN	59
8.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)	60
8.3. CONFORMACIÓN ESTRUCTURAL EN TRIPLE HÉLICE (ROJO CONGO)	61
9. DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS POLISACÁRIDO-PROTEÍNA MEDIANTE SDS- PAGE	63
9.1. ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	63
9.2. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS Y COMPLEJOS POLISACÁRIDO-PROTEÍNA EN GELES SDS-PAGE	66
9.2.1. <i>Detección de proteínas con Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	66
9.2.2. <i>Detección de polisacáridos mediante la reacción del Ácido peryódico- Reactivo de Schiff</i>	66
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
RESULTADOS	69
1. RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES	69
2. PROTEÍNAS TOTALES EN LOS EXTRACTOS.....	69
3. CARBOHIDRATOS TOTALES.....	70

4. TAMAÑO MOLECULAR	71
4.1. <i>Boletus edulis</i>	71
4.2. <i>Lactarius deliciosus</i>	73
4.3. <i>Cantharellus cibarius</i>	76
4.4. <i>Calocybe gambosa</i>	77
4.5. COMPARACIÓN DE LOS TAMAÑOS MOLECULARES ENTRE ESPECIES.....	78
5. MONÓMEROS CONSTITUYENTES DE LA CADENA POLISACARÍDICA	79
6. ANÁLISIS ESTRUCTURAL	83
6.1. DETERMINACIÓN DE ENLACES Y RAMIFICACIONES MEDIANTE ANÁLISIS DE METILACIÓN	83
6.1.1. <i>Boletus edulis</i>	83
6.1.2. <i>Lactarius deliciosus</i>	85
6.1.3. <i>Cantharellus cibarius</i>	88
6.1.4. <i>Calocybe gambosa</i>	90
6.2. DETERMINACIÓN DE LA CONFORMACIÓN TRIPLE HÉLICE CON ROJO CONGO	91
6.2.1. <i>Boletus edulis</i>	91
6.2.2. <i>Lactarius deliciosus</i>	92
6.2.3. <i>Cantharellus cibarius</i>	94
6.2.4. <i>Calocybe gambosa</i>	96
7. DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS POLISACÁRIDO-PROTEÍNA.....	98
7.1. COMPLEJO POLISACÁRIDO-PROTEÍNA DETECTADO EN <i>BeFA</i> DE <i>B. EDULIS</i>	99
DISCUSIÓN	101
1. DISCUSIÓN GENERAL.....	101
2. <i>Boletus edulis</i>	105
3. <i>Lactarius deliciosus</i>	107
4. <i>Cantharellus cibarius</i>	109
5. <i>Calocybe gambosa</i>	112
CONCLUSIONES.....	115
<u>CAPÍTULO II: Perfil de compuestos volátiles presentes en hongos comestibles</u>	117
MATERIALES Y MÉTODOS.....	119
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	119
2. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES POR ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICO Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	120
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	122

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	123
1. GENERAL.....	123
2. POR FAMILIAS.....	128
2.1. ALCOHOLES	128
2.2. CETONAS	130
2.3. ALDEHÍDOS.....	133
2.4. COMPUESTOS DE AZUFRE Y HETEROCÍCLICOS	138
2.5. HIDROCARBUROS.....	140
2.6. ÁCIDOS, ÉSTERES Y TERPENOS.....	142
3. COMPUESTOS C8.....	144
4. PRINCIPALES COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN HONGOS COMESTIBLES .	146
5. CROMATOGRAMAS.....	150
CONCLUSIONES.....	157
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>.....	159

RESUMEN

Los hongos comestibles han sido muy apreciados desde la antigüedad por su valor culinario, nutricional y medicinal. Sus característicos sabor y aroma han hecho de ellos un elemento muy valorado en la cocina tradicional y moderna. Nutricionalmente hablando constituyen una buena fuente de proteínas y de fibra alimentaria, además de poseer un bajo contenido en grasas y de ser una buena fuente de vitaminas, minerales y compuestos antioxidantes. Entre sus propiedades medicinales es interesante destacar su capacidad antitumoral, antioxidante, inmunomoduladora y antiinflamatoria.

Por tanto los hongos son una fuente importante de compuestos medicinales. Unos de los compuestos con actividad biológica más abundantes y estudiados en hongos son los polisacáridos, y concretamente el grupo de los β -glucanos. Entre sus actividades bioactivas destacan principalmente la antioxidante, antitumoral e inmunomoduladora, las cuales parecen estar fuertemente influenciada por sus características químicas y conformacionales.

Los hongos frescos son productos perecederos con una vida media muy limitada, por lo que es fundamental el uso de tratamientos de conservación adecuados como la liofilización. El característico olor a hongo comprende una serie de compuestos orgánicos volátiles (COVs), entre los que destacan los compuestos derivados de 8 carbonos como los alcoholes 1-octen-3-ol y 3-octanol, y las cetonas 1-octen-3-ona y 3-octanona. Los COVs de hongos, aparte de ser responsables de su apreciado olor y sabor, poseen un importante papel en los ecosistemas naturales, actuando como señales intra- e intercelulares. Son también de gran utilidad en quimiotaxonomía y como agentes de biocontrol gracias a sus propiedades fungicidas y antimicrobianas.

Así, en esta tesis se han extraído y caracterizado polisacáridos de cuatro especies de hongos silvestres comestibles (*Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Cantharellus cibarius* y *Calocybe gambosa*) recolectadas todas en la provincia de Soria. Para la obtención de los polisacáridos se realizaron tres extracciones acuosas consecutivas, a temperatura ambiente, a 100°C y en medio básico a 100°C. La pureza y tamaño molecular se estudió mediante cromatografía de exclusión molecular (HPSEC), mientras que la composición en azúcares y el tipo de enlaces presentes en la cadena fueron dilucidados mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). La conformación estructural en triple hélice se determinó mediante la unión específica con el colorante Rojo-Congo. En función del tipo de extracción y de la especie de hongo analizada se obtuvieron diferentes polisacáridos, en su mayoría glucanos

además de varios glucomananos y un complejo polisacárido-proteína, todos ellos con algún grado de ramificación y diferentes tamaños moleculares. La mayor parte de los polisacáridos extraídos presentaron conformación terciaria en triple hélice.

Por otro lado, se ha estudiado el perfil de COVs de seis especies de hongos comestibles (*Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Calocybe gambosa*, *Hygrophorus marzuolus*, *Cantharellus cibarius* y *Pleurotus ostreatus*) todas recolectadas en la provincia de Soria, excepto *P. ostreatus* que fue adquirida en un supermercado local. Se ha estudiado igualmente el cambio sufrido en el perfil de COVs tras el tratamiento de liofilización. Las sustancias volátiles presentes en las muestras fueron evaluadas mediante la técnica espacio de cabeza estático (Static Head-Space, HS) combinada con cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). Este análisis nos permitió la identificación tentativa de 46 compuestos, incluyendo alcoholes, cetonas, aldehídos, compuestos heterocíclicos e hidrocarburos, entre otros. Se observó que el perfil de COVs variaba enormemente de una especie de hongo a otra. Como era de esperar, tras el proceso de liofilización se encontraron cambios significativos en el perfil de COVs, detectándose en todos los casos un aumento en la proporción de aldehídos y en general una disminución en el contenido de alcoholes, cetonas y compuestos heterocíclicos.

ABSTRACT

Since ancient times, edible mushrooms have been highly appreciated for their culinary value. Their characteristic taste and odour made them a greatly valued component in traditional and modern cooking. Nutritionally speaking, they are a good source of proteins and dietary fibre, they have a high fat content and they are a great vitamins, minerals and antioxidant compounds source. Among their medicinal properties, it is interesting to emphasize their antitumor, antioxidant, immunomodulatory and anti-inflammatory capacity.

Mushrooms are therefore an important source of medicinal compounds. One of the most abundant compounds with biological activity in mushrooms, and among the most studied ones, are polysaccharides, and specifically the β -glucans group. Among their bioactive activities, antioxidant, antitumoral and immunomodulatory ones stand out most. They seem to be deeply influenced by their chemical and conformational characteristics.

Fresh mushrooms are perishable products with a very limited lifetime, and that's why the application of proper conservation processes as lyophilization is crucial. The distinct mushroom odour includes several volatile organic compounds (VOCs), among which 8-carbon derived compounds stand out, like alcohols 1-Octen-3-ol and 3-Octanol, and ketones 1-Octen-3-ona and 3-Octanona. Mushrooms VOCs, besides being responsible for their appreciated odour and taste, play an important role in natural ecosystems, acting as intra- and intercellular signalling. They are of great utility in chemotaxonomy too, and as biocontrol agents thanks to their fungicide and antimicrobial properties.

Thus, in this thesis, we have extracted and characterized polysaccharides from four species of edible wild mushrooms (*Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Cantharellus cibarius* and *Calocybe gambosa*), all of them harvested in the province of Soria, Spain. For the extraction of polysaccharides, three consecutive aqueous extractions were carried out, at ambient temperature, at 100°C and at 100°C in alkaline solution. Molecular purity and size were analyzed through High Pressure Size Exclusion Chromatography (HPSEC), while sugar composition and the type of bond present in the chain were elucidated through Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Triple-helix structural conformation was determined through Congo red dye specific binding. Depending on the extraction type and the analyzed mushroom species, different polysaccharides were obtained, most of them glucans, as well as several glucomannans and one polysaccharide-protein complex, all of them with some degree of branching and

different molecular sizes. Most extracted polysaccharides showed triple-helix tertiary conformation.

On the other hand, we analysed the VOCs profiles of six edible mushroom species (*Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Calocybe gambosa*, *Hygrophorus marzuolus*, *Cantharellus cibarius* and *Pleurotus ostreatus*), all of them harvested in the province of Soria, except for *P. ostreatus*, acquired in a local supermarket. We also analyzed the change that VOCs profile underwent after lyophilization process. Volatile compounds present in the samples were evaluated through Static Head-Space technique (HS), combined with Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). This analysis allowed us to the tentative identification of 46 compounds, including alcohols, ketones, aldehydes, heterocyclic compounds and hydrocarbons, among others. A huge variation in the VOCs profile from a mushroom species to another was observed. As expected, after lyophilization process significant changes in the VOCs profile were found, an increase of the aldehydes' proportion was detected in all instances, as well as an overall reduction of alcohol, ketone and heterocyclic compounds' content.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

Las evidencias fósiles ponen de manifiesto que los hongos han estado presentes en nuestro planeta desde hace al menos 300 millones de años. Probablemente ya en la prehistoria los humanos recolectaban setas silvestres como fuente de alimento y posiblemente con propósitos medicinales. Civilizaciones como la griega, egipcia, romana, china y mexicana ya apreciaban los hongos como productos gourmet, probablemente conocían sobre su valor terapéutico y las usaban frecuentemente en ceremonias religiosas [1]. El importante papel de los hongos en la historia ya quedó evidenciado en la Biblia, donde la trufa del desierto o *Terfezia arnenari*, es descrita como “el pan del cielo” o “el maná de los israelíes [2].

En los últimos años los hongos han suscitado un enorme interés, no sólo por su característico sabor y aroma tan apreciados en la cocina, sino también por sus cualidades nutricionales y por ser una importante fuente de compuestos biológicamente activos con gran valor medicinal [3]. La actividad de los hongos es además esencial en el correcto funcionamiento de los ecosistemas, siendo los responsables, junto con las bacterias, de la descomposición de toda la materia orgánica. Su asociación con las raíces vegetales, formando micorrizas, es muchas veces imprescindible para la supervivencia de determinadas plantas en ecosistemas naturales [4].

2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS

Los hongos constituyen un Reino independiente del animal y el vegetal, el Reino Fungi. Son organismos cosmopolitas, eucarióticos, normalmente plurinucleados y se reproducen por esporas. Su nutrición es heterótrofa y se alimentan de forma característica por absorción, mediante la liberación de enzimas digestivas al exterior y posterior absorción de los productos de digestión. Aunque no son organismos fotosintéticos, en muchas ocasiones necesitan la luz para la producción del cuerpo fructífero o seta.

Como **seta** podemos definir a “aquellos hongos macroscópicos con un cuerpo fructífero productor de esporas que puede encontrarse bien sobre la tierra (epigeo) o bajo tierra (hipogeo), y que es lo suficientemente grande como para poder ser observado a simple vista y recolectado a mano” [5]. Se ha estimado que existen más de 1.5 millones de especies de hongos de los cuales se conoce aproximadamente el 1% [6]. Dentro de este enorme número se calcula que hay unas 140.000 especies de “setas”, de las cuales sólo se conoce un 10%. Dentro de este 10% se considera que sólo un 50% tienen cierto grado de comestibilidad, de las cuales más de 2.000 son seguras y 700 poseen compuestos con propiedades bioactivas significativas [7].

La parte vegetativa del hongo o talo suele ser filamentosa, formada por hifas microscópicas cuyo conjunto recibe el nombre de micelio. Las hifas pueden ser septadas (con tabiques internos) o cenobióticas (carecen de ellos) y están recubiertas de una pared celular compuesta fundamentalmente por quitina, además de componentes como la celulosa y otros polisacáridos. A lo que llamamos seta o carpóforo es en realidad el cuerpo fructífero del hongo, formado como resultado del crecimiento diferenciado y del entrelazamiento de las hifas, junto con una rápida expansión debida a la gran absorción de agua. Las setas pueden ser tanto epígeas, creciendo en superficie, o hipógeas, se desarrollan bajo tierra como es el caso de las trufas. En la naturaleza las setas tienen la principal función de producir, madurar y diseminar las esporas formadas mediante reproducción sexual, con el fin de asegurar la supervivencia del hongo a largo plazo. Su reproducción puede ser también asexual, la cual, aunque no proporciona variabilidad genética, es mucho más rápida y la más habitual en hongos, aunque con frecuencia alternan ciclos sexuales y asexuales (FIGURA 1) [4]. Las setas pueden presentar una gran diversidad de formas, tamaños, colores y texturas. Pueden variar desde hongos microscópicos unicelulares hasta micelios como el de la especie *Armillaria* que ocupa un área de más de 12 ha en Norteamérica [4].

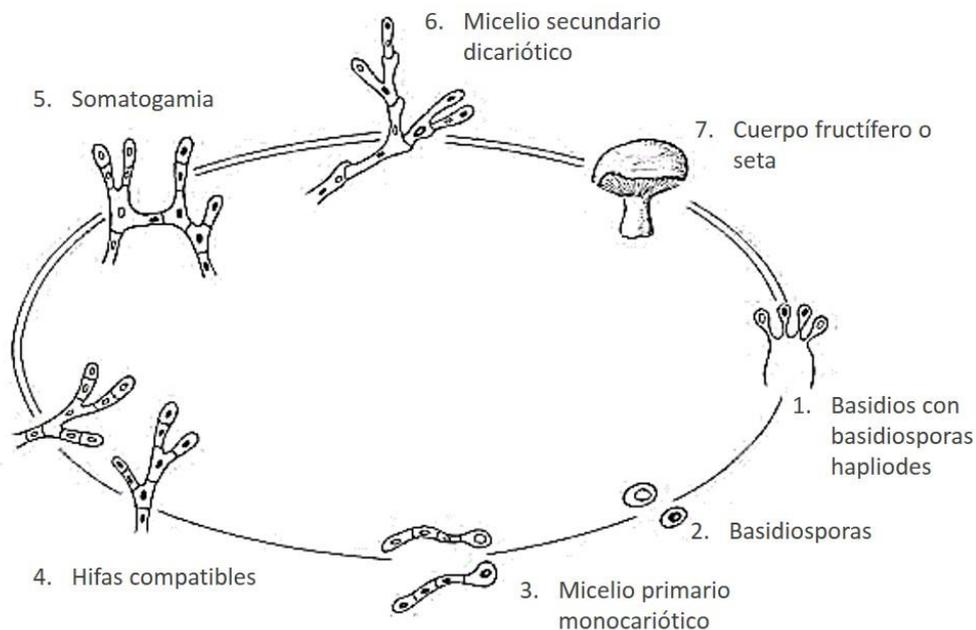


FIGURA 1. Ciclo de desarrollo típico de un Basidiomicete. El ciclo comienza con la germinación de las esporas haploides o basidiosporas (1 y 2) para dar lugar a un micelio primario monocariótico (un solo núcleo por célula) (3). Tras esta fase se produce la somatogamia o fusión de hifas compatibles (4 y 5) y se obtiene un micelio secundario dicariótico (dos núcleos por célula) (6), que da lugar a los cuerpos fructíferos o setas (7) [4].

2.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS SETAS

A partir del micelio secundario subterráneo se forma la seta, la cual puede adoptar formas muy diversas: globosas, coraliformes, claviformes, en copa, etc. La estructura de las setas es un elemento taxonómico muy importante a la hora de su clasificación (FIGURA 2).

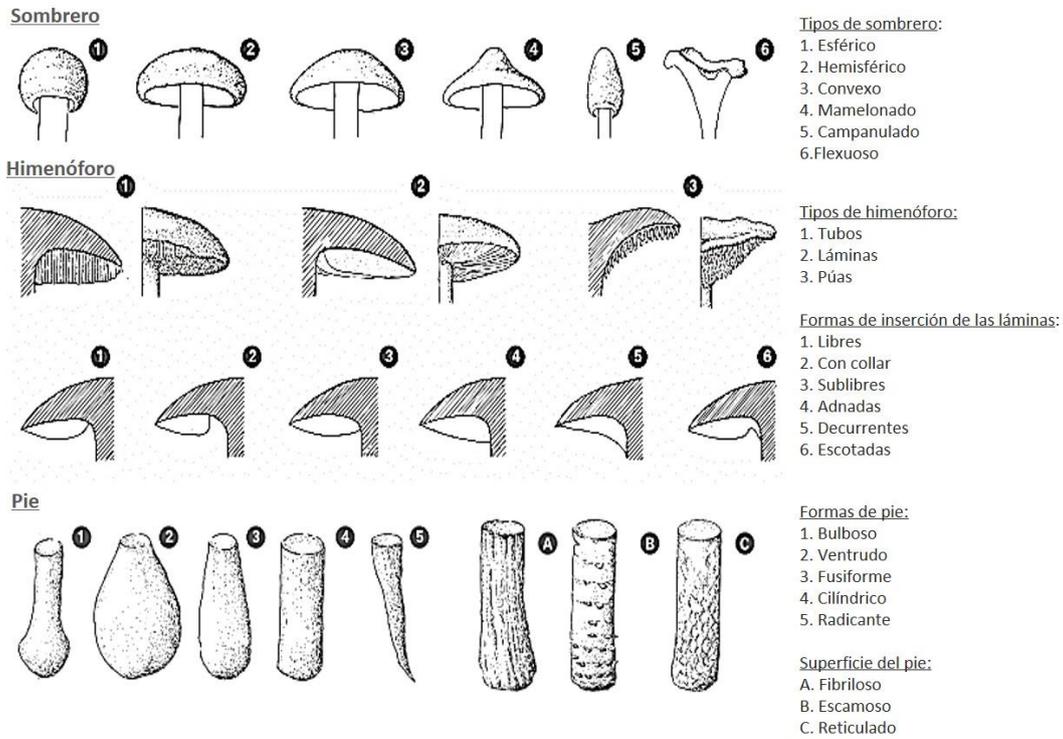


FIGURA 2. Ejemplo de características morfológicas de las setas de importancia taxonómica [4].

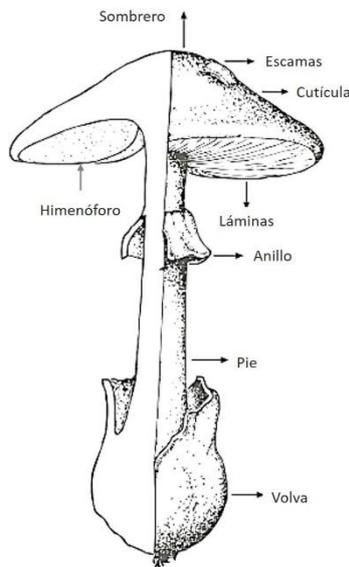


FIGURA 3. Partes principales de un seta típica [4]

Las partes básicas de una seta típica son el sombrero; el himenóforo y el pie. El sombrero puede estar cubierto de escamas, restos de un velo general, debajo de las cuales se encuentra la cutícula. El himenóforo es la parte encargada de sostener el himeneo o parte fértil portadora de esporas, y finalmente el pie que sirve de sostén. El pie puede llevar un anillo, restos del velo parcial, y también puede presentar una volva o restos del velo general (FIGURA 3) [4].

2.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE LAS SETAS

El estudio de la estructura microscópica de las setas es parte fundamental en micología, imprescindible para una correcta determinación de las especies. Las estructuras microscópicas con mayor significado taxonómico son (FIGURA 4) [4]:

- Las hifas, son la unidad estructural de la mayoría de hongos, en particular de los hongos filamentosos y aparecen generalmente divididas por tabiques transversales llamados septos. El conjunto de hifas recibe el nombre de micelio
- La cutícula o pellis constituye la capa superficial del cuerpo fructífero. Su disposición, propiedades y forma constituyen características taxonómicas muy importantes.
- La trama o contexto constituye la porción interna del carpóforo y puede presentar diferencias en su estructura de gran significado taxonómico.
- Las ascas son sacos en el interior de los cuales se desarrollan las esporas de origen sexual en la división Ascomycota. Su forma puede ser variable y pueden presentar, según la especie, distinto número de esporas.
- Los basidios son células himeniales de la división Basidiomycota, donde se desarrollan las esporas de origen sexual, generalmente cuatro. Estas esporas son exógenas y permanecen unidas al basidio por los esterigmas.
- Los cistidios son células terminales estériles de hifas que se colocan en el himeneo, en la superficie del cuerpo fructífero o, en ocasiones, en la trama de los basidiocarpos y presentan una morfología muy variada.
- Las esporas son las unidades de propagación sexual de los hongos, que al germinar en las condiciones adecuadas originan el micelio. Presentan diferentes formas, tamaños, colores y ornamentaciones dependiendo de la especie, siendo muy importantes a nivel taxonómico.

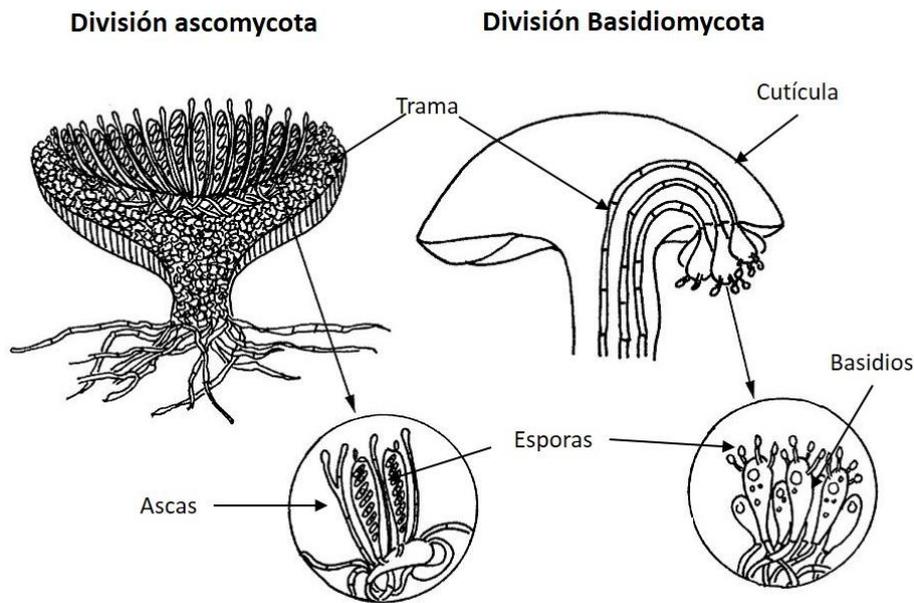


FIGURA 4. Características microscópicas de las setas. Imagen: <http://www.photomazza.com/?Fungi&lang=es>. © Maria Tullii.

2.3. FORMAS DE VIDA DE LOS HONGOS

Los hongos en general se dividen en tres grupos en función de sus preferencias de nicho-sustrato: simbiotes, saprófitos y parásitos.

La simbiosis es una relación que se establece entre dos organismos vivos en la cual ambos obtienen beneficio. **Los hongos simbiotes** se dividen en liquenizados y micorrizados. Los **hongos liquenizados** forman asociaciones simbióticas con algas y se comportan como unidades estructurales y funcionales independientes. Los **hongos micorrícicos** establecen asociaciones simbióticas con las raíces cortas de plantas formando micorrizas, término acuñado por primera vez por Frank en 1885 [8] para definir la asociación de mutuo beneficio entre las hifas de un hongo y las raíces de una planta. Ésta asociación es de gran importancia en los ecosistemas forestales, debido al papel que desempeñan en su mantenimiento. Se estima que entre el 85% y el 95% de las especies de plantas vasculares forman micorrizas, de las cuales tan sólo del 3-5% forman asociaciones del tipo ectomicorrícico, muy importantes en el mundo forestal. Los hongos formadores de ectomicorrizas se encuentran principalmente entre las divisiones Basidiomycota (*Amanita* sp, *Boletus* sp., *Lactarius* sp., *Cantharellus* sp, *Hygrophorus* sp, etc) y Ascomycota (*Tuber* sp, etc), e incluyen a las especies más comunes y de mayor valor económico en nuestros bosques. Estos hongos favorecen principalmente la captación de fósforo y nitrógeno por parte de la planta, la cual transfiere al hongo carbohidratos generados en la fotosíntesis [4].

Los **hongos saprófitos** se nutren de sustancias producidas por la descomposición de la materia orgánica muerta, en cuyo proceso se asimila el carbono, el hidrógeno y el oxígeno, y se libera nitrógeno, fósforo, potasio y azufre entre otros elementos. Están involucrados, junto con las bacterias, en el reciclaje de la materia orgánica muerta. La proporción de hongos saprófitos productores de carpóforos es relativamente baja, aunque existen especies de gran importancia económica como el champiñón (*Agaricus bisporus*), la seta de ostra (*Pleurotus ostreatus*) o el Shiitake (*Lentinula edodes*), las cuales son cultivadas de forma industrial [4].

Los **hongos parásitos** se caracterizan por vivir en diferentes huéspedes, a los que provocan daños más o menos graves (hongos patógenos como *Armillaria mellea*) o incluso la muerte [4].

2.4. CLASIFICACIÓN Y BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS HONGOS SOMETIDOS A ESTUDIO

Los hongos constituyen un grupo polifilético, compuesto por linajes de organismos no emparentados entre sí, agrupándose en tres reinos diferentes (FIGURA) [9]:

- **Reino Protozoa.** No presentan pared celular y se alimentan por fagocitosis. Incluye los llamados “mohos mucilaginosos”.
- **Reino Chromista.** Organismos descendientes de algas que han perdido la clorofila. En general sus paredes celulares no presentan quitina ni glucanos, sino que están compuestas por celulosa.
- **Reino Fungi.** Hongos verdaderos, presentan pared celular de quitina y glucanos. Están más emparentados con los animales que con las plantas. Se distinguen cuatro divisiones:
 - **División Chytridiomycota:** Presenta esporas flageladas e incluye muchos hongos acuáticos.
 - **División Zygomycota.** Presenta hifas no tabicadas o cenocíticas. Hongos tan frecuentes como es el moho negro del pan.
 - **División Ascomycota.** Grupo con mayor número de especies, algunas con gran valor comercial como las trufas, las colmenillas o las criadillas de tierra. Poseen hifas septadas y forman esporas sexuales en unas células llamadas ascas, normalmente agrupadas en cuerpos fructíferos conocidos como ascocarpos, carpóforos o setas.

- **División Basidiomycota.** Hongos de mayor complejidad morfológica. Presentan hifas septadas. Reproducción sexual principalmente mediante somatogamia, por fusión de hifas compatibles. Se caracterizan por formar basidiosporas dentro de unas células especializadas llamadas basidios, agrupadas en cuerpos de fructificación denominados basidiocarpos, carpóforos o setas.

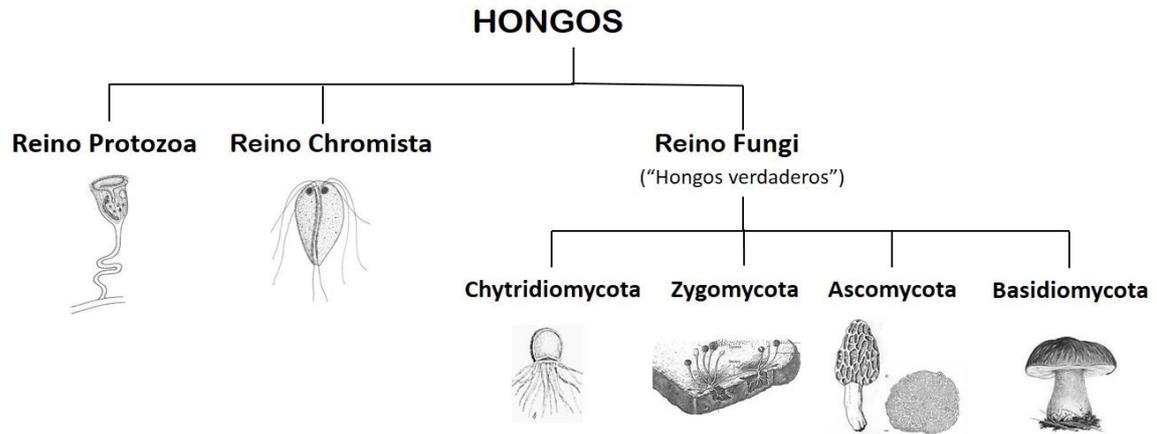


FIGURA 5. Clasificación taxonómica de los hongos. Es un grupo polifilético agrupado en tres reinos diferentes de organismos no emparentados entre sí.

Los criterios taxonómicos y de orden utilizados en este trabajo siguen la nomenclatura utilizada por los autores Cannon y cols. en 2007 [10]; Kirk y cols. 2008 [11] y Hibbet y cols. 2007[12].

***Boletus edulis* Bull**
Familia Boletaceae

Miguel, Hongo

Características macroscópicas:

Sombrero hemisférico de 10-20 cm de diámetro, convexo-extendido en la madurez.

Cutícula de color pardo-ocráceo, lisa, ligeramente viscosa en tiempo húmedo. Margen excedente.

Los tubos son de color blanquecino, más tarde amarillentos y finalmente verde-oliva, son separables con facilidad del sombrero y no llegan al pie (libres).

El pie es ventruado al principio, después cilíndrico, de color blanco-crema, y reticulado en la parte superior.

La carne es blanca, rosa bajo la cutícula e inmutable al corte.

Características microscópicas:

Las esporas son lisas, fusiformes, de 14-18 x 4-6 μm , y presenta una esporada ocre-olivácea.

Hábitat y ecología:

Hongo micorrízico.

Fructifica desde finales de verano hasta final del otoño, bajo frondosas o coníferas.

Prefiere suelos ácidos y suele crecer en grupos de varios ejemplares más o menos dispersos.



Observaciones:

Excelente comestible, de olor y sabor agradables.

Tiene un sabor bien definido, dulce como el de las avellanas.

Imagen: <http://www.gloriamar.es/seta-boletus-edulis/>

FIGURA 6. Breve descripción macroscópica y microscópica de la especie *Boletus edulis* [13].

***Lactarius deliciosus* (L.) Gray**

Níscalo, nícalo, rovellón

Familia Russulaceae**Características macroscópicas:**

Sombrero de 6-10 cm de diámetro, plano-convexo a infundibuliforme. Margen incurvado.

Cutícula lisa, de color anaranjado, zonada, con máculas más oscuras de color verdoso y no separable.

Láminas adnadas a decurrentes, anaranjadas y con manchas verdosas

El pie de 4-6 x 1-2 cm, cilíndrico, escrobiculado, anaranjado y con máculas verdosas.

La carne es blanquecina, se torna enseguida de color zanahoria al corte y finalmente a tonalidades verdosas.

Características microscópicas:

Las esporas son amiloides, con verrugas unidas en crestas y reticuladas, de 7,5-9 x 6-7 μm .

Esporada blanco-cremosa.

Hábitat y ecología:

Hongo micorrícico.

Especie típica de coníferas, aparece de forma masiva en otoño y principios del invierno en pinares, preferentemente jóvenes, gregariamente o en grupos, y en ocasiones muy numerosos.

**Observaciones:**

Esta especie es un buen comestible.

Se caracteriza por su latex anaranjado y sabor ligeramente acre y dulzón.

Imagen: <http://eduboletaires.blogspot.com.es/>

FIGURA 7. Breve descripción macroscópica y microscópica de la especie *Lactarius deliciosus* [13].

***Calocybe gambosa* (Fr.) Donk**

Perrochico, lansarón.

Familia Tricholomataceae**Características macroscópicas:**

Sombrero hemisférico, posteriormente convexo-aplanado, de 5-14 cm de diámetro.

Cutícula seca, separable de la carne, de color blanco o crema –ocráceo.

Las láminas son blanquecinas, apretadas y escotadas.

El pie es cilíndrico, ligeramente bulboso en la base, blanco, de 3-6 x- 1-3 cm.

La carne es blanca, con olor y sabor harinoso.

Características microscópicas:

Las esporas son elipsoidales, de 5-6-x-4-3 μm , hialinas, lisas, no amiloides.

Esporada blanca.

Hábitat y ecología:

Especie que fructifica en primavera en suelos humificados, húmedos y no contaminados.

Es una especie prático-la y fructifica formando grandes corros de brujas. Aparece bajo espinos, endrinos y otros arbustos.

**Observaciones:**

Excelente comestible. De consistencia algo dura, y sabor especialmente farinoso, con un regusto un poco amargo.

Imagen: <http://eurofunghi.pt/web/>

FIGURA 8. Breve descripción macroscópica y microscópica de la especie *Calocybe gambosa* [13].

***Hygrophorus marzuolus* (Fr.) Bres.**

Seta de marzo, marzuelo

Familia Hygrophoraceae**Características macroscópicas:**

Sombrero de convexo a plano, de 4-10 cm de diámetro.

Cutícula lisa, no viscosa, de color blanquecino al principio, más tarde gris-negruzco. Margen de incurvado a plano.

Presenta láminas subdecurrentes, espaciadas, blancas al principio y más tarde grisáceas con lamélulas.

El pie Cilíndrico, de 3-5 x 2-4 cm, blanquecino, posteriormente grisáceo.

La carne es blanca o grisácea.

Características microscópicas:

Las esporas son elipsoidales, lisas, hialinas, de 6-8,5 x 4-5 μm , no amiloides.

Esporada blanca.

Hábitat y ecología:

Hongo micorrícico.

Fructifica en bosque de coníferas y raramente en frondosas, con predilección por suelos síliceos. Su época de aparición es el invierno y principios de la primavera, algo poco usual en micología.

**Observaciones:**

Excelente comestible, de textura agradable, olor poco destacable y sabor suave y dulce.

Imagen: <http://www.alamedadelvalle.es/>

FIGURA 9. Breve descripción macroscópica y microscópica de la especie *Hygrophorus marzuolus* [13].

***Cantharellus cibarius* (Pers.) Fr.**

Rebozuelo

Familia Cantharellaceae**Características macroscópicas:**

Sombrero De 3-9 cm de diámetro, convexo-aplanado, más tarde infundibiliforme. Margen ondulado e incurvado.

Cutícula de color amarillo-anaranjado, lisa y seca.

El himenóforo está formado por pliegues longitudinales gruesos, anastomosados, decurrentes, del mismo color que el sombrero.

El pie es corto, adelgazándose hacia la base, de 2-6 x 1-2 cm, liso, del mismo color que el resto del carpóforo.

La carne es amarillenta.

Características microscópicas:

Las esporas son elipsoidales, de 9-10 x 5-6 μm , hialinas, lisas, gutuladas.

Esporada amarilla.

Hábitat y ecología:

Hongo micorrícico.

Fructifica en bosques de coníferas y frondosas, normalmente en veranos lluviosos, aunque también es frecuente encontrarlas en el otoño.

**Observaciones:**

Excelente comestible, de sabor afrutado y en ocasiones un poco amargo.

Imagen: <http://setas-hongos.blogspot.com.es/>

FIGURA 10. Breve descripción macroscópica y microscópica de la especie *Cantharellus cibarius* [13].

***Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.**

Seta de chopo

Familia Pleurotaceae**Características macroscópicas:**

Sombrero de 5-15 cm de diámetro, en forma de ostra. Margen incurvado.

Cutícula lisa, brillante, de color variable, marrón-grisáceo o gris oscuro.

Láminas muy decurrentes, apretadas, blanco-cremosas y con lamélulas.

El pie es excéntrico, muy corto, de 3-7 x 1-2 cm y blanquecino.

La carne es blanca.

Características microscópicas:

Las esporas son cilíndricas, de 8-12 x 3-4 μm , hialinas, lisas, no amiloides.

Esporada blanquecina.

Hábitat y ecología:

Especie saprófita.

Fructifican sobre madera o restos leñosos, generalmente de frondosas, de forma gregaria e incluso cespitosa sobre los árboles que llevan tiempo caídos. Se encuentran a finales de verano y durante el otoño.

**Observaciones:**

Excelente comestible. Presentan un olor y sabor agradables.

Imagen:
http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus_ostreatus.html

FIGURA 11. Breve descripción macroscópica y microscópica de la especie *Pleurotus ostreatus* [13].

3. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS HONGOS COMESTIBLES EN CASTILLA Y LEÓN.

La mayoría de especies de setas están asociadas al otoño, verano y primavera, estacionalidad que limitaba su consumo sólo a ciertas épocas del año. Esta limitación fue salvada gracias a la aparición del cultivo de hongos para consumo humano hacia el año 600 en China, con el cultivo en troncos de madera de la especie *Auricularia auricularia*. Pero el mayor avance dentro de este sector se dio en Francia, sobre el año 1600, con el cultivo sobre material de compostaje de la especie *Agaricus bisporus* o champiñón [14]. En las últimas décadas se ha incrementado enormemente el consumo y la producción de setas cultivables a nivel mundial, en especial el cultivo de *A. bisporus* (champiñón), *P. ostreatus* (seta de ostra) y *L. edodes* (Shiitake). El champiñón es la especie más cultivada y consumida en Europa, y su producción, junto con la de otras setas, ha aumentado en España un 40% desde el año 2007 al 2013 [15].

A parte de las setas cultivadas, la recolección de especies de hongos silvestres también ha aumentado enormemente. En España en los últimos años se han empezado a recolectar muchas variedades de setas que antes no se consumían. La aparición de gran número de estudios [16, 17], iniciativas como la creación de un sello de garantía de calidad y la aparición de proyectos como la red internacional Mycosilva, ponen de manifiesto este creciente interés y afición de los consumidores en la recolección y comercialización de setas silvestres, dándole una importancia económica que hasta hoy no tenía. Este aumento en la recolección, no siempre responsable, ha llevado a la necesidad de controlar la masiva afluencia en nuestros bosques, tanto a nivel de micoturismo como a nivel comercial y económico, con la finalidad de conservar y explotar las fuentes naturales y ecosistemas micológicos de una forma sostenible.

Algunas regiones como Castilla y León y en particular la provincia de Soria, son actualmente territorio de referencia en producción micológica, tanto por la calidad como por la cantidad del producto que procede de sus montes. Castilla y León ha sabido aprovechar esta gran riqueza micológica mediante la creación de la marca de garantía de calidad **Setas de Castilla y León** (FIGURA 12), el primer sello de calidad para este tipo de producto que se conoce en todo el mundo. La comercialización a través de este sello contribuye a la creación de un mercado más estable, racional y transparente y sirve como herramienta de **desarrollo** para los territorios productores, en su mayoría zonas rurales deprimidas (<http://www.micocyl.es/marca-de-garantia-setas-de-castilla-y-leon>).



FIGURA 12. Marca de garantía de calidad **Setas de Castilla y León**.

Por otro lado, el proyecto **Micosylva** (<http://www.micosylva.com/content/proyecto-micosylva-0>) es una red Europea de parques micológicos formada por un conjunto de bosques representativos de territorios europeos de especial relevancia en recursos micológicos (FIGURA 13), donde se pretende dar a conocer a la sociedad la importancia ecológica de los hongos para la salud del bosque, y la necesidad de una gestión que garantice la persistencia del recurso y mejore las actividades económicas generadas por la recolección de las setas, su comercialización y el micoturismo.



FIGURA 13. Mapa de territorios participantes en la Red europea Micosylva. Imagen: <http://www.micosylva.com/>

Un buen ejemplo regional de estos territorios de gran relevancia micológica es el Parque Micológico de Pinar Grande en Soria (FIGURA 14), con más de 12.500 hectáreas de bosque limpio y accesible, el cual posee una riqueza micológica estimada de más de 200 Toneladas anuales de hongos comestibles. Estos bosques proporcionan importantes rentas a muchas familias de la zona desde los años 60. En los últimos tiempos el considerable aumento del número de recolectores aficionados y con fines comerciales en Pinar Grande, ha hecho necesaria una regularización a través de permisos que garanticen una recolección respetuosa y responsable.



FIGURA 14. Tríptico del parque Micológico de Pinar Grande en Soria. Imagen: <http://www.micosylva.com/>

Aunque el número de especies de hongos comestibles recolectadas en estas zonas es elevado, los géneros de mayor popularidad, de mayor importancia económica y que mayor valor alcanzan en el mercado en Castilla y León, son *Boletus* sp (*B. edulis*), *Cantharellus* sp (*C. cibarius*), *L. deliciosus*, *P. ostreatus*, *C. gambosa* y *P. eryngii*.

4. PROPIEDADES DE LOS HONGOS

4.1. INTRODUCCIÓN

En oriente los hongos han sido utilizados tradicionalmente desde la antigüedad tanto para su consumo como para uso medicinal. Sin embargo en Europa el consumo de hongos comestibles no se ha visto incrementado hasta hace relativamente poco, siendo su consumo escaso y esporádico en muchos países como España. En las últimas décadas el mejor conocimiento del valor nutricional y funcional de los hongos ha contribuido enormemente a este aumento en su consumo.

Lo que primero nos llama la atención de los hongos comestibles son sus magníficas **cualidades organolépticas**. Su sabor, textura y su olor característicos los hacen muy apreciados

y versátiles en la cocina. Su inconfundible sabor, conocido como *umami* o delicioso en japonés, se considera actualmente como el quinto sabor, junto con el dulce, el salado el ácido y el amargo. El umami se ha relacionado con alimentos ricos en glutamato monosódico. Existen estudios que demuestran que la ingesta de glutamato en las comidas incrementa la secreción de jugos digestivos e insulina, mejorando así la digestión [18, 19]. También se ha demostrado que el glutamato libre juega un papel beneficioso en la regulación de las funciones gastrointestinales, con lo que podría utilizarse para el tratamiento de enfermedades gástricas tales como dispepsia o gastritis [20]. Además es de gran ayuda en la reducción de la ingesta de sal en las comidas, entre un 30% y un 40%, ya que además de mantener la palatabilidad del alimento, disminuye el porcentaje de sal necesaria y así el riesgo de hipertensión y de enfermedades coronarias [18].

Desde un **punto de vista nutricional** las setas son alimentos muy valiosos. Constituyen una buena fuente de proteínas y fibra alimentaria, y contienen un bajo contenido en grasas y energía, por lo que son un excelente elemento para la elaboración de dietas equilibradas, hipocalóricas y antihipertensivas. Además, son una buena fuente de vitaminas, minerales y compuestos antioxidantes como los fenoles [21, 22]. Como muestra la FIGURA 15, el índice nutricional de algunas setas, índice basado en el contenido relativo de aminoácidos esenciales el cual nos muestra de una forma intuitiva la calidad proteica del alimento, es ligeramente inferior al de la carne y comparable al de la leche y algunas legumbres.

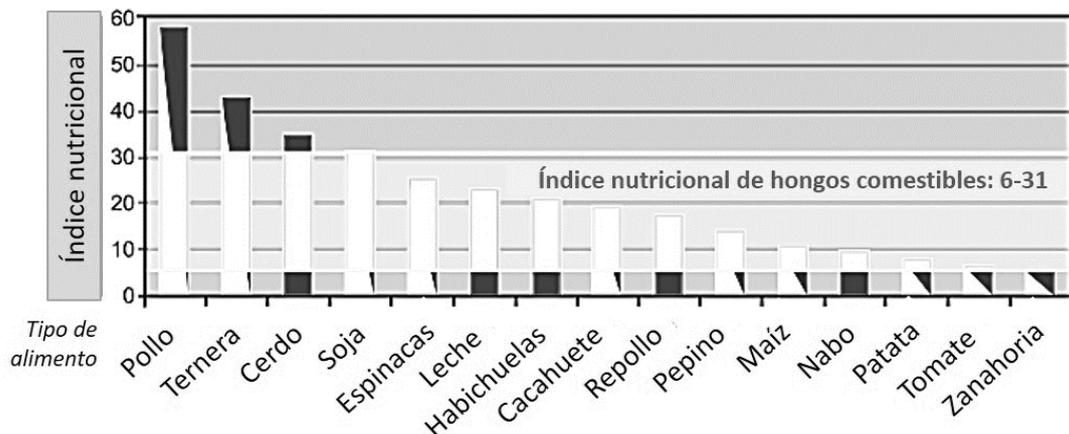


FIGURA 15. Comparación del índice nutricional de diferentes alimentos con el índice nutricional de hongos comestibles [23].

Desde un **punto de vista medicinal**, aunque los hongos han sido utilizados con este fin desde la antigüedad en países como China, es en los últimos tiempos cuando se ha empezado a conocer el gran número de compuestos biológicamente activos que presentan. Muchos de estos compuestos, aislados a partir de hongos comestibles y no comestibles, han mostrado

prometedoras propiedades inmunomoduladoras, antitumorales, cardiovasculares, antivirales, antibacterianas, hepatoprotectoras y antidiabéticas, entre otras. En particular los polisacáridos, y en especial los bien conocidos β -glucanos, han demostrado ser capaces de modular la respuesta inmune en animales y humanos e inhibir el crecimiento de ciertos tumores [24, 25].

Por tanto los hongos son una valiosa fuente de nutrientes y compuestos bioactivos. Sus potenciales efectos beneficiosos sobre la salud humana los hacen ser grandes candidatos para ser considerados como “*alimentos funcionales*”, entendiéndose como tales aquellos “alimentos que además de actuar como nutrientes, pueden influir de forma específica y positiva sobre ciertas funciones biológicas, mejorando nuestro estado general de salud y/o reduciendo el riesgo de padecer ciertas enfermedades” [26].

4.2. PROPIEDADES NUTRICIONALES

El consumo de hongos se ha incrementado gracias a sus magníficas cualidades nutricionales, como son su alto contenido en proteínas, bajo contenido en grasas saturadas y presencia de ácidos grasos insaturados. En la TABLA 1 se muestra un resumen bibliográfico de la composición en macronutrientes, humedad y energía (Análisis proximal) de las diferentes especies analizadas. Se observa cómo el contenido en nutrientes varía enormemente entre especies e incluso dentro de la misma, debido a diferencias en la composición del suelo, condiciones ambientales, condiciones de recolección, tratamiento, conservación, etc.

TABLA 1. Composición proximal de las seis especies de hongos comestibles estudiadas.

Especie	Humedad ¹	Cenizas ²	Proteínas ²	Grasa ²	Carbohidratos ²	Energía ³	Fibra ²	Ref.
<i>B. edulis</i>	89,2	5,3-7,1	17,2-36,9	2,5-4,6	64,3-71,2	3,6-4,0	--	[21, 27]
<i>L. deliciosus</i>	90,1	7,2-14,3	17,9-20,0	0,8-6,5	60,3-64,6	3,7	--	[28, 29]
<i>C. gambosa</i>	90,9	7,9-13,9	15,5-47,2	0,8-1,3	42,7-69,8	3,3-3,8	--	[21, 30]
<i>Hygrophorus</i> sp	80,7	10,6	1,3	6,6	57,7	--	23	[31]
<i>C. cibarius</i>	92,4	6,4-12,1	30,9-69,1	1,5-4,5	14,3-56,3	3,6-3,8	--	[21, 29, 32]
<i>P. ostreatus</i>	95,0-91,3	7,6-8,1	13,2-42,0	0,5-5,0	37,0-75,1	3,7	24-31	[29, 33-35]

¹Datos expresados como g/100 g de peso fresco

²Datos expresados como g/100 g de peso seco

³Datos expresados como Kcal/g de peso seco.

4.2.1. Humedad, cenizas y aporte energético

Las hongos frescos contienen un alto porcentaje de humedad (85-95%) dependiendo enormemente de la época de recogida y de las condiciones ambientales [36]. El aporte energético de los hongos es en general bajo, entre 3,0-4,3 Kcal/g de materia seca, por lo que a menudo las setas son incluidas en las formulaciones de dietas hipocalóricas. El contenido en cenizas varía aproximadamente entre un 5,3-12,2 g/100 g de peso seco dependiendo de la especie (TABLA 1) [21].

4.2.2. Contenido en proteínas

El contenido proteico en hongos oscila aproximadamente entre un 1-69 % por g de materia seca (TABLA 1). El contenido en proteínas de los hongos comestibles se encuentra entre los niveles de proteínas de la carne y el de otros alimentos como la leche [36, 37]. La digestibilidad de estas proteínas es bastante buena [38], similar a la de las proteínas de legumbres [39], pero por debajo de la digestibilidad de las proteínas de la carne [40].

Las proteínas de hongos son ricas en aminoácidos esenciales como Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Lisina (Lys), Metionina (Met), fenilalanina (Phe), Treonina (Thr), Triptófano (Trp) y Valina (Val) (TABLA 2) [22]. Para la mayoría de especies los aminoácidos esenciales más abundantes son la Lisina y la Treonina, mientras que los de menor concentración son el triptófano y la metionina [41]. Esta composición en aminoácidos es comparable a la proteína animal, por lo que resulta interesante su introducción en la dieta con la idea de contrarrestar el alto consumo de alimentos proteicos de origen animal en los países desarrollados, los cuales suelen ir acompañados de gran cantidad de grasa [42].

TABLA 2. Proporción de aminoácidos esenciales (mg/g peso seco) en algunas especies de hongos comestibles [33].

Aminoácidos ¹	<i>B. edulis</i>	<i>C. gambosa</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>P. ostreatus</i>
Ile	0,12	nd ²	nd	nd
Leu	0,47	0,45	0,21	0,02
Lys	5,46	4,19	5,74	4,65
Met	0,74	1,01	0,41	0,12
Phe	0,19	0,08	0,06	0,09
Thr	9,14	5,71	8,98	6,99
Trp	0,03	0,09	0,02	0,01
Val	1,41	1,27	1,34	1,21

¹Ile, L-Isoleucina; Leu, L-Leucina; Lys, L-Lisina; Met, L-Metionina; Phe, L-Fenilalanina; Thr, L-Treonina; Trp, L-Triptofano; Val, L-Valina.

²No detectado

4.2.3. Contenido en grasas

Poseen un bajo contenido en grasas, siempre menor del 10% por gramo de materia seca, dependiendo de la especie [34, 43] y en su mayoría se trata de ácidos grasos insaturados (60-80 %) (TABLA 3). En general los ácidos grasos más abundantes en hongos son los insaturados ácido oleico (C18:1 Δ 19c) y linoleico (C18:2 Δ 9c, 12c), seguidos de los ácidos grasos saturados palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), aunque su contenido varía enormemente en función de factores ambientales, según la especie, y sobre todo según el tipo de sustrato y condiciones de crecimiento [44]. A parte de los mencionados, hay especies particularmente ricas en otro tipo de ácidos grasos, como es el caso de *C. cibarius*, que presenta un elevado porcentaje del ácido graso insaturado gadoleico (C20:1) (TABLA 3).

TABLA 3. Composición en ácidos grasos (%) de algunas especies de hongos comestibles.

Ácidos grasos	<i>B. edulis</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>C. gambosa</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>P. ostreatus</i>
C14:0. Ácido mirístico	0,15-0,18	0,17-0,48	0,40	0,09-0,13	0,66
C16:0. Ácido palmítico	9,84-10,03	5,4-12,08	13,57-15,16	7,19-13,08	12,4
C16:1. Ácido palmitoleico	0,53-2,01	0,18-0,92	0,65-0,88	0,2-0,49	0,46
C18:0. Ácido esteárico	2,75	25,33-51,29	2,14-3,24	3,34-6,49	3,71
C18:1. Ácido oleico	36,1-39,72	12,51-41,26	18,1-32,54	8,13-10,78	10,36
C18:2. Ácido linoleico	42,2-44,32	17,06-23,19	43,88-57,75	50,01-53,59	65,29
C18:3. Ácido linolénico	0,07-0,17	0,26-0,41	0,45-0,93	0,08-0,1	0,03
C20:0. Ácido araquidónico	0,34-0,44	0,18-0,44	0,33-0,47	0,18-0,31	0,13
C20:1. Ácido gadoleico	0,49-0,68	0,03-0,1	0,13	11,48-27,98	0,11
Ref	[21, 45]	[28, 46, 47]	[21, 30]	[21, 32]	[48]

El ácido linoleico, además de ser un ácido graso esencial para el ser humano, posee gran importancia en la síntesis de los compuestos orgánicos volátiles responsables del característico olor a seta fresca: los compuestos de ocho carbonos 1-octen-3-ol, 3-octanol, 1-octen-3-ona y 3-octanona [49].

4.2.4. Contenido en Vitaminas

Los hongos son considerados una buena fuente de vitaminas, sobre todo tiamina (B₁) riboflavina (B₂), niacina (B₃) y folatos (B₉). También presentan trazas de vitamina C, D, E, B₁₂ y β -carotenos (precursor de la vitamina A) [50].

Los hongos son el único alimento no animal que contiene vitamina D. Este compuesto no está presente como tal en los hongos, sino en forma de su precursor, el ergosterol, encontrándose normalmente a niveles bastante elevados (400-600 mg/100 g de materia seca)

[51]. La vitamina D tiene un papel fundamental en el mantenimiento de órganos y sistemas, regulando los niveles de calcio y fósforo en sangre. Contribuye por tanto a la formación y mineralización ósea, siendo esencial para el desarrollo del esqueleto, además de tener un papel fundamental en la función renal, muscular, cardíaca e inmunológica [52].

4.2.5. Contenido en minerales

Los hongos son buena fuente de micronutrientes. Su contenido varía entre el 6 y el 11% sobre materia seca según la especie. Especies como *P. ostreatus*, *L. edodes* y *P. eryngii* son unas de las más ricas en minerales (6,90%, 5,85% y 8,60% respectivamente)[18].

Principalmente se detectan potasio, fósforo y magnesio además de cantidades variables de calcio, cobre, hierro y zinc [36, 50]. Algunos de los hongos cultivados más comunes, como *A. bisporus*, *P. ostreatus* y *L. edodes*, son especialmente ricos en potasio, y una buena fuente de fósforo, magnesio, cinc y cobre [53]. Otras especies como *B. edulis* son ricas en selenio de forma natural, elemento importante en la nutrición y metabolismo humanos [54].

4.2.6. Contenido en carbohidratos y fibra alimentaria

Los carbohidratos constituyen el elemento mayoritario en hongos comestibles (entre 35 y 70 g/ 100 g de materia seca), y pueden clasificarse en hidratos de carbono digeribles o no digeribles [37]. Los carbohidratos digeribles más abundantes en hongos son el manitol [30], la glucosa [55] y el glucógeno [37]. Los no digeribles se encuentran en mayor proporción que los anteriores, e incluyen oligosacáridos como la trealosa y polisacáridos como la quitina, β -glucanos, mananos y otros heteropolisacáridos. Algunos estudios comparativos entre especies, muestran a la seta *L. edodes* o shiitake como la más rica en carbohidratos (17,62 g/100 g de materia seca) y azúcares simples, frente a otras especies como el champiñón o *A. bisporus* (5,98 g/100 g de materia seca) [56].

El contenido de los hongos en fibra alimentaria varía en función de la especie, las condiciones de crecimiento, tratamiento, etc, al igual que el resto de nutrientes. Los hongos son una buena fuente de fibra dietética (4,5-54,5 g/ 100 g de masa seca), conteniendo más cantidad de fibra insoluble (2,28-8,99 g/100 g de porción comestible) que de la soluble (0,32-2,20 g/100 g de porción comestible) [57]. Los conocidos β -glucanos son la fibra alimentaria más abundante en la mayoría de hongos comestibles (13-84% de la fibra dietética total) [42].

Este contenido en hidratos de carbono complejos y fibra hacen que los hongos presenten un índice glucémico bajo (IG=15), siendo su digestión y la liberación de azúcares en sangre más lenta. Estos alimentos de bajo IG son muy recomendables para personas diabéticas ya que suponen un menor aumento de la glucemia postprandial [18].

4.3. PROPIEDADES MEDICINALES

A parte de por sus excelentes características nutricionales y organolépticas, los hongos han adquirido gran relevancia en los últimos años por sus destacables propiedades medicinales. Sin duda son una gran fuente sin explorar de nuevos y potentes productos bioactivos, incluyendo polisacáridos, proteínas, compuestos fenólicos y triterpenos, a los que se les atribuyen interesantes propiedades, entre las que cabe destacar su capacidad antitumoral, inmunomoduladora, antioxidante e hipoglucémica.

4.3.1. *Compuestos de hongos con propiedades bioactivas*

4.3.1.1. Polisacáridos

De entre todos los compuestos bioactivos presentes en hongos, los polisacáridos son los más abundantes, y derivan en su mayor parte de la División Basidiomycota. En las últimas décadas gran número de trabajos ponen de manifiesto el potencial bioactivo de estas moléculas, destacando principalmente por su actividad antioxidante [58-60], antitumoral [61, 62] e inmunomoduladora [63-66].

Los polisacáridos de hongos se presentan en una gran variabilidad estructural y funcional. Pueden encontrarse como homopolímeros, principalmente de glucosa; heteropolímeros; o formando complejos con elementos de la célula como proteínas o polifenoles; pueden presentar diferente estructura anomérica (α , β , o mezcla α - β) o distintos enlaces de cadena, siendo los más comunes (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) o (1 \rightarrow 4). Estas moléculas pueden ser lineales o ramificadas y presentar cadenas laterales más o menos numerosas y de mayor o menor longitud [67]. Toda esta diversidad de elementos y sus infinitas combinaciones hacen de los polisacáridos una impresionante fuente de información celular, mucho más compleja y con más posibilidades que la propia información genética [7, 67].

La mayoría de polisacáridos de hongos con actividad bioactiva parecen estar relacionados con la pared celular [68] y pertenecen en su mayoría al extenso y conocido grupo de los β -glucanos, los cuales suelen presentar una estructura común que consiste en una cadena

principal con enlaces β -(1 \rightarrow 3) y ramificaciones en posición O-6 [69-72], las cuales parecen ser imprescindibles para su actividad antitumoral [73-75]. Dos ejemplos bien conocidos son los polisacáridos medicinales Lentinan, derivado de *L. edodes*, y Schizophyllan, de *Schizophylla commune* (FIGURA 16).

El Lentinan es uno de los β -glucanos más utilizados en la industria farmacéutica, con probada actividad antitumoral e inmunomoduladora [76]. Está compuesto por una cadena principal de residuos de β -(1 \rightarrow 3)-D-glucosa, con la presencia de enlaces en posición O-6, y un tamaño molecular estimado de 500 Kda [7, 77]. El Schizophyllan [7, 78] es un polisacárido extracelular con una estructura química muy similar al lentinan. Está constituido por una cadena lineal de residuos de β -(1 \rightarrow 3)-D-glucosa con ramificaciones laterales en posición O-6 al igual que el anterior. Presenta un peso molecular aproximado de 100-200 Kda y en solución acuosa adquiere una conformación terciaria en triple hélice. Estos dos polisacáridos presentan una demostrada actividad inmunomoduladora y ambos han sido comercializado como agentes terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer en países como Japón [7, 76-78]. La gran ventaja de estos productos con respecto a otras drogas antitumorales sintéticas es su inocuidad, siendo medicamentos antitumorales seguros, con mínimos efectos secundarios [7, 79], ya que actúan como inmunomoduladores no específicos activando el sistema inmune del propio organismo sin causar una inactivación directa del tumor [80].

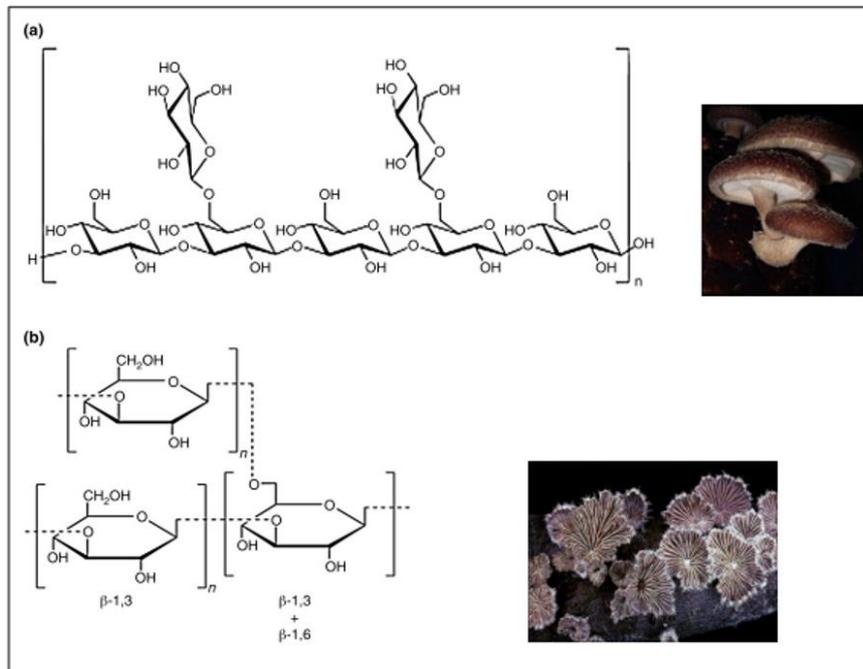


FIGURA 16. Estructura química (izquierda) y cuerpos fructíferos (derecha) de los polisacáridos bioactivos Lentinan de *L. edodes* (a) y Schizophyllan de *Schizophylla commune* (b) [81].

Otro conocido polisacárido con actividad inmunomoduladora es el Grifolan, aislado a partir del hongo *Grifola frondosa*. Se trata también de un polímero formado por unidades de β -(1 \rightarrow 3)-D-glucosa y ramificaciones laterales en posición O-6 [82, 83]. La popular seta *P. ostreatus*, al igual que otras especies de este género, sintetizan β -glucanos biológicamente activos como el Pleuran, un insoluble β -(1,3/1,6)-D-glucano, candidato para el desarrollo de prometedores compuestos nutracéuticos [84-86].

4.3.1.2. Complejos polisacárido-proteína

En los últimos años se ha podido demostrar la existencia de numerosos complejos polisacárido-proteína con actividad antioxidante [87, 88], antitumoral e inmunomoduladora [89, 90], extraídos a partir de gran variedad de especies de Basidiomicetes. Un ejemplo de ello son los complejos polisacárido-proteína PSK o krestin [91], un β -glucano con enlaces (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) y (1 \rightarrow 6); y PSP [92], ambos aislados a partir de la seta *Coriolus versicolor*, y ampliamente comercializados en países como Japón y China como agentes inmunomoduladores y anticancerígenos [82].

Otro ejemplo de complejo polisacárido-proteína con actividad biológica es la biomolécula PPC, aislado por Kim y cols. en 2006 a partir del hongo *Phellinus linteus* [93] el cual presenta un importante efecto inmunoestimulador. Este complejo está formado por una porción polisacáridica (73% del polímero) de unidades de D-glucosa y D-manosa, y una parte proteica que supone un 16% del conjunto. Otros trabajos como el realizado por Gonzaga y cols. en 2005 y 2009 en la especie *Agaricus blazei* Murill [94, 95], demostraron la presencia de un complejo polisacárido-proteína con una potente actividad antitumoral. Dicho complejo estaba formado por una parte proteica, aproximadamente un 25,3% de la molécula, y una parte polisacáridica, aproximadamente un 37%, constituida principalmente por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 6) y α -(1 \rightarrow 4).

4.3.1.3. Otros compuestos bioactivos

A parte de los mencionados polisacáridos, los hongos presentan otros compuestos bioactivos de menor peso molecular, como terpenos y compuestos fenólicos.

Dentro del grupo de los **terpenos** se han podido identificar una serie de triterpenos, aislado a partir de *Ganoderma lucidum*, algunos de los cuales presentan actividad antiviral frente al Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo I (VIH-I) y contra el virus del herpes tipo I [96, 97]. Otros compuestos como los característicos sesquiterpenos aislados a partir de especies

pertenecientes al género *Lactarius*, parecen presentar, entre otras, una significativa actividad antimicrobiana [98].

Los **compuestos fenólicos** se caracterizan por su fuerte actividad antioxidante, demostrada en numerosos trabajos, principalmente *in vitro*, a partir de extractos acuosos y metanólicos de hongos comestibles [99-103]. También existen estudios que demuestran la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos obtenidos a partir de diferentes especies del género *Lactarius* [98, 104].

4.3.2. *Propiedades medicinales de los hongos*

4.3.2.1. Actividad antitumoral e inmunomoduladora

Los hongos son una enorme fuente de compuestos bioactivos con actividad anticancerígena. Los principales componente de hongos con actividad antitumoral e inmunomoduladora son los polisacáridos, aislados a partir de gran variedad de basidomicetes (TABLA 4) [7, 24, 105, 106].

Al contrario que otras drogas anticancerígenas tradicionales, los polisacáridos producen un efecto antitumoral indirecto mediante la activación de las respuestas inmunes humoral y celular del organismo, actuando así como modificadores de la respuesta biológica (MRBs), sin causar efectos dañinos al organismo [80]. El mecanismo de actuación involucra en primer lugar numerosos receptores de membrana de células del sistema inmune, como la dectina-1, receptores de tipo toll (TLRs), receptor del complemento 3 (CR3), lactosil ceramida (LacCer) y receptores scavengers [107, 108]. Esta interacción da lugar a la activación de multitud de vías de señalización celulares que acaban en una respuesta inmune efectiva y que envuelve a células inmunes como macrófagos, monocitos, células dendríticas, células “natural killer” (NK) y neutrófilos, estimulando a su vez la liberación de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y numerosas interleucinas (IL`s) que promueven la diferenciación de células T, células B y la activación de vías alternativas del complemento (FIGURA 17) [73, 81, 109, 110].

TABLA 4. Polisacáridos de hongos comestibles con propiedades antitumorales e inmunomoduladoras.

Especie	Estructura	T.m.	Actividad biológica	Ref
<i>Lactarius deliciosus</i> Gray	(1→6),(1→2)-α-manoxilano	11	Actividad antitumoral en ratones.	[62]
<i>Lactarius Rufus</i>	(1→3), (1→6)-β-glucano	110	Actividad antinociceptiva y anti-inflamatoria.	[111]
<i>Boletus speciosus</i> Forst	(1→4), (1→6)-α-Manogalactano	13,3	Fuerte actividad antioxidante.	[58]
<i>Boletus edulis</i>	(1→6), (1→3), (1→2)-α-glucoramnogalactano	113	Actividad inmunomoduladora.	[63]
<i>Ganoderma lucidum</i>	Complejo polisacárido-proteína: (1→4), (1→6), (1→2)-β-glucano	100	Actividad inmunomoduladora.	[112]
<i>Tricholoma matsutake</i>	Complejo polisacárido-proteína: (1→4), (1→6), (1→2)-α-glucano	360	Actividad inmunomoduladora. Modula la actividad del factor TGF-β1 <i>in vitro</i> .	[90].
<i>Agaricus blazei</i> Murill	Complejo polisacárido-proteína: α-(1→4), β-(1→6)-glucano	--	Actividad antitumoral frente sarcoma 180 mediante la activación de la inmunidad celular.	[95]
<i>Lentinus edodes</i>	(1→3), (1→4)-β-glucano	642	Actividad antitumoral frente sarcoma 180 en ratones BALB/C.	[113]
<i>Sarcodon aspratus</i>	(1→6)-α-glucano	670	Actividad inmunomoduladora.	[114]
<i>Pleurotus abalonus</i>	Complejo polisacárido-proteína: (1→4), β-glucano	1,6	Actividad antioxidante, antitumoral e hipoglucemiante. Actividad anti HIV-Reverso transcriptasa.	[88]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	(1→6), (1→2)-α-Galacto-β-glucano	24	Actividad inmunomoduladora.	[115]
<i>Pleurotus florida</i> blue variant	(1→6)-β-Glucano (1→3), (1→4)-β-glucano	202	Actividad antitumoral mediante la activación de la inmunidad celular.	[116]

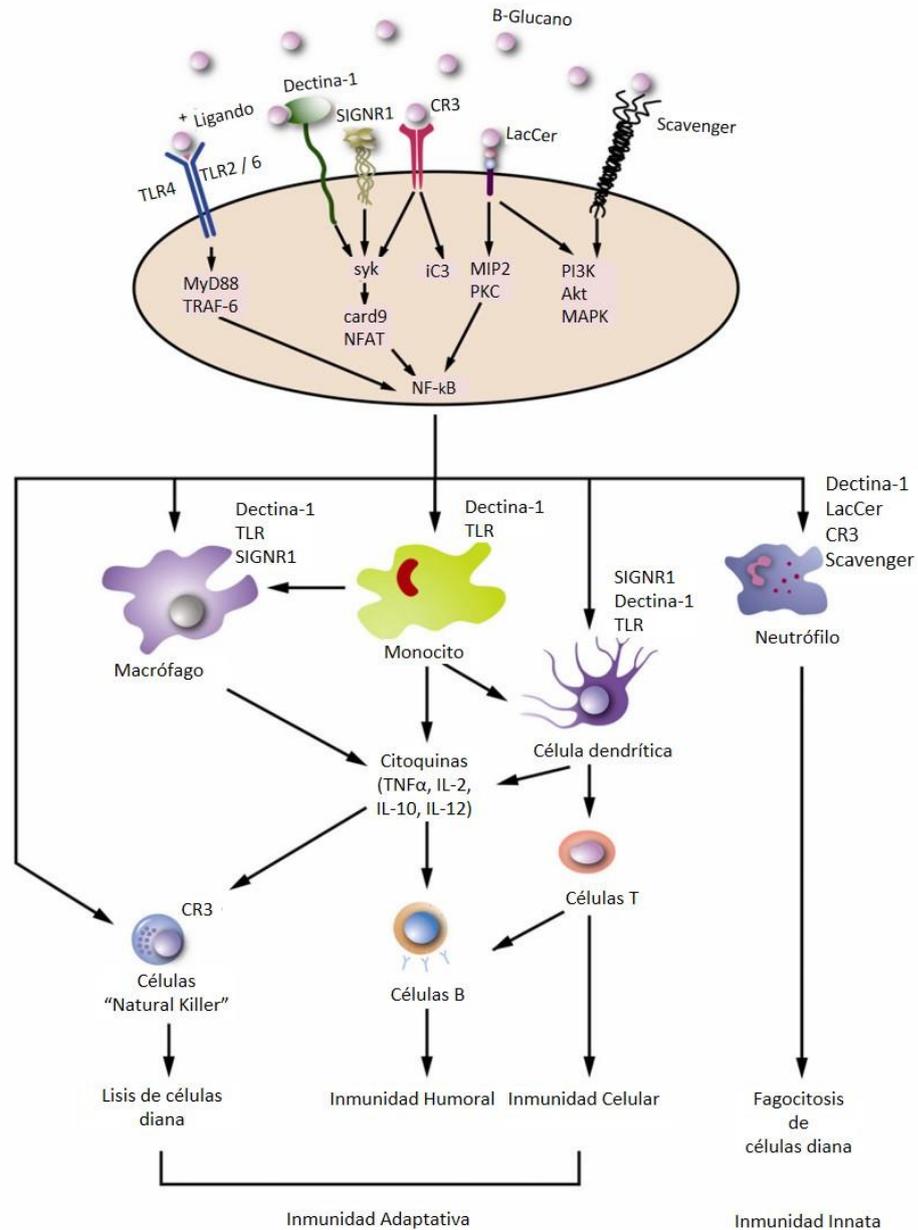


FIGURA 17. Mecanismo de acción de un β -glucanos como modulador del sistema inmune [110].

Estas propiedades bioactivas de los polisacáridos dependen fuertemente de su composición química, estructura y conformación, como se discutirá más extensamente en el apartado 4.3.3 de esta sección.

4.3.2.2. Actividad antimicrobiana

Los hongos, al igual que otros organismos y plantas, producen sustancias antibacterianas y antifúngicas como mecanismo de defensa ante el ataque de bacterias, levaduras, etc. A partir de ellos se han podido aislar diferentes compuestos con actividad

antimicrobiana ensayados *in vitro* e *in vivo* [25], eficaces para combatir infecciones bacterianas y fúngicas.

Ensayos como el de Hearst y cols. en 2009 [117], han demostrado el gran potencial antimicrobiano de extractos acuosos obtenidos a partir de especies tan consumidas como *L. edodes* y *P. ostreatus*. Otros estudios realizados con extractos de las especies *L. deliciosus*, *Sarcodon imbricatus* y *Tricholoma portentosum*, han demostrado una gran capacidad inhibitoria del crecimiento de bacterias patógenas como *Bacillus cereus* y *B. subtilis*, y de hongos patógenos como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* [104].

4.3.2.3. Actividad antiviral

La capacidad antiviral de hongos se ha descrito en especies como *G. lucidum*, la cual produce sustancias, entre las que destacan varios triterpenos, con una importante actividad antiviral frente al VIH-I [96]. Otras moléculas de mayor peso molecular, como las lectinas aisladas a partir de la especie *A. bisporus*, también mostraron una potente acción frente a este virus [118].

4.3.2.4. Efecto hipocolesterolémico, hipoglucémico y prebiótico

La mayoría de polisacáridos de hongos descritos anteriormente no son digeribles en el tracto intestinal humano, por lo que podríamos decir que actúan como una buena fuente de fibra dietética prebiótica, además de reducir la tasa de glucosa y de colesterol en sangre [81, 119].

Existen ensayos en ratas diabéticas que muestran una disminución significativa en los niveles de glucosa y colesterol sanguíneos, además de una mejor sensibilidad a la insulina, tras la introducción de la seta *P. eryngii* en su dieta [120]. Igualmente extractos acuosos de *P. pulmonaris* y de *P. citrinopileatus* han demostrado poseer poder antidiabético en ratas [121, 122].

Otros glucanos aislados a partir de los hongos *A. sylvaticus*, *L. edodes*, *G. lucidum*, *Hericium erinaceus* y *P. abalonus*, entre otros, han mostrado tener la capacidad de reducir el nivel de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre en animales y humanos [25, 88, 119, 123].

4.3.2.5. Efecto antioxidante

La capacidad antioxidante de determinados alimentos está cobrando gran importancia a la hora de combatir el estrés oxidativo. El metabolismo celular en su normal funcionamiento produce especies reactivas de oxígeno, conocidas como “radicales libres”. Cuando el organismo no es capaz de eliminar de forma natural estos compuestos, es cuando se produce el llamado estrés oxidativo, relacionado con la aparición de enfermedades graves como el cáncer.

Los hongos comestibles son una excelente fuente de compuestos con capacidad antioxidante como los fenoles, flavonoides, tocoferoles (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) y polisacáridos, entre otros. La cantidad y el perfil de éstos compuestos es variable en función de la especie analizada [28, 32, 124].

En la especie *A. bisporus* se han identificados gran número de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, entre los que predominan la tirosina, el catecol, ácidos fenólicos y el ácido vanílico [125]. Los polisacáridos de hongos también contribuyen en la defensa frente al estrés oxidativo mediante la potenciación de los sistemas de defensa del organismo. Trabajos recientes muestran la existencia de polisacáridos extraídos a partir de especies como *B. edulis* y *B. aereus* con una importante actividad oxidativa [126-129].

4.3.3. *Relación entre estructura y actividad biológica de los polisacáridos de hongos*

A pesar de que los trabajos sobre polisacáridos de hongos son cada vez más numerosos, la información existente respecto a cuales son los motivos estructurales implicados en su actividad biológica y en qué medida contribuyen a ella es contradictoria [82]. Los estudios científicos realizados hasta el momento relacionan esta actividad con ciertas características químicas y estructurales del polisacárido, como el tipo de azúcar constituyente, el tamaño molecular, la presencia de ramificaciones y el grado de ramificación, la longitud de las cadenas laterales, el tipo de enlace, etc [61, 130, 131].

Como ya se mencionó, podemos afirmar que en su mayoría son biomoléculas pertenecientes al grupo de los β -glucanos, y que suelen presentar una estructura común con enlaces β -(1 \rightarrow 3) y ramificaciones en posición O-6 [61, 69-72], las cuales parecen ser imprescindibles para su actividad antitumoral [73-75]. A parte de los bien conocidos β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucanos, en las últimas décadas se han aislado y descrito gran cantidad de polisacáridos biológicamente activos con diferente composición química y estructural [58, 59, 62, 63, 67, 132].

La conformación en triple hélice de los polisacáridos parece jugar un papel fundamental en su actividad inmunomoduladora [73, 133]. También se ha observado que el grado de ramificación y el tamaño molecular influyen, aunque en menor proporción [131]. Estudios como el de Andrade de Pires y cols. [61] y Bae y cols. [134] en 2013, ponen de manifiesto la relación entre el grado de ramificación del polisacárido y su actividad inmunomoduladora, observándose una actividad significativamente mayor en glicanos con un grado de ramificación del 30%. Zhang y cols. en 2005 [135] y Chen y cols. en 2009 [136] estudiaron la influencia de la conformación en triple hélice y el tamaño molecular sobre la actividad antitumoral. Observaron una disminución significativa de la actividad en el caso de polisacáridos desnaturalizados tras haber perdido su estructura terciaria en triple hélice, lo que ponía de manifiesto la enorme importancia de esta configuración. También se observó que un aumento en el tamaño molecular del polisacárido resultaba en un incremento significativo de la actividad antitumoral del mismo. A este respecto, numerosos trabajos han demostrado que, tanto moléculas de pequeño tamaño como moléculas excesivamente grandes, disminuyen drásticamente su actividad antitumoral, viéndose favorecida ésta en presencia de polisacáridos con un tamaño dentro del rango de $10\text{-}40 \times 10^4$ Da [7, 73, 135].

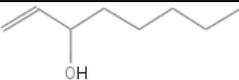
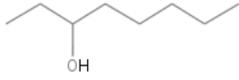
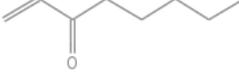
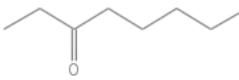
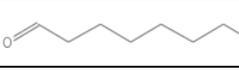
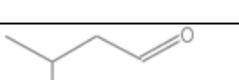
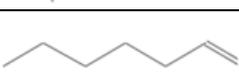
Aunque el mecanismo de acción de los polisacáridos de hongos es aún desconocido, si sabemos que el primer paso en la actividad inmunomoduladora y antitumoral de los polisacáridos es su interacción con los receptores celulares. La afinidad de los polisacáridos por estos receptores también está fuertemente influenciada por su naturaleza química, peso molecular y estructura terciaria [68, 131].

5. COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE HONGOS COMESTIBLES

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son un gran grupo de compuestos químicos basados en el carbono con un peso molecular inferior a 300 g/mol, se evaporan fácilmente a temperatura y a presión ambiental y son capaces de difundir a través del aire y el suelo [137]. Los hongos, al igual que la mayoría de organismos, liberan un gran espectro de COVs derivados de su metabolismo primario y secundario. El estudio de los COVs ha estado muy limitado hasta hace poco por la metodología y tecnología existentes. Es en las últimas décadas, con el desarrollo de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas (GC-MS), que se consigue un enorme avance en la “ciencia de la separación”. Esta es una tecnología con gran capacidad de separación y una enorme sensibilidad de detección, que se ha convertido en el método de elección en el estudio de los COVs [138, 139].

Sus excelentes propiedades sensoriales hacen de los hongos comestibles un ingrediente valioso y muy apreciado en la alta cocina. Hasta el momento se han descrito más de 250 compuestos responsables del aroma de setas. Su característico sabor y olor es debido a una compleja mezcla de COVs con diferentes características físicas y químicas, incluyendo alcoholes, aldehídos, compuestos aromáticos, ésteres, furanos, cetonas, terpenos y compuestos sulfurados.

TABLA 5. Principales compuestos orgánicos volátiles presentes en algunas especies de hongos comestibles, estructura química e impresión olfativa.

Compuesto	Estructura	Impresión olfativa	Especie	Ref.
1-octen-3-ol		Típico aroma a seta fresca	<i>Polyporus sulfureus</i> <i>Tricholoma matsutake</i>	[140] [141]
3-octanol		Olor a seta, nueces, graso	<i>T. matsutake</i> <i>Calocybe indica</i>	[141] [142]
1-octen-3-ona		Intenso olor a seta, metálico	<i>P. sulfureus</i> <i>T. matsutake</i> <i>Calocybe indica</i>	[140] [141] [142]
3-octanona		Olor a seta, a hierba, cítrico y frutal	<i>T. matsutake</i> <i>P. ostreatus</i> <i>C. indica</i> <i>A. bisporus</i> , <i>P. florida</i>	[141] [143] [142] [144]
Octanal		Olor a naranja, graso y meloso	<i>P. ostreatus</i> <i>C. indica</i>	[143] [142]
2-octenal		Olor frutal, fresco	<i>A. bisporus</i> , <i>P. florida</i> <i>P. abalonus</i> , <i>P. eryngii</i>	[144] [145]
3-metilbutanal		Olor afrutado, a almendras y malta	<i>A. bisporus</i> <i>P. eryngii</i>	[146] [145]
Hexanal		Olor acre, a hierba cortada	<i>T. matsutake</i> <i>C. indica</i> <i>B. edulis</i> , <i>P. ostreatus</i>	[141] [142] [147]
2-pentil-furano		Olor a judías verdes, mantequilla	<i>P. eryngii</i> , <i>P. abalone</i>	[145]
Benzaldehido		Olor a almendras, suave y especiado	<i>T. matsutake</i> <i>P. ostreatus</i> <i>B. edulis</i> , <i>P. ostreatus</i>	[141] [143] [147]
Benceneacetaldehido		Olor floral, a hierba	<i>T. matsutake</i>	[141]

Generalmente el aroma a setas no está formado por una única molécula, sino que es el resultado de una mezcla característica de compuestos. Sin embargo a veces la nota de olor más importante y característico de cada hongo puede venir dada por un único compuesto (TABLA 5), como por ejemplo el alcohol 1-octen-3-ol, responsable del típico aroma dulce, la cetona 3-octanona que aporta notas frutales y el benzil alcohol, responsable del aroma a almendras.

Los metabolitos secundarios volátiles de 8 carbonos presentes en la gran mayoría de hongos (1-octen-3-ol, 1-octen-3-ona, 3-octanona y 3-octanol, entre otros), son la clave del típico aroma a seta fresca, constituyendo entre el 44% al 97 % del total de la fracción volátil [49]. El alcohol alifático 1-octen-3-ol junto con la cetona 2-octen-3-ona, son los compuestos C8 que más contribuyen a este típico aroma y a su característico sabor [141, 144]. Numerosos mecanismos han sido propuestos como vía de síntesis de los compuestos C8. Se ha podido demostrar que su origen biosintético, y en particular el del alcohol 1-octen-3-ol, es la oxidación y ruptura de los ácidos grasos linoleico y linolénico en presencia de enzimas lipoxigenasas [49, 148, 149].

Otros grupos responsables del aroma de setas y trufas son las moléculas volátiles con grupos fenoles, responsables del típico olor a almendras. Entre los más comunes se encuentran el benzaldehído y el benzil alcohol, presentes en gran número de setas como *B. edulis*, *Craterellus cornucopioides* o *P. ostreatus*. Se cree que estos compuestos son metabolitos secundarios derivados de la L-fenilalanina [148]. El grupo de los terpenos comprende un amplio rango de compuestos orgánicos. Pequeñas cantidades de monoterpenos han sido detectadas como constituyentes volátiles en algunas especies de hongos entre los que se encuentran el α -pinene, camphene, limonene y linalool. En general estos terpenos volátiles son los compuestos responsables del aroma floral, cítrico y dulce de las setas [150]. Ciertas especies de hongos presentan compuestos volátiles característicos de la especie, como el lanthionin, una molécula sulfurada presente en *L. edodes*; y los compuestos 2-metilpropanol, 2-metilbutanol, 2-butanol, 2-butanone, 2-metilbutanal, sulfides y derivados característicos del género *Tuber*.

Los COVs de hongos presentan un importante papel en los ecosistemas naturales. Las oxilipinas o compuestos derivados de la peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico y linolénico, están envueltas en la regulación de la respuesta ambiental y el desarrollo de hongos, plantas y animales, actuando como señal intra- e intercelular. Las oxilipinas más estudiadas en hongos son el 1-octen-3-ol y sus análogos 3-octanol y 3-octanona, y son las encargadas de inducir la esporulación y la conidiación [151].

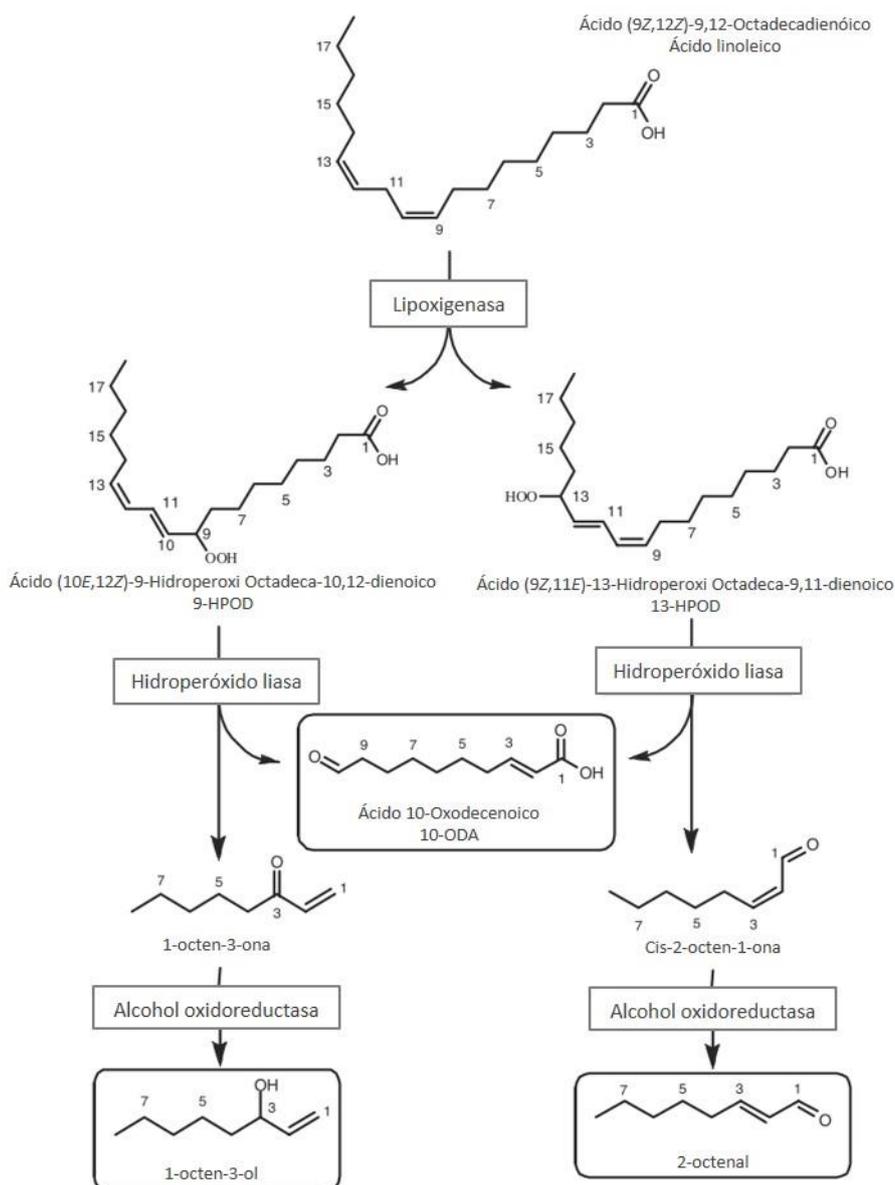


FIGURA 18. Ruta metabólica propuesta por Tressl y cols. en 1980 [152] para la síntesis de los compuestos orgánicos volátiles derivados de ocho carbonos o compuestos C8. Esquema modificado tomado de Combet y cols. 2006 [49].

La variabilidad en el perfil de COVs entre especies es muy alta, y puede ser atribuida a múltiples factores, incluyendo genotipo, estado de desarrollo del hongo y las condiciones de crecimiento. Esta variabilidad permite que los COVs puedan ser considerados como biomarcadores para la identificación de determinadas especies y de los distintos estadios de crecimiento [153]. El estudio de los COVs es una herramienta importante en quimiotaxonomía, la cual se basa en las diferencias cualitativas y cuantitativas de los perfiles de COVs emitidos por las diferentes especies. Estas diferencias sirven como marcadores para la determinación de los distintos grupos taxonómicos fúngicos de una forma poco invasiva. Recientemente, grupos

como el de Müller y cols. en 2013 [154], mediante el análisis de los COVs producidos por diferentes especies, han conseguido predecir con una probabilidad de entre el 90-99% el grupo ecológico al que pertenecen: ectomicorrícicos, patógenos o saprófitos.

Según el estudio realizado por Bertran-García y cols. en 1997 [155], los compuestos C8 aislados a partir de la especie *P. ostreatus*, exhibieron una fuerte actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Otros estudios muestran su gran utilidad en la detección de patógenos de plantas [156, 157] y de potenciales patógenos humanos como el *Aspergillus fumigatus* causante de la aspergilosis [158]. También es destacable el uso de hongos, en especial el género *Trichoderma*, como agentes de biocontrol. Este hongo produce un gran número de COVs como pironas, sesquiterpenos, etc, y otros metabolitos secundarios no volátiles con gran actividad antibiótica. Esto, junto con su capacidad para parasitar y matar otros hongos, le hace ser un exitoso biofungicida [159, 160].

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas la demanda de hongos comestibles, tanto cultivables como silvestres, ha experimentado un gran aumento debido a su sabor y textura únicas, además de por su gran valor nutricional y por ser una importante fuente de compuestos biológicamente activos y funcionales. Nutricionalmente hablando constituyen una buena fuente de proteínas y de fibra alimentaria, poseen un bajo contenido en grasas y son una buena fuente de vitaminas, minerales y compuestos antioxidantes. Entre sus propiedades funcionales destacan su actividad antitumoral, inmunomoduladora y antiinflamatoria, asociadas mayormente a su contenido en polisacáridos y complejos polisacárido-proteína. Igualmente los hongos comestibles son enormemente apreciados por su contenido en compuestos orgánicos volátiles (COVs) de gran interés comercial y científico. Además de presentar funciones biológicas y farmacológicas interesantes, los COVs de hongos son de potencial importancia como marcadores taxonómicos y factores fundamentales en la evaluación de la calidad de productos alimentarios.

El creciente interés comercial y farmacológico de los hongos comestibles en general, y la notable escasez de estudios referentes a las especies silvestres y cultivables incluidas en este trabajo (*Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Calocybe Gambosa*, *Hygrophorus marzuolus*, *Cantharellus cibarius* y *Pleurotus ostreatus*), justifican el esfuerzo realizado en la búsqueda de nuevos compuestos potencialmente bioactivos y funcionales, en especial polisacáridos, y en el estudio y comparación de los COVs presentes, con gran importancia taxonómica y de alto valor en las industrias alimentaria y del perfume.

OBJETIVOS

Por todo esto los dos objetivos generales de este trabajo fueron la extracción y caracterización de polisacáridos y el estudio del perfil de COVs en hongos comestibles.

Para alcanzar cada uno de los objetivos principales planteados, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Extracción de polisacáridos a partir de cuatro especies de hongos silvestres comestibles, *B. edulis*, *L. deliciosus*, *C. cibarius* y *Calocybe Gambosa*:
 - a. Obtención de polisacáridos bajo distintas condiciones de extracción: en agua fría (25C), caliente (100C) y alcalina (NaOH 1M)
 - b. Caracterización química y conformacional de los polisacáridos obtenidos para cada una de las setas estudiadas.

1. Estudio del perfil de COVs en seis especies de hongos comestibles, *B. edulis*, *L. deliciosus*, *C. Gambosa*, *H. marzuolus*, *C. cibarius* y *P. ostreatus*:
 - a. El análisis del perfil de COVs de las seis especies de setas estudiadas en su estado fresco inicial y tras el proceso de liofilización.
 - b. Estudio del efecto del proceso de liofilización sobre el contenido en compuestos orgánicos volátiles.
 - c. Determinación de las diferencias en el perfil de COVs entre muestras frescas y liofilizadas.

CAPÍTULO I:

Aislamiento y extracción de polisacáridos de hongos comestibles

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO Y REACTIVOS

Para el presente trabajo se utilizaron los cuerpos fructificantes de cuatro especies comestibles de Basidiomicetes. Todas ellas fueron especies silvestres recolectadas en la provincia de Soria entre los años 2009 y 2011 (TABLA 1) (FIGURA 1).

Todas las muestras, a su llegada al laboratorio, fueron lavadas con agua destilada, troceadas y congeladas a -80°C para su posterior liofilización (TelstarCryodos 80). Las muestras liofilizadas fueron homogeneizadas en un molinillo M20 (IKA Werke) hasta obtener un tamaño de partícula inferior a 500 µm. Estos hongos pulverizados se almacenaron al vacío en bolsas de plástico (Tecnotrip) a 4°C para su posterior análisis.

TABLA 1. Clasificación taxonómica de las especies de hongos estudiadas. Todos los géneros pertenecen a la división Basidiomicota.

<i>Familia</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>	<i>Nombres comunes</i>	<i>Procedencia</i>
<i>Boletaceae</i>	<i>Boletus</i>	<i>edulis</i>	Miguel Hongo	Recolectada, Soria
<i>Russulaceae</i>	<i>Lactarius</i>	<i>deliciosus</i>	Níscalo Nícalo Rovellón	Recolectada, Soria
<i>Cantharellaceae</i>	<i>Cantharellus</i>	<i>cibarius</i>	Rebozuelo Setas de haya	Recolectada, Soria
<i>Tricholomataceae</i>	<i>Calocybe</i>	<i>gambosa</i>	Lansarón Mansarón Perrochico	Recolectada, Soria

El agua utilizada fue tratada en un sistema de purificación de agua ultrapura Milli-Q (Advantage A10, Millipore). Los patrones D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-ribosa, D-xilosa; los patrones dextrano T-6, T-40, T-70, T-100, T-500 y T-2000; la enzima *Pronasa E* producida por *Streptomycesgriseus* y los polisacáridos utilizados como patrones conformacionales, laminarín producida por *Laminaria digitata* y Curdlan producida por *Alcaligenes faecalis*, fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. El resto de químicos usados fueron todos de calidad analítica.



FIGURA 1. Imágenes de las cuatro especies de hongos estudiados.

2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS A PARTIR DE HONGOS COMESTIBLES

La composición química y estructura de los polisacáridos presentes en hongos es tan diversa que es difícil definir un protocolo universal para su extracción y análisis. Características como su peso molecular, el grado de ramificación, la presencia de grupos ionizables, el tipo de enlace glicosídico presente y la homogeneidad de la unidad estructural, junto con las características de la matriz que los rodea, afectan fuertemente a su extracción y solubilidad [161]. Los métodos de extracción más comunes en la extracción de polisacáridos de setas son las extracciones en medio acuoso a diferentes temperaturas o en soluciones alcalinas. Está también muy extendido el tratamiento inicial de la muestra con solventes orgánicos como etanol, acetona, metanol o cloroformo, lo que no sólo elimina las moléculas de bajo tamaño molecular o los compuestos polares como lípidos, fenoles y terpenos, sino que además facilita la completa separación de los polisacáridos de otros componentes presentes en la pared celular [69, 162].

Para este trabajo, las muestras fueron sometidas a una extracción metanólica inicial, con el fin de eliminar compuestos fenólicos, ácidos grasos, monosacáridos, aminoácidos y otras moléculas de bajo peso molecular que pudieran estar presentes en las muestras. Para ello, aproximadamente 3 g de seta liofilizada y pulverizada fueron extraídos en metanol (MeOH) (5 ml MeOH/g de seta liofilizada) a una temperatura de 60°C, en reflujo y continua agitación durante 24 h. La suspensión resultante se centrifugó a 15.000 rpm, durante 30 min a 4°C y se reservó el sobrenadante. El residuo se volvió a extraer dos veces más con MeOH, y los sobrenadantes obtenidos se unieron al anterior. Se obtuvo así un *residuo 1* (FIGURA 2), sobre el que se siguió trabajando, y un extracto rico en polifenoles.

Tras esta primera extracción metanólica, se realizaron tres extracciones sucesivas utilizando como disolventes agua a diferentes temperaturas (extracción de polisacáridos solubles en agua) y una solución alcalina de NaOH 1 M (10 ml/g de polvo de seta), capaz de romper enlaces de hidrógeno inter- e intra-moleculares, permitiendo así la liberación al medio y extracción de polisacáridos no solubles en agua (FIGURA 2).

La primera extracción, sobre el *residuo 1*, se realizó en agua destilada a temperatura ambiente (25° C), seguida de una segunda extracción, sobre el *residuo 2*, en agua destilada a 100° C. La última extracción, sobre el *residuo 3*, se realizó con una solución alcalina de NaOH 1 M a una temperatura de 100° C. Todas las extracciones se mantuvieron durante 24 h en agitación y reflujo. Las suspensiones resultantes fueron centrifugadas a 20.000 rpm a 4°C durante 30 min. Los sobrenadantes se reservaron y los residuos obtenidos se volvieron a resuspender dos veces en el disolvente inicial con el fin de extraer todo el material soluble en las distintas condiciones. Se centrifugaron nuevamente y los sobrenadantes obtenidos se unieron a los anteriores obteniéndose los sobrenadantes *FRIO*, *CALIENTE* y *ALCALINO*.

A los sobrenadantes *FRIO*, *CALIENTE* Y *ALCALINO* se les añadió ácido tricloroacético (*Tri-Chloroacetic Acid*, *TCA*) a una concentración final del 20% (p/v) con el objetivo de precipitar y eliminar las proteínas libres presentes. Tras centrifugar y descartar los precipitados se neutralizaron los sobrenadantes a pH 7.0 con una solución acuosa de NaOH (1M). Se les añadió NaCl al 1% (p/v) y seguidamente se precipitaron los polisacáridos con etanol 96% (2:1, v/v) durante 24 h a 4°C. El precipitado se recogió por centrifugación (14.000 rpm, 20 min) y fue lavado y clarificado primero con etanol al 96% y finalmente con acetona. De cada uno de los sobrenadantes se obtuvieron las tres fracciones correspondientes: *FRÍA (FF)*, *CALIENTE (FC)* y *ALCALINA (FA)*, que fueron congeladas y liofilizadas. Para su análisis posterior fueron finamente molidas en un mortero de mármol y almacenadas a 4°C. Todas las extracciones se realizaron por triplicado con el fin de calcular sus rendimientos. Todo este proceso se detalla en la FIGURA 2.

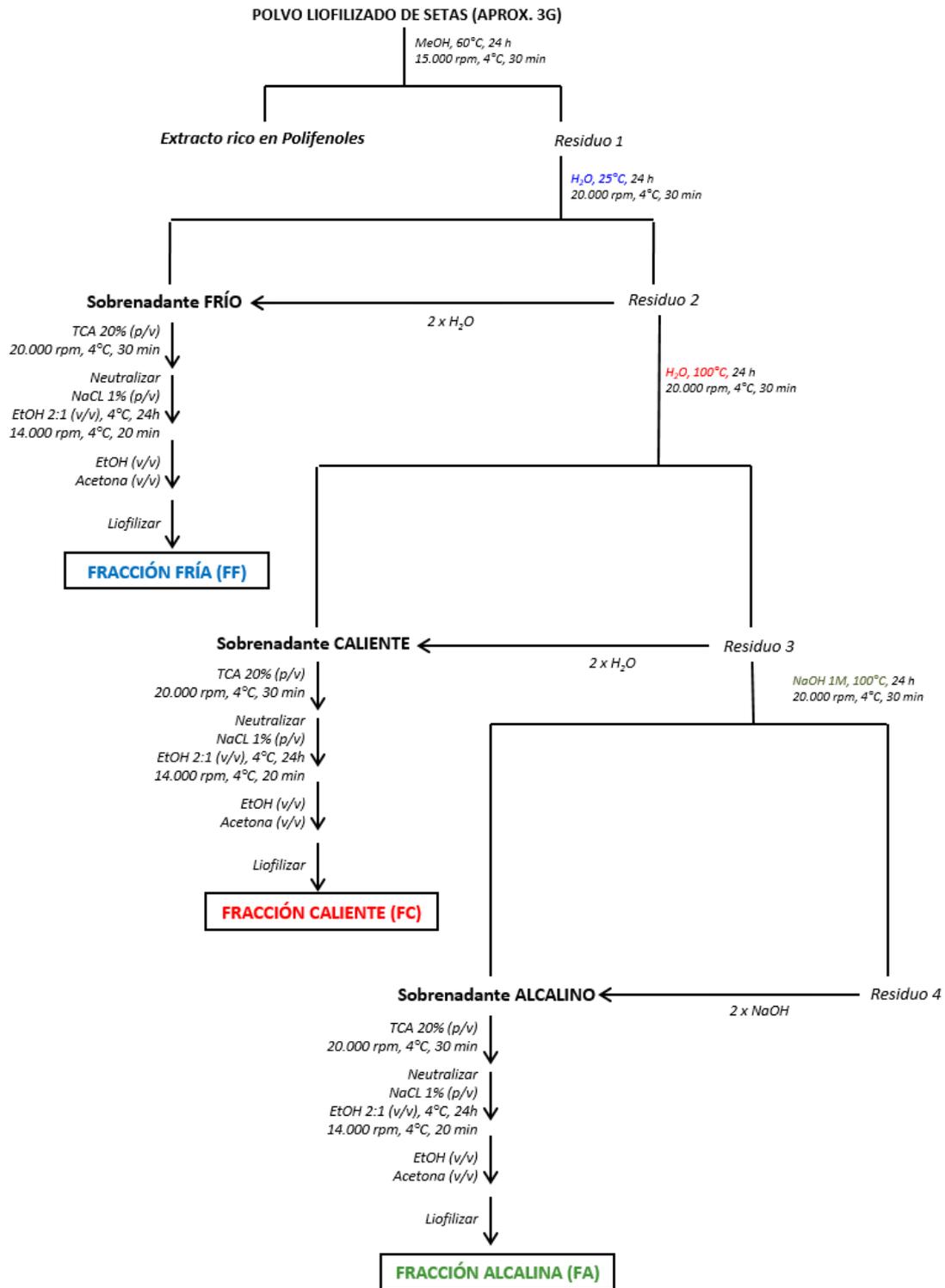


FIGURA 2. Diagrama esquemático de la extracción y fraccionamiento de los polisacáridos.

3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE GLICOPROTEÍNAS

Con el fin de purificar más las fracciones obtenidas, se eliminaron las proteínas que pudieran estar unidas de forma covalente a los polisacáridos. Para ello se trataron enzimáticamente con una proteasa tipo XIV o *Pronasa E*, una mezcla de enzimas proteolíticas muy inespecíficas producida por *Streptomyces griseus*, adecuadas para una digestión extensa o total de proteínas.

Las distintas fracciones (*FF*, *FC*, *FA*) fueron disueltas en tampón fosfato sódico, pH 7.5, durante 24h y se mantuvieron en agitación a 50°C, para así asegurar su total solubilización. Las condiciones de temperatura, tiempo, pH y concentración enzima/substrato utilizadas fueron las siguientes: 50° C, 24 h, pH de 7,5 y 3,5 U (unidades) de pronasa E por cada 10 mg de polisacárido. Transcurrido este tiempo se inactivó la enzima aumentando la temperatura a 100°C durante al menos 15 min. La suspensión resultante se centrifugó a 15.000 rpm, durante 20 min a 25°C y se descartó el precipitado de proteínas. El sobrenadante clarificado fue precipitado con etanol (2:1, v/v) durante 24 h a 4°C.

4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La determinación de proteínas se realizó siguiendo el método desarrollado por Bradford en 1976 [163]. Esta determinación se basa en la unión directa del colorante Coomassie Blue G-250 a la estructura terciaria de las proteínas y péptidos en solución (especialmente arginina) (FIGURA 3). El colorante al unirse a la proteína cambia de color rojizo a azulado y su máximo de absorción en el espectro UV-visible cambia de 465 nm a 595 nm. Este cambio es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra [163].

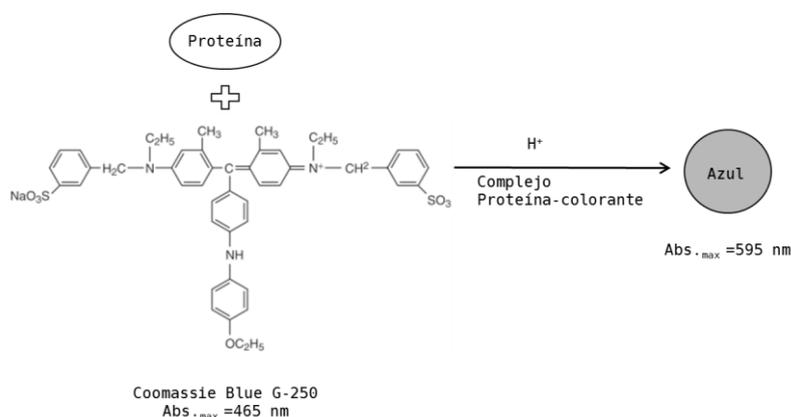


FIGURA 3. Diagrama esquemático de la reacción del colorante Coomassie Blue G-250 para la determinación de proteínas.

Se prepararon soluciones por triplicado de cada una de las fracciones a analizar con aproximadamente 2 mg de muestra/ml. El método utilizado se adaptó a placas de 96 pocillos. Para ello se añadieron 40 μl de cada solución problema a los pocillo y se mezclaron con 160 μl del reactivo de Bradford diluido 1:3,5. Se dejó desarrollar el color un mínimo de 5 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de placas Fluostar Omega (BMG LabTech). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La representación de las distintas concentraciones del patrón utilizado, albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumine, BSA*) ($\mu\text{g/ml}$), frente a los datos de Absorbancia (nm), permitió obtener la siguiente recta de calibrado (FIGURA 4). Los datos finales fueron expresados como el porcentaje total de proteínas presente en la fracción, calculado mediante la ecuación: % Proteínas totales= Concentración de Proteínas (mg/ml) / Volumen de Muestra (mg/ml) x 100.

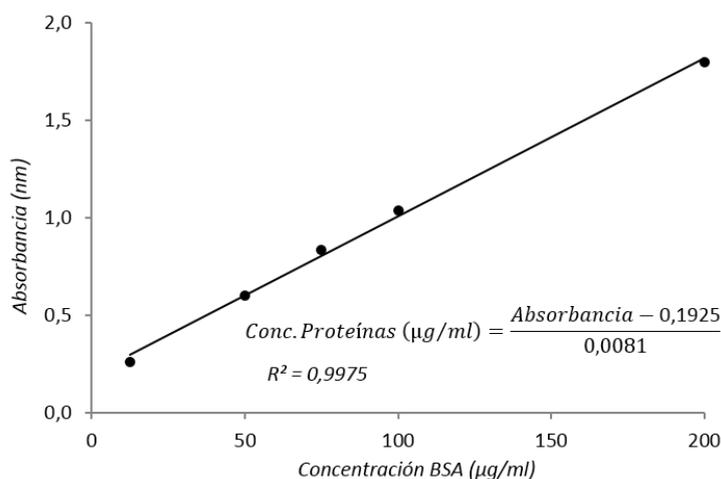


FIGURA 4. Recta de calibrado para la determinación de proteínas, con albúmina de suero bovina (BSA) como patrón.

5. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

Los hidratos de carbono son particularmente sensibles a ácidos fuertes y a altas temperaturas. En estas condiciones se forman derivados del furano que, al condensarse consigo mismos y con otros compuestos fenólicos, dan lugar a complejos de color naranja muy estables que presentan un máximo de absorción a 490 nm para hexosas y a 480 nm para pentosas en el espectro UV-visible. El color desarrollado es proporcional a la concentración de azúcares y da un valor aproximado de la concentración total de carbohidratos en la muestra objeto de estudio [164].

Para la determinación de los carbohidratos totales en las fracciones obtenidas en este trabajo, se ha seguido el método de Dubois y cols. [165] con algunas modificaciones [166].

Se prepararon soluciones acuosas de las distintas fracciones con una concentración final de 1 mg de fracción/ml. Para asegurarnos de su total solubilización las soluciones se agitaron durante 24 h a 40°C. A partir de estas soluciones se prepararon diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) de las cuales se tomaron 200 µl que fueron transferidos a tubos de ensayo de vidrio. Seguidamente se añadieron 200 µl de una solución de fenol al 5%. Rápidamente (1-3 segundos) y directamente sobre la superficie de la muestra, se añadió 1 ml de ácido sulfúrico al 96%. Se agitó la mezcla vigorosamente y se dejó enfriar hasta que se desarrolló el color. Se transfirieron 200 µl a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia máxima a 490 nm en un lector de placas Fluostar Omega (BMG LabTech) (FIGURA 5). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.



FIGURA 5. Lector de placas Fluostar Omega (BMG LabTech) utilizado para la lectura de absorbancia en el espectro UV en la determinación de proteínas y carbohidratos totales.

La recta de calibrado se realizó con glucosa como patrón. La representación de las distintas concentraciones del patrón de glucosa (mg/ml), frente a los datos de Absorbancia (nm), nos permitió obtener la recta de calibrado mostrada en la FIGURA 6. Los datos finales fueron expresados como el porcentaje total de carbohidratos presente en la fracción, calculado mediante la ecuación: % Carbohidratos totales= Carbohidratos Totales (mg/ml) / Volumen de Muestra (mg/ml) x 100.

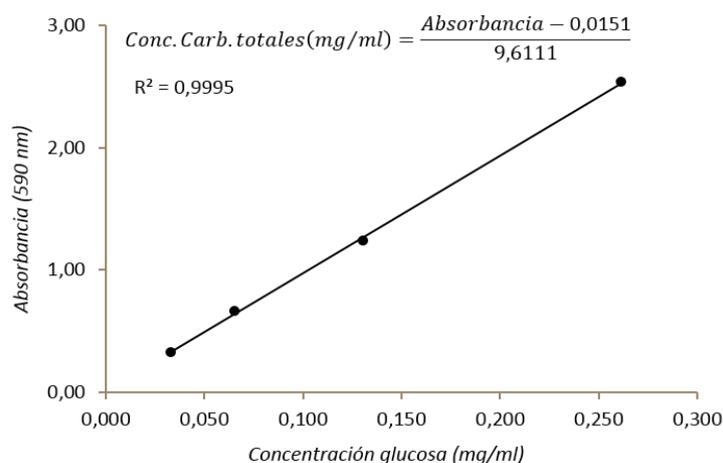


FIGURA 6. Recta de calibrado para la determinación de carbohidratos totales, con glucosa como patrón.

6. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MOLECULAR

6.1. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR DE ALTA RESOLUCIÓN (HPSEC)

Una de las técnicas más populares en la determinación del tamaño molecular de polímeros es la cromatografía de exclusión molecular de alta resolución (High Performance Size Exclusion Chromatography, HPSEC). Es una técnica de cromatografía líquida basada en la separación de moléculas en función de su tamaño y su volumen hidrodinámico en disolución. La muestra se hace circular a través de una fase estacionaria que actúa a modo de tamiz y que consiste en un lecho de partículas porosas con un tamaño de poro estrechamente controlado. Las moléculas de mayor peso molecular no pueden penetrar en los poros y eluyen de la columna en primer lugar, seguidas por las moléculas de menor tamaño que sí penetran y recorren caminos mucho más largos, siendo el tiempo de retención inversamente proporcional al peso molecular del polímero (FIGURA 7). El detector más utilizado para la detección de carbohidratos es el detector de Índice de Refracción (Refraction Index Detector, RID). La cromatografía de exclusión molecular de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción (HPSEC-RID), juega un papel importante en la separación de proteínas y otras macromoléculas de interés biológico como los polisacáridos, proporcionando un método de separación y aislamiento sumamente rápido, simple y poco agresivo [167].

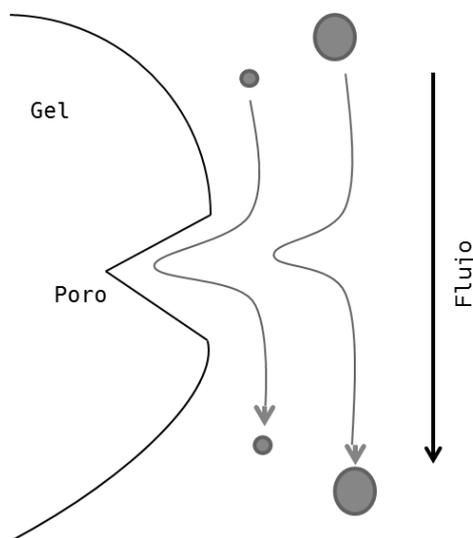


FIGURA 7. Diagrama esquemático del modelo de separación en cromatografía de exclusión molecular. Las moléculas de mayor tamaño son más rápidas en su desplazamiento a través de la columna [167].

6.2. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MOLECULAR

El tamaño molecular estimado para las fracciones *FF*, *FC* y *FA*, fue determinado mediante cromatografía de exclusión molecular de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción (HPSEC-RID). Para ello en primer lugar se resuspendieron unos 2 mg de cada fracción (*FF*, *FC* y *FA*) en 1 ml de agua destilada que se mantuvieron durante 24h en agitación a 50°C para asegurar su total solubilización. Fueron filtrados a través de filtros de membrana de nylon de 0,45 μm para eliminar cualquier resto insoluble. Todas las fracciones se analizaron antes y después de ser hidrolizadas con *Pronasa E* (ver punto 3), con el fin de observar posibles cambios en el tamaño molecular que pudieran indicar la presencia de glicoproteínas.

El análisis cromatográfico se realizó en un sistema HPLC Alliance® 2695 (Waters) acoplado a un detector de índice de refracción Alliance® 2414 (Waters) (FIGURA 8).



FIGURA 8. Equipo HPLC-RID empleado en el análisis del tamaño molecular de las distintas fracciones obtenidas.

Todos los eluyentes fueron filtrados y desgasificación durante 10-15 minutos en baño de ultrasonidos ElmaTranssonic “TI-H-55” antes del análisis. Para estabilizar la temperatura del detector y obtener una línea base estable, se fijó la temperatura y se mantuvo el flujo de fase móvil durante al menos 10 horas antes de la inyección. Las condiciones de trabajo se indican en la TABLA 2.

TABLA 2. Condiciones cromatográficas utilizadas en el cromatógrafo HPSEC-RID para el análisis del tamaño molecular de las distintas fracciones.

<i>Columna</i>	Ultrahydrogel Linear (Waters) (7,8 x 300 mm) Límite de exclusión molecular : 7×10^6 Da
<i>Eluyente</i>	NaNO ₃ 0,1 M con NaN ₃ al 0,03%.
<i>Temperatura de la columna</i>	25°C
<i>Temperatura del detector</i>	30°C
<i>Velocidad de flujo</i>	0,2 ml/min
<i>Volumen de inyección</i>	20 µl
<i>Tiempo de registro</i>	90 min

El calibrado de la columna se realizó con patrones dextrano T-6, T-40, T-70, T-100, T-500 y T-2000, de pesos moleculares 6.000 Da, 40.000 Da, 70.000 Da, 100.000 Da, 500.000 Da y 2.000.000 Da, respectivamente. Los pesos moleculares aproximados se obtuvieron por comparación de los tiempos de retención de los polisacáridos problema con los de los dextrano comerciales de peso molecular conocido. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La recta de calibrado obtenida, en la que se representan los tiempos de retención (*TR*, *min*) obtenidos para los patrones de tamaño molecular conocido, frente al \log_{10} del tamaño molecular ($\log_{10} T_m$), se muestra en la FIGURA 9.

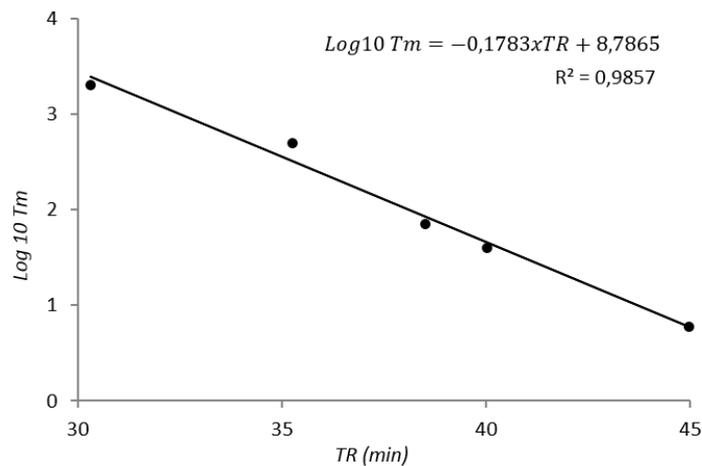


FIGURA 9. Recta de calibrado de la columna Ultrahydrogel Linear (Waters), obtenida en las condiciones descritas en la TABLA 2 con los patrones dextranos de peso molecular conocido.

7. IDENTIFICACIÓN DE MONÓMEROS DE LA CADENA POLISACARÍDICA

7.1. HIDRÓLISIS ÁCIDA

Los enlaces glicosídicos presentes en la cadena polisacáridica son susceptibles de ser rotos en presencia de ácidos fuertes y alta temperatura. No todos los tipos de enlaces se rompen al mismo tiempo ni en la misma proporción, por lo que el tiempo de hidrólisis debe ser el suficiente para romper todos los enlaces sin degradar los monómeros resultantes. El ácido más usado para este fin es el ácido trifluoroacético (*Trifluoroacetic acid, TFA*), práctico gracias a su volatilidad pudiendo ser eliminado fácilmente tras la hidrólisis [164].

Aproximadamente 5 mg de las distintas fracciones fueron hidrolizados con 0,5 ml de TFA al 99%. La reacción se realizó en autoclave a 120°C durante 60 min [168]. Se evaporó el ácido restante bajo corriente de nitrógeno hasta su total sequedad.

7.2. DERIVATIZACIÓN DE MONOSACÁRIDOS A ACETATOS DE ALDITOL

Los productos derivados de la hidrólisis de polisacáridos son sustancias no volátiles que deben ser derivatizados para su posterior análisis por Cromatografía de Gases (*Gas Chromatography, GC*). Para ello son reducidos a alditoles y seguidamente acetilados para dar los acetatos de alditol correspondientes, compuestos volátiles aptos para su análisis por GC.

Para la obtención de los acetatos de alditol a partir de las fracciones hidrolizadas, se siguió el método desarrollado por Blakeney y cols. [169].

Las diferentes fracciones anteriormente hidrolizadas y desecadas son reducidas a alditoles mediante la adición de 100 µl de agua destilada, 20 µl de amoníaco 15 M, y 1 ml de borohidruro de sodio (NaBH_4) 0,5 M disuelto en Dimetilsulfóxido (DMSO). Se incubó la reacción durante 90 min a 40°C con agitación constante. El exceso de NaBH_4 se eliminó añadiendo 100 µl de ácido acético 18 M. Los alditoles obtenidos fueron convertidos en sus correspondientes acetatos de alditol mediante su tratamiento con 200 µl del catalizador 1-metilimidazol y 2 ml del agente acetilante, anhídrido acético a 25°C durante 10 min y en continua agitación. Para eliminar el exceso de anhídrido acético se añadió 1 ml de agua destilada.

Para la extracción de los acetatos de alditol resultantes se añadió 1 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 min. Se dejó reposar para permitir la separación de las distintas fases, centrifugando si fuera necesario, y se recuperó la fase clorofórmica inferior. Se realizaron dos lavados de la fase clorofórmica con agua destilada, agitando y dejando separar

las fases para volver a recuperar la fase clorofórmica. Se retiró todo resto de agua al añadir sulfato de magnesio anhidro y se filtró por gravedad en papel de celulosa. Se eliminó el cloroformo bajo corriente de nitrógeno hasta su total sequedad y se redisolvió de nuevo en MeOH de calidad analítica para su posterior análisis.

7.3. CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)

La cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas (GC-MS), es una potente técnica instrumental capaz de separar mezclas en sus componentes individuales, identificarlos y proporcionar información cuantitativa y cualitativa sobre sus cantidades relativas y sus estructuras químicas. Es un método de elección en la separación, identificación y cuantificación de acetatos de alditol y acetatos de alditol parcialmente metilados (AAPMs) [170].

Los acetatos de alditol obtenidos anteriormente (Ver punto 7.2) fueron separados en un equipo de cromatografía de gases de la casa Perkin Elmer, modelo Clarus 500, equipado con una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 μ m, Perkin Elmer) (FIGURA 10). El gas portador fue helio con un flujo constante de 1 ml/min (25 psi) en modo splitless. La temperatura del inyector se mantuvo a 280°C. Los componentes de la muestra se separaron mediante un programa de temperatura que comienza isotérmicamente a 40°C mantenido durante 10 min, para subir a razón de 12°C/min hasta los 70°C; seguidamente se subió a razón de 6°C/min hasta los 240°C, temperatura que se mantuvo durante 10 min.

La identificación y cuantificación de los acetatos de alditol se realizó mediante un detector de masas de la casa Perkin Elmer, modelo Clarus 560, acoplado al cromatógrafo de gases (FIGURA 10). La ionización se llevó a cabo por impacto electrónico (*ElectronImpact*, EI). La temperatura de la fuente de iones fue de 220°C y se trabajó con un potencial de ionización de 70 eV. El tiempo total de análisis fue de 47 min. El procesado de los datos se realizó con el programa TurboMass versión 5.4.2. La identificación de los picos se realizó por similitud con los espectros de masas recogidos en la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) y mediante comparación con los tiempos de retención y espectros de masas de los patrones en el caso de que éstos estuvieran disponibles. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos en los cromatogramas obtenidos por GC-MS. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.



FIGURA 10. Equipo GC-MS empleado en el análisis de la estructura y enlaces de las fracciones.

8. ANÁLISIS ESTRUCTURAL

8.1. ANÁLISIS DE METILACIÓN

Para la metilación de las distintas fracciones se utilizó el método introducido por Ciucanu y Kerek en 1984 [171], con algunas adaptaciones [172].

Un requisito para la reacción de metilación es que los polisacáridos estén bien solubilizados en DMSO, para así evitar una metilación incompleta y una conclusión errónea sobre su estructura. Para ello se disolvieron unos 10 mg de cada fracción polisacáridica en DMSO y se dejaron en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Se añadieron 50 mg de NaOH previamente desecado[173] y se disolvieron durante 1 h en un baño de ultrasonidos ELMA “X-Tra 30H”. Seguidamente se añadieron 0,5 ml yoduro de metilo, proveedor de grupos metilo, y se agitó en frío durante 30 min. Se paró la reacción al añadir 1 ml de agua destilada.

Para la extracción de los polisacáridos metilados se añadió 1 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 min. Se dejó reposar permitiendo la separación de las distintas fases, centrifugando si fuera necesario, y se recuperó la fase clorofórmica inferior. Se realizaron dos lavados de la fase clorofórmica con agua destilada, agitando y dejando separar las fases para volver a recuperar la fase clorofórmica. Se retiró todo resto de agua al añadir sulfato de magnesio anhidro y se filtró por gravedad en papel de celulosa. Se eliminó el cloroformo bajo corriente de nitrógeno hasta su total sequedad.

Las muestras metiladas fueron hidrolizadas con 0,5 ml de TFA, en autoclave a 120°C durante 60 min. Los restos de ácido fueron eliminados bajo corriente de nitrógeno. Los monómeros parcialmente metilados obtenidos tras la hidrólisis fueron reducidos a acetatos de alditol mediante el método de Blakeney y cols., descrito anteriormente en el punto 7.2 [169].

Los AAPMs obtenidos fueron extraídos con 1 ml de cloroformo y agitando vigorosamente durante 15 min. Se dejó reposar para permitir la separación de las distintas fases, centrifugando si fuera necesario, y se recuperó la fase clorofórmica inferior. Se realizaron dos lavados de la fase clorofórmica con agua destilada, agitando y dejando separar las fases para volver a recuperar la fase clorofórmica. Se retiró todo resto de agua al añadir sulfato de magnesio anhidro y se filtró por gravedad en papel de celulosa. Se eliminó el cloroformo bajo corriente de nitrógeno hasta su total sequedad y se redisolvió de nuevo en MeOH calidad analítica para su posterior análisis.

8.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)

Los AAPMs obtenidos, fueron separados en un equipo de cromatografía de gases de la casa Perkin Elmer, modelo Clarus 500, acoplado a un detector de masas de la casa Perkin Elmer, modelo Clarus 560, y equipado con una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 μ m, Perkin Elmer). Las condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases y del espectrómetro de masas son las descritas anteriormente para la detección de acetatos de alditol.

La identificación de los picos se realizó por similitud con los espectros de masas recogidos en la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) y mediante comparación con los tiempos de retención de los patrones en el caso de que éstos estuvieran disponibles. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos en los cromatogramas obtenidos por GC-MS. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

El grado de ramificación (GR) se calculó según la siguiente fórmula [134, 174]:

$$\text{Grado de ramificación (GR)} = (\text{NT} + \text{NR}) / (\text{NT} + \text{NR} + \text{NL})$$

Donde NT, NR y NL se corresponden con el porcentaje relativo de residuos terminales, puntos de ramificación y residuos lineales de la cadena, respectivamente.

8.3. CONFORMACIÓN ESTRUCTURAL EN TRIPLE HÉLICE (ROJO CONGO)

El Rojo Congo (disodium 4-amino-3-[[4-[4-[(1-amino-4-sulfonatophthalen-2-yl)diazenyl]phenyl] phenyl]diazenyl]naphthalene-1-sulfonate) (FIGURA 11) es un colorante diazoico ampliamente utilizado en la industria textil y con aplicaciones, entre otras, en bioquímica e histología para teñir preparaciones microscópicas, especialmente citoplasma y eritrocitos y como test diagnóstico en la amiloidosis [175].

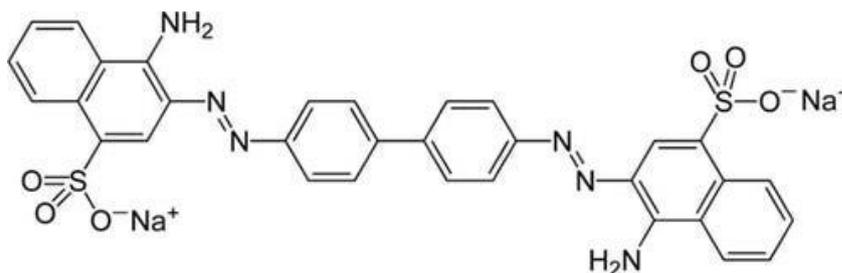


FIGURA 11. Estructura química del colorante Rojo Congo.

El rojo congo es también utilizado ampliamente en el estudio de la estructura conformacional de polisacáridos [176, 177]. Tiene la capacidad de unirse de forma específica a polisacáridos con conformación en triple hélice, formando complejos que presentan una desviación en la longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) con respecto a la del rojo congo libre en solución acuosa (FIGURA 12) [178].

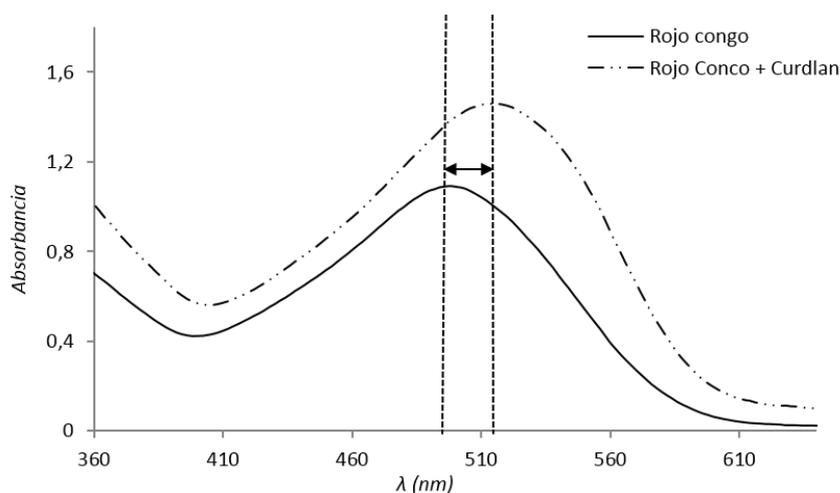


FIGURA 12. Espectro de absorción de rojo congo en presencia y ausencia del polisacárido con estructura en triple hélice Curdlan. Se observa una desviación en la λ_{max} para el complejo Rojo Congo+Curdlan con respecto al colorante libre.

Los polisacáridos al perder la conformación en triple-hélice, ya sea en ambiente alcalino [176, 179] o disuelto en DMSO [180], dejan de formar complejos con el colorante y la λ_{max} apenas se desvía de los valores iniciales del rojo congo libre. Existe relación entre la concentración de NaOH de la solución y la desviación de la λ_{max} observada, pudiéndose ver el rango de concentración en el que se produce la transición conformacional, el polisacárido pierde su conformación en triple hélice y deja de formar complejo con el Rojo Congo (FIGURA 13).[176].

El comportamiento conformacional de las distintas fracciones polisacáridicas en solución se determinó mediante un análisis de transición desde la conformación en triple hélice a hélice simple siguiendo el método descrito por Ogawa en 1972 [178] modificado para nuestras muestras.

Como patrones conformacionales de triple hélice se utilizaron los glucanos comerciales laminarín y curdlan, y un patrón dextrano de 40 KDa como control de cadena sencilla aleatoria.

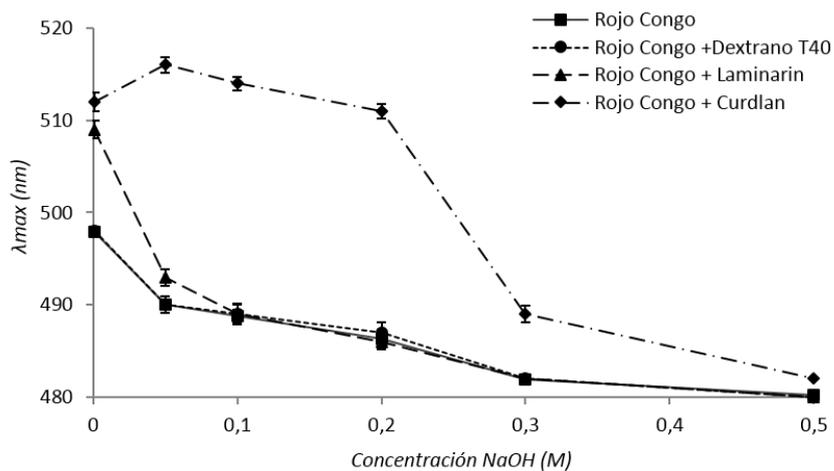


FIGURA 13. Longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) del colorante rojo congo a 25°C a diferentes concentraciones de NaOH, en presencia de patrones polisacáridicos con estructura en triple hélice (laminarín, Curdlan) y estructura de cadena simple aleatoria (Dextrano T-40).

En la FIGURA 13 se pueden observar diferentes comportamientos de los patrones polisacáridicos frente a un aumento de la concentración de NaOH. Para Curdlan y Laminarín se ve una disminución considerable en la λ_{max} a concentraciones de NaOH superiores a 0,05 M y 0,2 M respectivamente, lo que indicaría la disociación del complejo rojo congo-polisacárido y por tanto una disrupción de la estructura en triple hélice. Por el contrario, el patrón lineal dextrano T40 no forma complejo con el colorante por lo que no presenta desviación en su λ_{max} .

Se prepararon soluciones de las distintas fracciones conteniendo 1 mg/ml de muestra. Se añadió una solución acuosa de rojo congo a las soluciones polisacáridicas para obtener una concentración final de 80 μ M del colorante. Se midió el espectro de absorción visible entre 220-680 nm y se determinaron las λ_{max} para cada fracción en un lector de placas Fluostar Omega (BMG LabTech). Los polisacáridos que presentan conformación ordenada en triple-hélice forman complejos con el rojo congo los cuales son evidenciados por una desviación en la λ_{max} . Para determinar el punto de transición de conformación ordenada en triple-hélice a cadena sencilla, se midió la λ_{max} de soluciones de rojo congo en presencia de los polisacáridos problema y polisacáridos control a diferentes concentraciones de NaOH (0,001 M; 0,05 M; 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M y 0,5 M). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

9. DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS POLISACÁRIDO-PROTEÍNA MEDIANTE SDS-PAGE

9.1. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La electroforesis es un método en el cual moléculas cargadas son separadas mediante la aplicación de un campo eléctrico. Durante el proceso de electroforesis, la movilidad de las biomoléculas dependerá, entre otros factores, de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Bajo la influencia del voltaje aplicado, las diferentes moléculas presentes en la muestra se moverán a través de una matriz a diferentes velocidades, siendo así separadas en el proceso. Esta matriz puede estar formada por distintos materiales como papel, acetato de celulosa, geles de agarosa o geles de poliacrilamida. La electroforesis en geles de poliacrilamida (*polyacrilamide gel electrophoresis, PAGE*) es uno de los métodos más usados en la purificación, análisis y caracterización de proteínas. Es un método fácil, rápido y económico capaz de detectar hasta 1 μ g de proteína. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización del monómero de acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y del monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). La polimerización se inicia por la liberación de radicales libres a partir del persulfato de amonio (PSA) por la acción del catalizador N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (FIGURA 14). El tamaño de poro del gel y por tanto su rango de separación viene determinada por la proporción de acrilamida + bisacrilamida (T %), siendo menor el poro cuanto mayor sea este porcentaje. La mayoría de proteínas se separan bien en un rango del 5-12% [181].

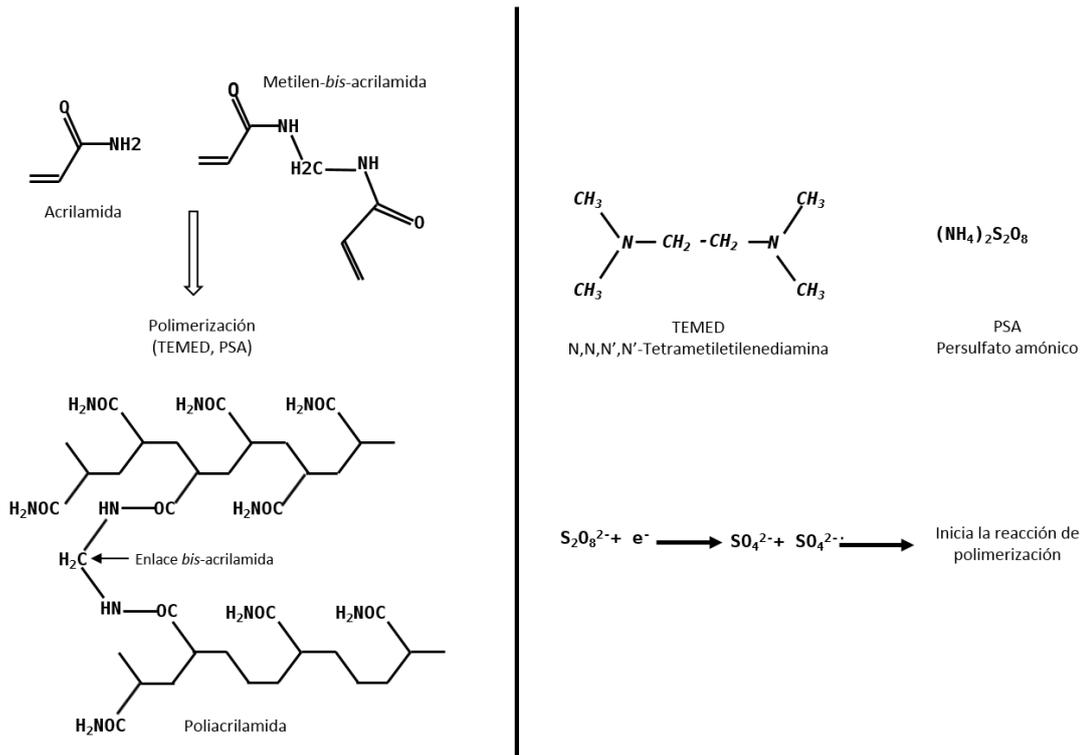


FIGURA 14. Reacción de polimerización de la acrilamida

La detección de proteínas y glicoproteínas se realiza mayoritariamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de sodio dodecil sulfato o SDS (SDS-PAGE), donde la separación de las biomoléculas viene determinada exclusivamente por su masa molecular y por el tamaño de poro del gel [182]. El SDS es un detergente aniónico fuerte que desnaturiza las proteínas y rompe las interacciones no-covalentes con otras moléculas. Interacciona con la mayoría de proteínas en una proporción fija de 1,4 g de SDS por g de proteína. Se forma un complejo SDS-proteína con una carga neta negativa y uniforme que enmascara la carga de la proteína. Estos complejos presentan la misma forma y relación carga/masa, por lo que la separación ocurrirá de acuerdo a sus masas moleculares y gracias al efecto tamiz molecular impuesto por los poros del gel de poliacrilamida [181]. Para asegurar la desnaturización de las proteínas se utilizan también agentes reductores como el β -mercaptoetanol, que rompe los enlaces disulfuro (S-S) que pudieran existir.

En el caso de glicoproteínas, se observa un comportamiento anómalo en electroforesis SDS-PAGE de estos complejos polisacárido-proteína, principalmente debido a [183, 184]:

- La porción de carbohidratos de la molécula puede ser muy elevada (más del 90%), por tanto la cantidad de SDS unido no es constante, ya que este detergente se une prioritariamente a proteínas. Esto da lugar a un descenso en la relación carga/masa,

reduciéndose así la movilidad de la glicoproteína durante la electroforesis que se comportará como si tuviera un peso molecular mayor, pudiéndose sobrestimar su tamaño hasta en un 30%.

- Las cadenas laterales de los carbohidratos pueden interaccionar de forma inespecífica con componentes del gel de electroforesis, perturbando su migración durante la electroforesis, dando lugar a la dispersión de las bandas que resultan ser más anchas de lo habitual.

Esto complica el proceso y resulta complicado determinar y predecir el comportamiento de complejos polisacárido-proteínas en electroforesis.

Para la electroforesis SDS-PAGE se utilizó un sistema de electroforesis vertical *Mini-Protean II* (Bio-Rad) siguiendo el método descrito por Laemmli en 1970 [185].

El tamaño de poro del gel de poliacrilamida se ajustó en función del tamaño de las muestras. El gel separador se preparó al 7,5 % (p/v) de poliacrilamida en tampón Tris-HCL 0,375 M, pH 8,8; SDS 0,1 % (p/v); persulfato amónico 0,05 % (p/v) y TEMED 0,075 % (p/v). El gel concentrador se preparó al 5% (p/v) de poliacrilamida en tampón Tris-HCL 0,12 M, pH 6,8; SDS 0,1 % (p/v); persulfato amónico 0,1 % (p/v) y TEMED 0,1 % (p/v). Como tampón de electroforesis se utilizó Tris-HCL 25 mM, pH 8,3; Glicerol 192 mM y SDS 0,1 % (p/v).

Se utilizaron aproximadamente 2 µg/µl y 30 µg/µl de muestra para la detección de polisacáridos y proteínas respectivamente. Fueron solubilizadas en tampón de muestras Laemmli para SDS-PAGE de Bio-Rad (Tris-HCL 62,5 mM, pH 6,8; SDS 2%; glicerol 25%; 2-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,001%). Inmediatamente antes de la electroforesis las muestras se incubaron a 100°C durante 5 min. El volumen de muestra aplicado por pocillo fue de 15 µl.

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente aplicando una diferencia de potencial constante de 100 V durante 110 min, empleándose una fuente de alimentación *PowerPac™ Basic* (Bio-Rad).

No se utilizaron patrones glicoproteicos de tamaño molecular durante el análisis de electroforesis debido a las dificultades para elegir un patrón con un comportamiento cromatográfico equivalente a los polisacáridos problema. El único objetivo con este

experimento fue poner de manifiesto la presencia o ausencia de complejos polisacárido-proteína en nuestras fracciones.

9.2. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS Y COMPLEJOS POLISACÁRIDO-PROTEÍNA EN GELES SDS-PAGE

Para detectar la presencia de glicoproteínas en los geles de poliacrilamida se realizaron en paralelo tinciones específicas para proteínas (Tinción con *Coomassie Brilliant Blue R-250*) y polisacáridos (Reacción del *Ácido peryódico-Reactivo de Schiff*).

9.2.1. Detección de proteínas con *Coomassie Brilliant Blue R-250*

El colorante más utilizado para proteínas en SDS-PAGE es el Azul de Coomassie, *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Es un colorante trifenilmetano disulfonado que tiñe las bandas de proteínas de color azul brillante. Es una tinción simple con baja sensibilidad, detectando hasta 0,2-0,6 µg de proteína por banda [186].

Se utilizó una solución acuosa de *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,26 % (p/v); metanol 45,4 % (v/v) y ácido acético 9,2 % (v/v). La incubación de los geles fue de aproximadamente 30 min, con agitación constante. El desteñido de los geles se realizó con una solución acuosa de metanol 20% (v/v) y ácido acético 7,5 % (v/v), siendo renovada frecuentemente hasta que los geles quedaron con un fondo transparente (unas 4 horas aproximadamente).

El análisis de las bandas proteicas se realizó con un densitómetro GS800 (Bio-Rad) y el software *QuantityOne* (Bio-Rad).

9.2.2. Detección de polisacáridos mediante la reacción del *Ácido peryódico-Reactivo de Schiff*

Muchas de las técnicas utilizadas en la detección de glicoproteínas en geles de poliacrilamida están basadas en la reacción del *Ácido peryódico-Reactivo de Schiff* o PAS (*Periodic Acid Schiff*). El ácido periódico oxida los grupos 1,2-glicol de los azúcares dando origen a grupos aldehídos que reaccionan con el reactivo de Schiff produciendo un complejo de color púrpura.

Para evidenciar la presencia de glicoproteínas en nuestros geles se utilizó la reacción de PAS siguiendo el método descrito por Van-Seuningen y Davril en 1992 [187].

Todos los pasos detallados a continuación se realizaron en un baño de agua en continua agitación. En primer lugar se trató con una solución de fijación de ácido tricloroacético 20 % (p/v), seguido de un lavado con agua destilada. Tras eliminar los restos de ácido tricloroacético,

los carbohidratos fueron oxidados con una solución de ácido peryódico 0,7 % (v/v) y ácido acético 5 % (v/v) en completa oscuridad. Se lavó el exceso de ácido peryódico varias veces con agua destilada y se revelaron las bandas de glicoproteína con el reactivo de Schiff en oscuridad. Se lavó con una solución de disulfito potásico 5 % (p/v) y ácido acético 5 % (v/v), y por último se realizaron varios lavados con una solución de metanol 5 % (v/v) y ácido acético 7,5 % (v/v) y otro con una solución de metanol 50 % (v/v) y ácido acético 30 % (v/v), seguido de un paso de rehidratación del gel con una solución de glicerol 5 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v). Estos últimos pasos se realizaron a una temperatura de 50°C (TABLA 3). El análisis de las bandas de glicoproteínas se realizó con un densitómetro GS800 (Bio-Rad) y el software *QuantityOne* (Bio-Rad).

TABLA 3. Tinción mediante la reacción del *Ácido peryódico-Reactivo de Schiff* o PAS.

<i>Reactivos</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
<i>Ácido Tricloroacético 20%.</i>	5	20°C
<i>Agua destilada</i>	5	20°C
<i>Ácido peryódico 0,7% + Ácidoacético 5%</i>	10	20°C
<i>Agua destilada</i>	2	20°C
<i>Agua destilada</i>	2	20°C
<i>Reactivo de Schiff</i>	10	20°C
<i>Disulfito potásico 5% + Ácidoacético 5%.</i>	5	20°C
<i>MeOH 5% + ácidoacético 7,5%.</i>	10	50°C
<i>MeOH 5% + ácidoacético 7,5%.</i>	5	50°C
<i>MeOH 50% + ácidoacético 30%.</i>	10	50°C
<i>MeOH 50% + ácidoacético 30%.</i>	5	50°C
<i>MeOH 50% + ácidoacético 30%.</i>	2	50°C
<i>Glicerol 5% + ácidoacético 10%.</i>	10	50°C

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico se utilizó el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Los datos fueron expresados como media \pm desviación estándar de tres, cuatro o seis análisis, dependiendo del estudio realizado.

En todos los casos, los valores de las medias fueron analizados por el test de Student para comprobar la existencia de diferencias significativas entre las fracciones tratadas y no tratadas con *Pronasa E* y las diferencias en el comportamiento de congo red en presencia de los

distintos polisacáridos obtenidos. Se realizó este análisis para cada una de las especies estudiadas.

En la comparación de resultados entre las distintas fracciones y las diferentes especies de hongos estudiadas, los valores obtenidos fueron analizados usando el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas entre los valores, las medias fueron comparadas usando el test de Tukey HSD ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES

Tras someter las muestras de setas al protocolo anteriormente descrito, los rendimientos de extracción fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = [A/A_0] \times 100,$$

donde A es el peso seco de la fracción polisacáridica obtenida y A₀ es el peso seco de la muestra inicial utilizada. Los valores calculados se muestran en la TABLA 1.

TABLA 1. Comparación de los rendimientos de extracción obtenidos en las distintas fracciones, fría (FF), caliente (FC) y alcalina (FA), para cada una de las cuatro especies de hongos comestibles analizadas.

Especies analizadas	Rendimiento (%)		
	FF	FC	FA
<i>B. edulis</i>	2,80 ± 0,76a,A	3,20 ± 0,82a,A	2,90 ± 0,17a,C
<i>L. deliciosus</i>	1,10 ± 0,14b,BC	1,90 ± 0,12b,B	4,60 ± 0,85a,B
<i>C. cibarius</i>	1,03 ± 0,03b,C	0,80 ± 0,01b,C	9,49 ± 0,67a,A
<i>C. gambosa</i>	2,03 ± 0,11b,AB	1,37 ± 0,03c,BC	5,18 ± 0,20a,B

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n=3.

Misma letra minúscula en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

Misma letra mayúscula en la misma columna significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

Como era de esperar en este tipo de extracciones, los valores de rendimiento obtenidos fueron bajos, inferiores al 10% [126]. En el caso de *B. edulis* los rendimientos de extracción se mantuvieron constantes en las tres fracciones, con un valor aproximado del 3%. En general los rendimientos obtenidos en las fracciones FF y FC fueron significativamente inferiores al resto, con valores comprendidos entre el 0,8% en la FC de *C. cibarius* y el 2,03% en la FF de *C. gambosa*. Sin embargo, en las fracciones alcalinas se observó un significativo aumento del rendimiento de extracción, siendo más llamativo en el caso de *C. cibarius* con un valor cercano al 10%. Esta variación en el rendimiento podría deberse a las diferencias químicas y estructurales de los polisacáridos obtenidos y a las distintas condiciones de extracción utilizadas.

2. PROTEÍNAS TOTALES EN LOS EXTRACTOS

El contenido en proteínas totales de las fracciones obtenidas fue determinado mediante el método desarrollado por Bradford en 1976 [163]. Los datos son mostrados en la TABLA 2.

TABLA 2. Comparación del contenido en proteínas obtenido en las distintas fracciones, fría (FF), caliente (FC) y alcalina (FA), para cada una de las cuatro especies de hongos comestibles analizadas.

Especies analizadas	Proteínas totales (%)		
	FF	FC	FA
<i>B. edulis</i>	1,97 ± 0,34a,A	1,71 ± 0,34a,C	2,10 ± 0,03a,B
<i>L. deliciosus</i>	0,07 ± 0,00c,C	1,57 ± 0,15a,C	0,71 ± 0,03b,D
<i>C. cibarius</i>	1,05 ± 0,05c,B	3,52 ± 0,11b,A	5,03 ± 0,43a,A
<i>C. gambosa</i>	0,88 ± 0,01c,B	2,43 ± 0,13a,B	1,39 ± 0,09b,C

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n=3.

Misma letra minúscula en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

Misma letra mayúscula en la misma columna significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

En general el contenido en proteínas es bajo (aproximadamente el 2%), siendo prácticamente cero en el caso de la FF de *L. deliciosus* (0,07%). Por otro lado, las fracciones FC y FA correspondientes a la especie *C. cibarius* presentan un contenido proteico significativamente superior al del resto.

La naturaleza de este contenido proteico será estudiada más adelante con el fin de determinar si estas proteínas están formando parte de complejos polisacárido-proteína o si se trata de restos de proteínas libres no eliminadas en el proceso de purificación.

3. CARBOHIDRATOS TOTALES

El porcentaje de carbohidratos totales obtenido para cada fracción, determinado mediante el método Fenol-Sulfúrico [165, 166], se indica en la TABLA 3.

TABLA 3. Comparación del porcentaje de carbohidratos totales obtenido en las distintas fracciones, fría (FF), caliente (FC) y alcalina (FA), para cada una de las cuatro especies de hongos comestibles analizadas.

Especies analizadas	Carbohidratos totales (%)		
	FF	FC	FA
<i>B. edulis</i>	90,73 ± 2,37b,A	97,48 ± 1,35a,A	86,33 ± 1,54c,A
<i>L. deliciosus</i>	85,24 ± 1,87b,B	94,07 ± 3,72a,A	85,16 ± 0,30b,A
<i>C. cibarius</i>	55,64 ± 1,52c,D	64,10 ± 1,31b,B	74,73 ± 2,66a,B
<i>C. gambosa</i>	66,10 ± 2,03b,C	61,96 ± 1,26b,B	83,07 ± 2,36a,A

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n=3.

Misma letra minúscula en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

Misma letra mayúscula en la misma columna significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

Los porcentajes de carbohidratos totales obtenidos para la mayoría de fracciones supera el 80%, a excepción de las tres fracciones de *C. cibarius*, con valores del 55,64% para FF, 64,10% para FC y 74,73% para FA, y las fracciones FF y FC de *C. gambosa*, con unos valores del 66,10% y 61,96% respectivamente.

4. TAMAÑO MOLECULAR

La determinación del tamaño molecular se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción (HPSEC-RID). Se analizaron todas las fracciones tanto hidrolizadas como no hidrolizadas con *Pronasa E*. En cada caso se indica la existencia o no de diferencias significativas en tiempos de retención y/o perfil cromatográfico tras el tratamiento de hidrólisis.

La denominación de las fracciones en los resultados presentados a continuación se hará mediante: dos letras correspondientes a las iniciales de la especie (ej. *B. edulis*: *Be.*), seguidas de dos letras correspondientes a la fracción (*FF*, *FC* y *FA*), y un número romano en caso de la presencia de más de un pico.

4.1. *Boletus edulis*

Los cromatogramas obtenidos para las fracciones *BeFF* y *BeFC* de *B. edulis* no mostraron diferencias significativas tras la hidrólisis con *Pronasa E*, manteniéndose los tiempos de retención y el número de picos en ambos casos (FIGURA 1).

Los resultados muestran la presencia de un único pico en ambas fracciones (FIGURA 2), el cual aparece a un tiempo de retención aproximado de 33,8 min y con tamaño molecular estimado de 560 KDa (TABLA 4). Como se puede observar no existen diferencias significativas entre las fracciones *BeFF* y *BeFC* en cuanto a tiempo de retención y tamaño molecular, por lo que podría tratarse del mismo polisacárido.

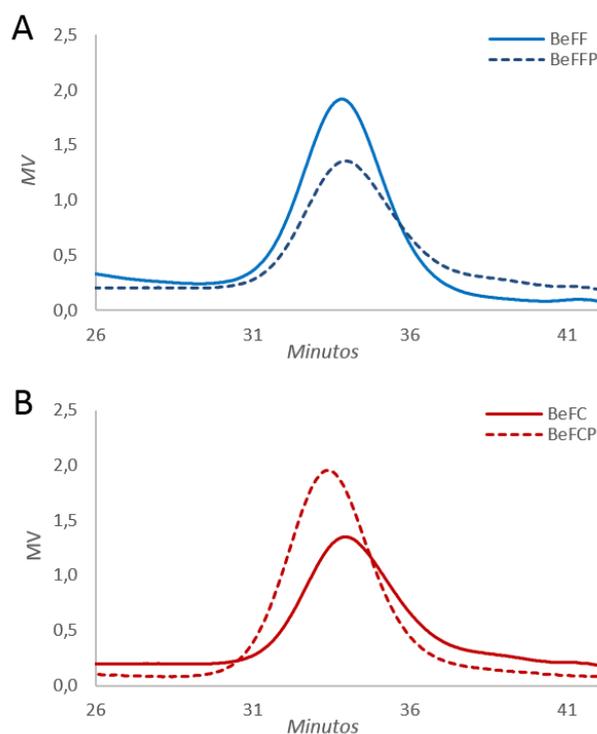


FIGURA 1. Cromatogramas de exclusión molecular correspondientes a las fracciones FF (A) y FC (B) de *B. edulis* antes (*BeFF* y *BeFC*) y después (*BeFFP* y *BeFCP*) de la hidrólisis con *Pronasa E*.

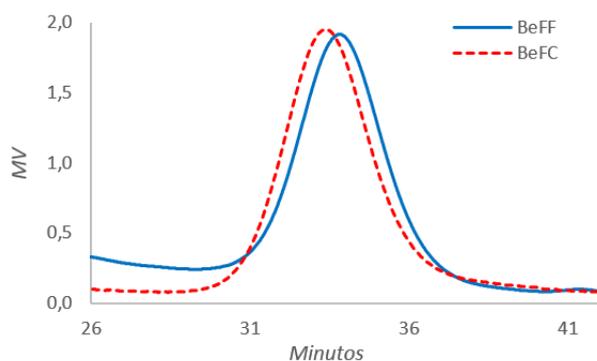


FIGURA2. Cromatograma de exclusión molecular correspondiente las fracciones *BeFF* y *BeFC* de *B. edulis*.

En la fracción alcalina *BeFA* se obtuvieron dos picos solapados (*BeFA-I* y *BeFA-II*) a unos tiempos de retención de 34,13 min y 39,44 min respectivamente. En este caso si se observó un cambio significativo tras la hidrólisis con la proteasa.

Como se muestra en la FIGURA 3, existe una inversión evidente en las áreas relativas de los picos *BeFA-I* y *BeFA-II* antes y después de la hidrólisis con *Pronasa E*. Esta inversión indicaría la presencia de un complejo polisacárido-proteína, *BeFA-I*, cuya porción polisacáridica, *BeFA-II*,

se ve liberada tras la hidrólisis con *Pronasa E*, lo cual se confirmará posteriormente mediante electroforesis SDS-PAGE.

Los tamaños moleculares estimados para *BeFA-I* y *BeFA-II* fueron de 503 y 57 KDa respectivamente.

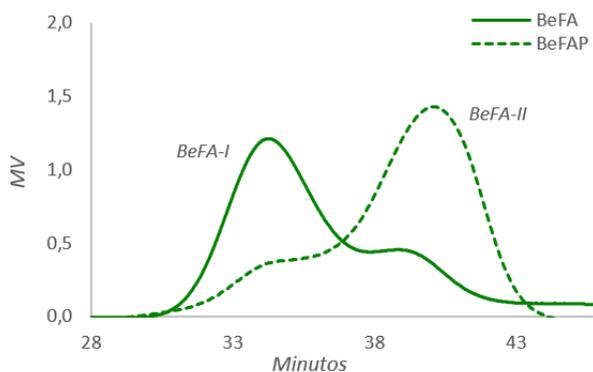


FIGURA 3. Comparación de los cromatogramas de exclusión molecular correspondientes a la fracción alcalina de *B. edulis* antes (*BeFA*) y después de la hidrólisis con *Pronasa E* (*BeFAP*).

TABLA 4. Tamaños moleculares estimados para las distintas fracciones de *B. edulis* (*BeFF*, *BeFC* y *BeFA*).

Fracción	TR ¹	T. mol. ²
<i>BeFF</i>	33,86	561 ± 13,52a
<i>BeFC</i>	33,85	564 ± 7,77a
<i>BeFA-I</i>	34,13	503 ± 8,89b
<i>BeFA-II</i>	39,44	57 ± 1,04c

¹Tiempo de retención (min)

²Tamaño molecular (KDa)

Datos expresados como media ± desviación estándar, n=6.

Misma letra en la misma columna significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

4.2. *Lactarius deliciosus*

No se observaron diferencias significativas para ninguna de las tres fracciones de *L. deliciosus* tras la hidrólisis con *Pronasa E*, manteniéndose los tiempos de retención y el número de picos en todos los casos (*LdFF*, *LdFC* y *LdFA*) (FIGURA 4).

En las fracciones *LdFF* y *LdFC* se observó un único pico a un tiempo de retención aproximado de 33,98 min (FIGURA 5-A), y un tamaño molecular estimado de 534 kDa.

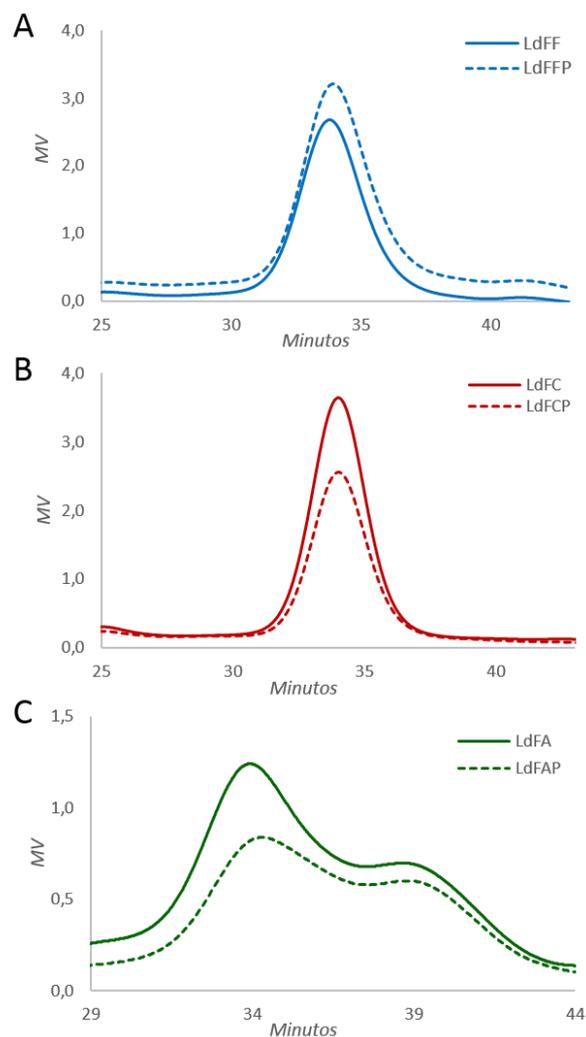


FIGURA 4. Cromatogramas de exclusión molecular correspondientes a las fracciones FF (A), FC (B) y FA (C) de *L. deliciosus* antes (*LdFF*, *LdFC* y *LdFA*) y después (*LdFFP*, *LdFCP* y *LdFAP*) de la hidrólisis con *Pronasa E*.

En la fracción *LdFA* se obtuvieron dos picos solapados (*LdFA-I* y *LdFA-II*) (FIGURA 5-B), los cuales eluyeron a unos tiempos de retención aproximados de 33,98 y 38,92 min, y presentaron unos tamaños moleculares estimados de 534y 70 kDa, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a tiempo de retención y tamaño molecular entre el pico *LdFA-I* de la fracción *LdFA* y los obtenidos en las fracciones *LdFF* y *LdFC*, lo que podría indicar que se trata del mismo polisacárido extraído en las tres fracciones (TABLA 5).

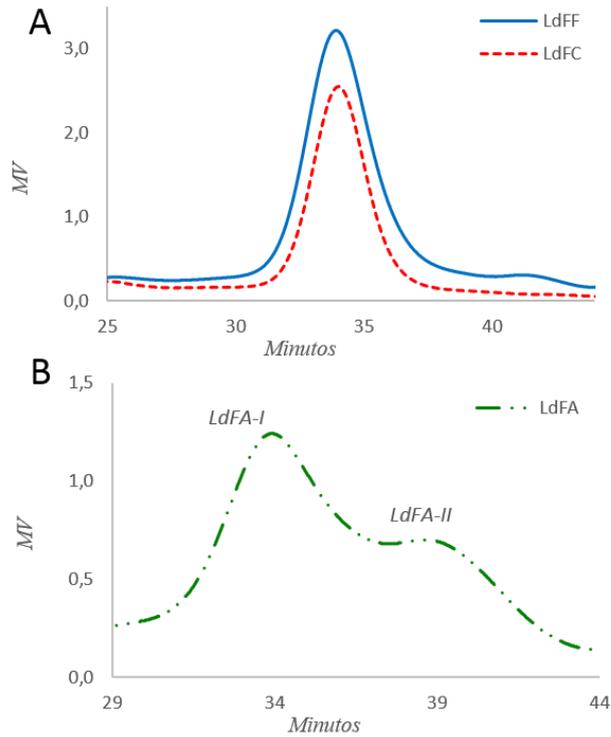


FIGURA 5. Cromatogramas de exclusión molecular correspondientes a las fracciones *LdFF* y *LdFC* de *L. deliciosus* en el que se observa un único pico a un tiempo de retención de 33,98 min (A); y la Fracción *LdFA* de *L. deliciosus*, en la que aparecen dos picos, *LdFA-I* y *LdFA-II* (B), a unos tiempos de retención de 33,98 y 38,92 min respectivamente.

TABLA 5. Tamaños moleculares estimados para las distintas fracciones de *L. deliciosus*.

Fracción	TR ¹	T. mol ²
<i>LdFF</i>	33,98	534 ± 1,39a
<i>LdFC</i>	33,98	534 ± 1,13a
<i>LdFA-I</i>	33,98	534 ± 2,30a
<i>LdFA-II</i>	38,92	70 ± 0,21b

¹Tiempo de retención (min)

²Tamaño molecular (KDa)

Datos expresados como media ± desviación estándar, n=6.

Misma letra en la misma columna significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

4.3. *Cantharellus cibarius*

Para ninguna de las tres fracciones de *C. cibarius* (*CcFF*, *CcFC* y *CcFA*) se observaron diferencias significativas tras la hidrólisis con *Pronasa E*, manteniéndose los tiempos de retención y el número de picos en todos los casos (FIGURA 6).

Se obtuvo un único pico para cada una de las fracciones analizadas, *FF*, *FC* y *FA* (FIGURA 7), eluyendo a unos tiempos de retención en cada caso de 35,22, 37,52 y 40,60 min, y presentando unos tamaños moleculares estimados de 731, 571 y 35 kDa respectivamente (TABLA 6).

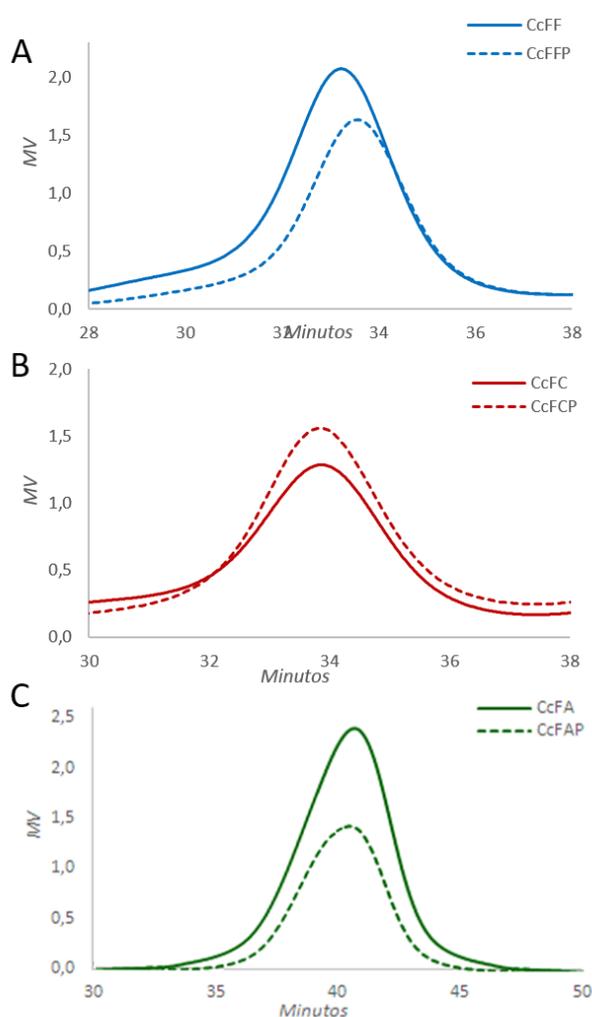


FIGURA 6. Cromatogramas de exclusión molecular correspondientes a las fracciones *FF* (A), *FC* (B) y *FA* (C) de *C. cibarius* antes (*CcFF*, *CcFC* y *CcFA*) y después (*CcFFP*, *CcFCP* y *CcFAP*) de la hidrólisis con *Pronasa E*.

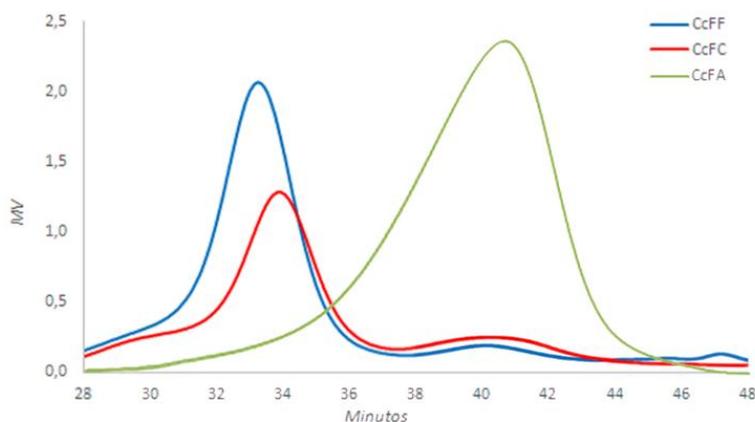


FIGURA 7. Cromatogramas de exclusión molecular correspondientes a las fracciones *CcFF*, *CcFC* y *CcFA* de *C. cibarius* en los que se observa un único pico principal a los tiempos de retención de 35,22, 37,52 y 40,60 min respectivamente.

TABLA 6. Tamaños moleculares estimados para las distintas fracciones de *C. cibarius*

Fracción	TR ¹	T. mol ²
<i>CcFF</i>	35,22	731 ± 3,13a
<i>CcFC</i>	37,52	571 ± 6,52b
<i>CcFA</i>	40,60	35 ± 0,19c

¹Tiempo de retención (min).

²Tamaño molecular (KDa).

Datos expresados como media ± desviación estándar, n=6.

Misma letra en la misma columna significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

4.4. *Calocybe gambosa*

En este caso sólo se obtuvieron datos concluyentes para la fracción alcalina *CgFA*. No se observaron diferencias significativas tras la hidrólisis con *Pronasa E*, manteniéndose los tiempos de retención y el número de picos antes y después de la proteólisis (FIGURA 8).

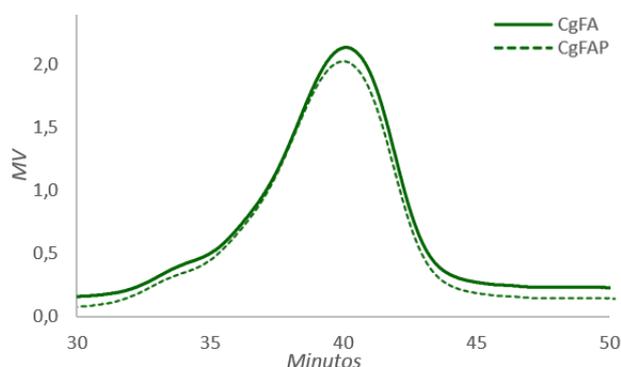


FIGURA 8. Cromatogramas de exclusión molecular correspondientes a la fracción *FA* de *C. gambosa* antes (*CgFA*) y después (*CgFAP*) de la hidrólisis con *Pronasa E*.

Como se puede observar en el cromatograma (FIGURA 8), se obtuvo un único pico a un tiempo de retención de 44,04 min y un tamaño molecular estimado de $44 \pm 0,44$ kDa.

4.5. COMPARACIÓN DE LOS TAMAÑOS MOLECULARES ENTRE ESPECIES

En la siguiente gráfica (FIGURA 9) se muestra una comparativa de los tamaños moleculares estimados para los polisacáridos detectados en las fracciones *FF*, *FC* y *FA* de las cuatro especies de setas comestibles analizadas.

Como se puede observar en la figura, los polímeros detectados en las fracciones *FF* y *FC* presentan un tamaño molecular elevado, alrededor de 500 KDa, a excepción del polisacárido obtenido en la fracción *FF* de *C. cibarius*, el cual presentó un tamaño molecular de 731 KDa, significativamente superior al estimado para el resto. En el caso de *C. gambosa* no se obtuvieron resultados concluyentes para las fracciones *FF* y *FC*.

Los polisacáridos detectados en todas las fracciones alcalinas, presentaron tamaños moleculares significativamente inferiores a los aislados en las fracciones *FF* y *FC* (FIGURA 10).

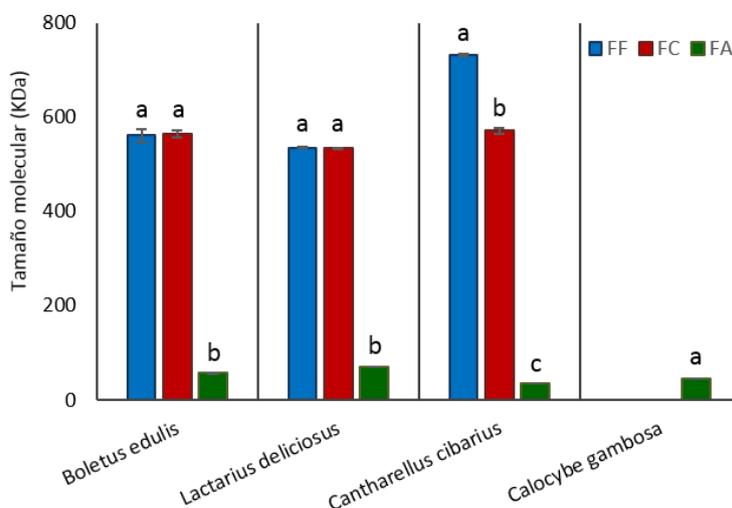


FIGURA 9. Comparación del tamaño molecular estimado para los polisacáridos obtenidos en las cuatro especies de setas comestibles estudiadas. Los valores medios con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

5. MONÓMEROS CONSTITUYENTES DE LA CADENA POLISACARÍDICA

Tras la hidrólisis de las distintas fracciones con TFA y su posterior derivatización a acetatos de alditol mediante el método desarrollado por Blakeney y cols. en 1987 [169], los monosacáridos presentes fueron determinados mediante GC-MS. Se analizaron tanto las fracciones hidrolizadas con *Pronasa E* como las no hidrolizadas. En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas tras el tratamiento de hidrólisis.

Los polisacáridos obtenidos en las tres fracciones de *B. edulis* y *L. deliciosus* están constituidos mayoritariamente por residuos de glucosa, detectándose también pequeñas cantidades de ribosa, xilosa, manosa y galactosa, en las proporciones indicadas en la TABLA 7. Los cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol obtenidos se muestran en la FIGURA 10.

TABLA 7. Porcentaje de los monosacáridos obtenidos tras hidrólisis de las distintas fracciones, determinados como acetatos de alditol mediante GC-MS.

Fracciones	Área (%)				
	Ribosa	Xilosa	Manosa	Glucosa	Galactosa
<i>B. edulis</i>					
BeFF	0,89±0,21c	1,6±0,76bc	1,07±0,23c	93,26±1,46a	3,18±1,46b
BeFC	0,91±0,26b	0,99±0,34b	1,00±0,15b	96,28±0,48a	0,83±0,43b
BeFA	0,74±0,19b	0,93±0,18b	1,06±0,37b	95,26±1,35a	2,01±0,81b
<i>L. deliciosus</i>					
LdFF	2,08±0,35c	1,53±0,69c	3,16±0,33b	89,54±0,80a	3,68±0,41b
LdFC	1,90±0,27c	1,18±0,26c	1,68±0,19c	91,19±0,80a	4,06±0,29b
LdFA	2,10±0,24c	1,15±0,21d	1,89±0,38c	91,92±0,23a	2,93±0,43b
<i>C. cibarius</i>					
CcFF	nd ¹ c	ndc	75,36±3,17a	22,54±2,20b	2,10±1,09c
CcFC	5,47±0,85c	3,01±0,61d	46,83±0,72a	41,51±1,36b	3,18±0,25d
CcFA	ndc	ndc	12,33±1,45b	87,67±1,45a	ndc
<i>C. gambosa</i>					
CgFA	ndd	ndd	2,11±0,43c	94,21±0,86a	3,68±0,66b

¹nd: No detectado

Datos expresados como media ± desviación estándar, n=4.

Misma letra (a, b, c, d) en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

En todas las fracciones de *C. cibarius* se detectaron principalmente residuos de manosa y glucosa. El monómero mayoritario en la fracción CcFF fue la manosa junto con glucosa y una pequeña cantidad de galactosa en una proporción 3,34:1,00:0,09 respectivamente. La fracción CcFC está constituida mayoritariamente por residuos de manosa y glucosa y pequeñas

cantidades de ribosa, xilosa y galactosa siguiendo una proporción 1,13:1,00:0,13:0,07:0,08, mientras que en la fracción *CcFA* se detectaron únicamente residuos de manosa y glucosa en proporción 0,14:1,00 (TABLA 7). Los cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol obtenidos se muestran en la FIGURA 11.

El único polisacárido obtenido para *C. gambosa* en la fracción alcalina *CgFA*, está constituido de forma mayoritaria por glucosa, presentando pequeñas cantidades de manosa y galactosa siguiendo la proporción 1,00:0,02:0,04 (TABLA 7). Los cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol obtenidos se muestran en la FIGURA 11.

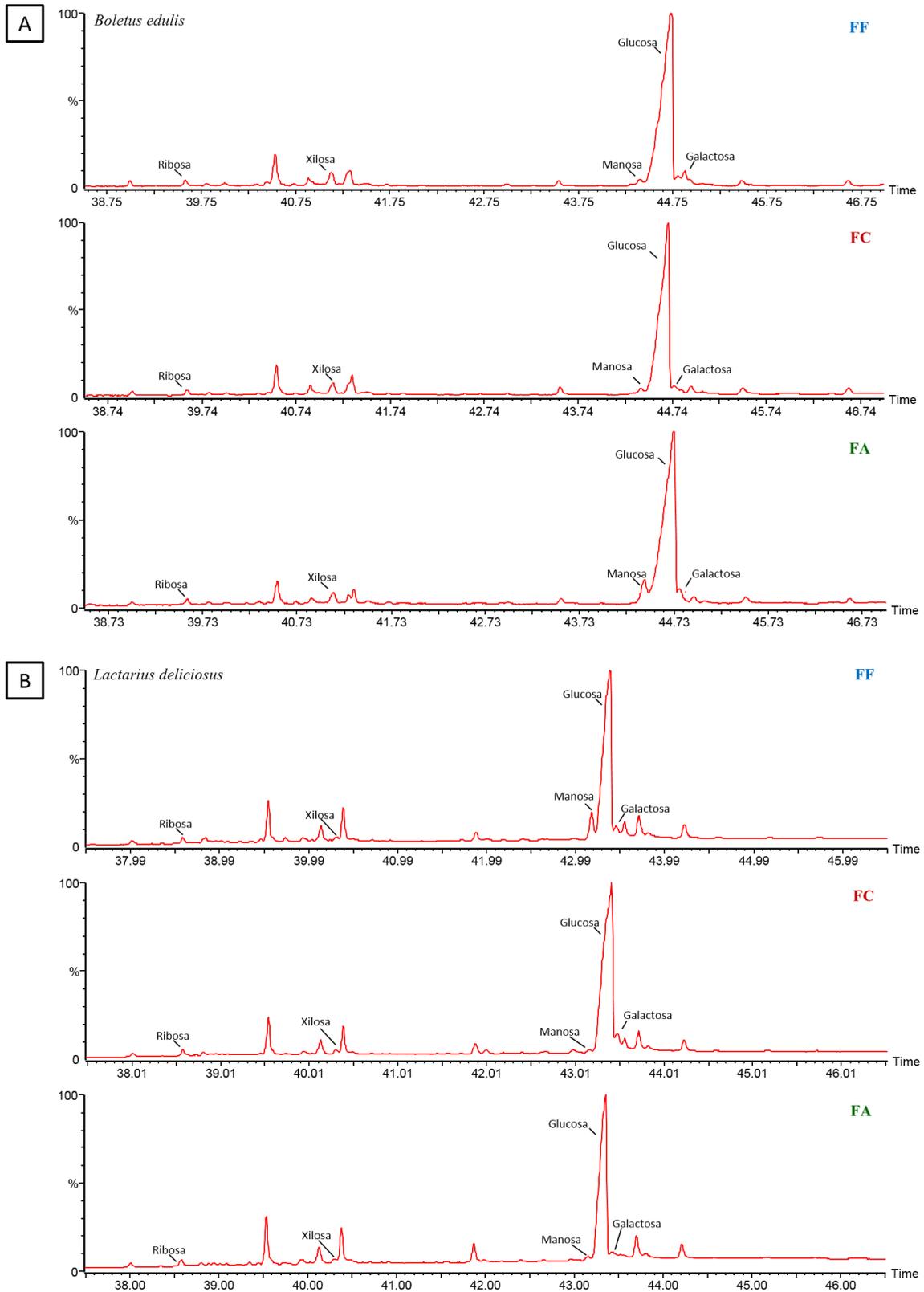


FIGURA 10. Cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol obtenidos tras la hidrólisis de las distintas fracciones polisacáridicas de *B. edulis* (A) y *L. deliciosus* (B), analizadas por GC-MS.

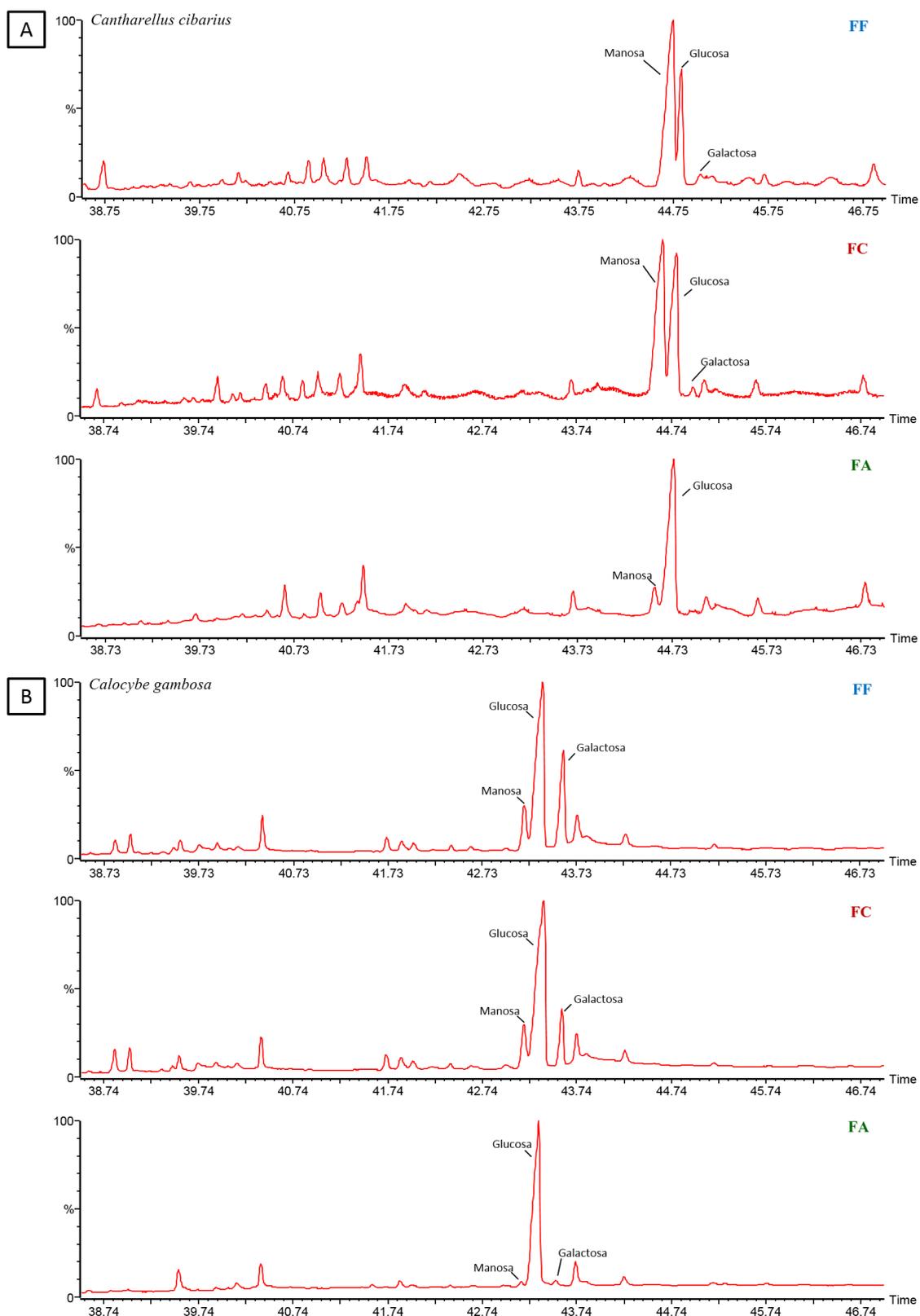


FIGURA 11. Cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol obtenidos tras la hidrólisis de las distintas fracciones polisacarídicas de *C. cibarius* (A) y *C. gambosa* (B), analizadas por GC-MS.

6. ANÁLISIS ESTRUCTURAL

6.1. DETERMINACIÓN DE ENLACES Y RAMIFICACIONES MEDIANTE ANÁLISIS DE METILACIÓN

El análisis estructural de las distintas fracciones polisacáridicas se realizó, mediante GC-MS, tras la obtención de los acetatos de alditol parcialmente metilados correspondientes. Se analizaron tanto las fracciones hidrolizadas con *Pronasa E* como las no hidrolizadas. No se encontraron diferencias significativas tras el tratamiento de hidrólisis con la proteasa, salvo en el caso de la fracción *BeFA* de *B. edulis*.

6.1.1. *Boletus edulis*

No se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos para las fracciones *BeFF* y *BeFC* (TABLA 8). Los cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol parcialmente metilados obtenidos para estas fracciones se muestran en la FIGURA 12. En ambos casos los resultados indicaron la presencia de residuos terminales, 2,3,4,6-Me₄-Glucosa; residuos pertenecientes a la cadena principal, 2,3,6-Me₃-Glucosa; y residuos correspondientes a puntos de ramificación, 2,3-Me₂-Glucosa, en un ratio cercano a 1:7:1. De acuerdo con estos datos los polisacáridos obtenidos en las fracciones *BeFF* y *BeFC* estarían formados por residuos terminales de glucosa Glc-(1→), residuos (1→4)-Glucosa y (1→4,6)-Glucosa.

TABLA 8. Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados en las fracciones *BeFF* y *BeFC* de *B. edulis* mediante GC-MS.

AAPMS ¹	TR ²	% Área		Fragmentos de masas (m/z)	Tipo de enlace
		<i>BeFF</i>	<i>BeFC</i>		
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	38,27	11,45a	11,49a	101, 117, 129, 87, 161, 145	Glc-(1→ (Terminal)
2,3,6-Me ₃ -Glc	40,23	75,86a	75,74a	117, 113, 101, 99, 129	→4)-Glc-(1→ (Cadena)
2,3-Me ₂ -Glc	42,15	12,69a	12,77a	117, 85, 99, 101, 127	→4,6)-Glc-(1→ (Punto de ramificación)

¹Acetatos de alditol parcialmente metilados, detectados mediante GC-MS.

²Tiempo de retención (min).

Misma letra en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

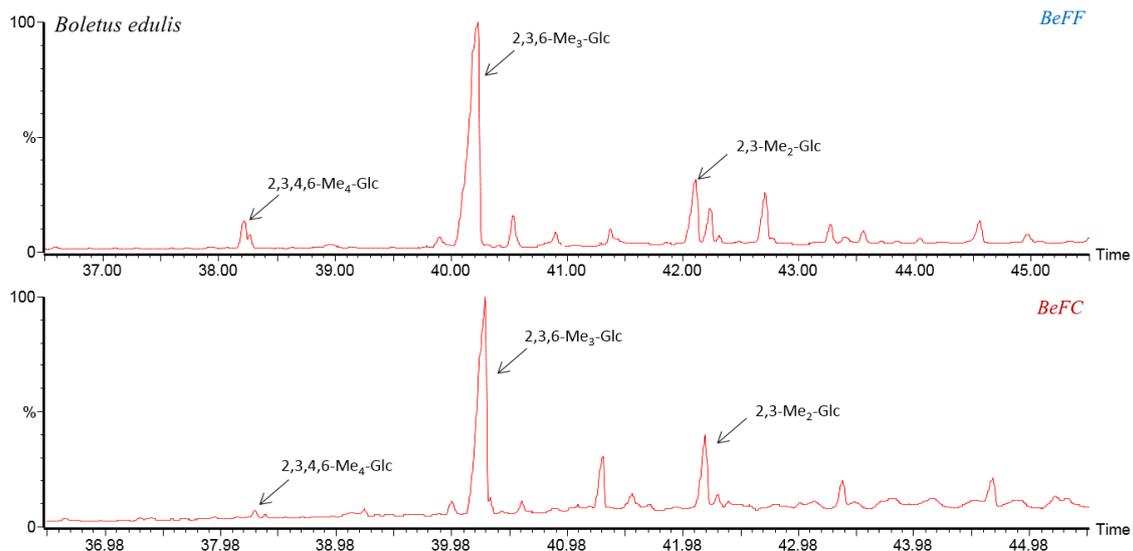


FIGURA 12. Cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol parcialmente metilados analizados por GC-MS de las fracciones *BeFF* y *BeFC* obtenidas a partir del hongo comestible *B. edulis*.

Como se puede ver en los cromatogramas mostrados en la FIGURA 13, en el caso de la fracción *BeFA* se observó una metilación totalmente deficiente antes de la hidrólisis con *Pronasa E* (*BeFA*), mientras que los resultados de metilación fueron muy satisfactorios después del tratamiento con la proteasa (*BeFAP*) (FIGURA 13). Esto encajaría con la existencia de un complejo polisacárido-proteína en la fracción, donde la presencia de la proteína antes de la hidrólisis impediría una metilación eficiente del residuo polisacárido.

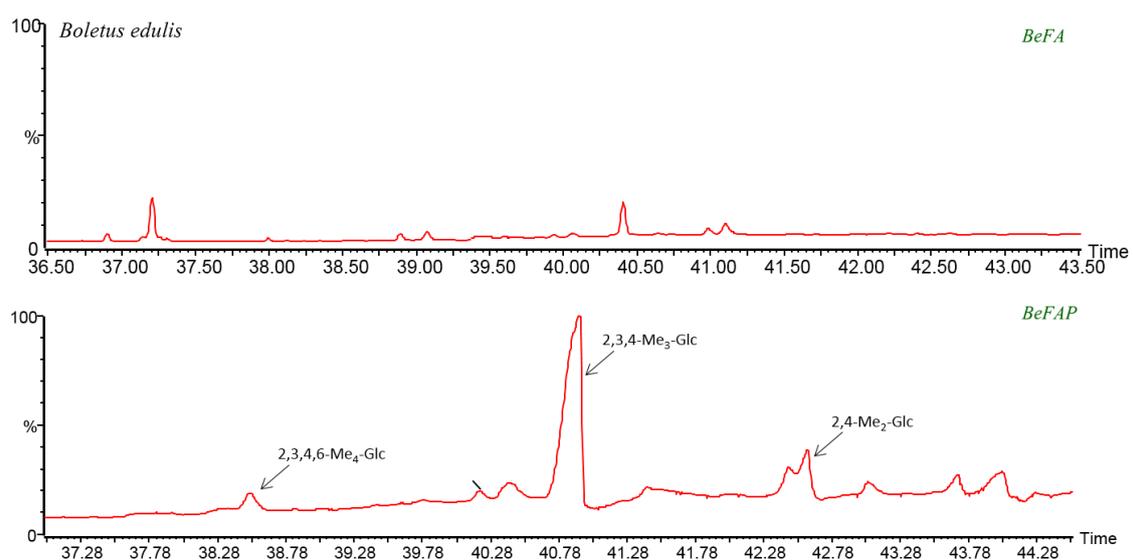


FIGURA 13. Cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol parcialmente metilados analizados por GC-MS de la fracción alcalina de *B. edulis* antes (*BeFA*) y después de la hidrólisis con *Pronasa E* (*BeFAP*).

Tras la hidrólisis de la fracción *BeFA* con *Pronasa E* y obtención de los acetatos de alditol parcialmente metilados correspondientes, el análisis mediante GC-MS (TABLA 9) indicó la liberación de residuos terminales 2,3,4,6-Me₄-Glucosa, residuos 2,3,4-Me₃-Glucosa y puntos de ramificación 2,4-Me₂-Glucosa en una proporción aproximada 1:7:1. Se dedujo que el polisacárido aislado estaba formado por unidades terminales de glucosa Glc-(1→, residuos (1→6)-Glucosa y (1→3,6)-Glucosa.

TABLA 9. Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados en la fracción *BeFA* de *B. edulis* mediante GC-MS.

AAPMS ^{1a}	TR ²	% Área	Fragmentos de masas (m/z)	Tipo de enlace
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	38,27	11,10	101, 117, 129, 87, 161, 145	Glc-(1→ (Terminal)
2,3,4-Me ₃ -Glc	40,84	77,62	101, 117, 129, 99, 87, 161, 189, 173	→6)-Glc-(1→ (Cadena)
2,4-Me ₂ -Glc	42,53	11,28	117, 129, 87, 101, 189, 159	→3,6)-Glc-(1→ (Punto de ramificación)

¹Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados mediante GC-MS.

²Tiempo de retención (min).

En general el análisis de metilación de las fracciones de *B. edulis* revela un ratio aproximado de 1,00 entre residuos terminales de glucosa Glc-(1→ y puntos de ramificación →3,6)-Glc-(1→.

6.1.2. *Lactarius deliciosus*

No se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos para las fracciones *LdFF* y *LdFC* de *L. deliciosus* (FIGURA 14) (TABLA 10).

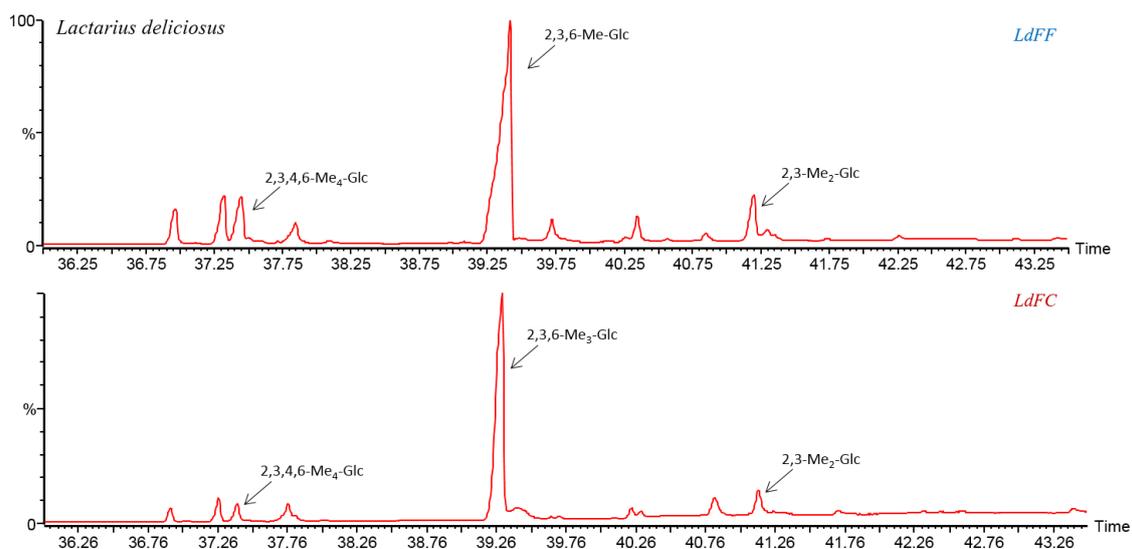


FIGURA 14. Cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol parcialmente metilados analizados por GC-MS de las fracciones *FF* y *FC* obtenidas a partir del hongo comestible *L. deliciosus*.

En ambos casos el análisis de metilación dio como resultado tres acetatos de alditol parcialmente metilados, 2,3,4,6-Me₄-Glucosa, 2,3,6-Me₃-Glucosa y 2,3-Me₂-Glucosa en una proporción cercana a 1:7:1. Esto nos indica que el polisacárido extraído en ambas fracciones está constituido por residuos terminales de glucosa Glc-(1→, residuos (1→4)-Glucosa y (1→4,6)-Glucosa.

El ratio entre residuos terminales Glc-(1→ y puntos de ramificación →4,6)-Glc-(1→) en ambas fracciones fue aproximadamente de 1,00.

TABLA 10. Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados mediante GC-MS en las fracciones LdFF y LdFC de *L. deliciosus*.

AAPMs ¹	TR ²	% Área		Fragmentos de masas (m/z)	Tipo de enlace	
		LdFF	LdFC			
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	37,31	10,67a	10,55a	101, 117, 129, 87, 161, 145	Glc-(1→	(Terminal)
2,3,6-Me ₃ -Glc	39,31	77,06a	77,28a	117, 113, 101, 99, 129	→4)-Glc-(1→	(Cadena)
2,3-Me ₂ -Glc	41,14	12,28a	12,17a	117, 85, 99, 101, 127	→4,6)-Glc-(1→	(Punto de ramificación)

¹Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados mediante GC-MS.

²Tiempo de retención (min).

Misma letra en la misma fila significa que no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

En el caso de la fracción LdFA encontramos una mezcla de residuos de acetatos de alditol parcialmente metilados bastante heterogénea. Con el análisis en conjunto de todos estos fragmentos no se llegó a ningún resultado concluyente (TABLA 11).

TABLA 11. Mezcla heterogénea de acetatos de alditol parcialmente metilados detectados mediante GC-MS en la fracción LdFA de *L. deliciosus*.

AAPMs ¹	TR ²	% Área	Fragmentos de masas (m/z)	Tipo de enlace	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	37,31	27,47	101, 117, 129, 87, 161, 145	Glc-(1→	(Terminal)
2,4,6-Me ₃ -Glc	38,99	3,95	117, 129, 101, 161, 87	→3)-Glc-(1→	(Cadena)
2,3,6-Me ₃ -Glc	39,31	41,99	117, 113, 101, 99, 129	→4)-Glc-(1→	(Cadena)
2,3,4-Me ₃ -Glc	39,58	12,61	101, 117, 129, 99, 161, 189, 173	→6)-Glc-(1→	(Cadena)
2,3-Me ₂ -Glc	41,14	5,90	117, 85, 99, 101, 127	→4,6)-Glc-(1→	(Punto de ramificación)
2,4-Me ₂ -Glc	41,27	8,10	117, 129, 101, 189, 159	→3,6)-Glc-(1→	(Punto de ramificación)

¹Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados mediante GC-MS.

²Tiempo de retención (min).

Sin embargo, analizando los fragmentos parcialmente metilados por separado (TABLA 12), se observó que los residuos 2,3,6-Me₃-Glucosa y 2,3-Me₂-Glucosa, seguían la misma proporción 7:1 que la obtenida para estos fragmentos en las fracciones LdFF y LdFC. Esto encajaría con los resultados obtenidos en el análisis de cromatografía de exclusión molecular,

en el que se observaron dos picos correspondientes a polisacáridos diferentes (FIGURA 5): *LdFA-I*, con el mismo tamaño molecular que los glucanos detectados en las fracciones *LdFF* y *LdFC*; y *LdFA-II*, de tamaño molecular significativamente inferior al anterior (TABLA 5). Los datos obtenidos en el análisis de metilación confirman por tanto la presencia de restos del mismo polisacárido en las tres fracciones, *LdFF* y *LdFC* y *LdFA* (pico *LdFA-I*), además de la presencia de un nuevo polisacárido de glucosa altamente ramificado en *LdFA* (pico *LdFA-II*) (FIGURA 15).

El total de residuos terminales Glc-(1→ detectados en *LdFA* (TABLA 11) se corresponde con la suma de los residuos terminales liberados por los dos polisacáridos detectados en la fracción, *LdFA-I* y *LdFA-II*, por lo que no se pudo determinar el porcentaje de residuos terminales correspondiente a cada pico (TABLA 11).

El resto de fragmentos parcialmente metilados detectados en *LdFA*, 2,4,6-Me₃-Glucosa, 2,3,4-Me₃-Glucosa y 2,4-Me₂-Glucosa, aparecen en una proporción aproximada 1:3:2 y formarían parte del nuevo polisacárido extraído en esta fracción, *LdFA-II* (TABLA 12). Estos datos indican la presencia de residuos terminales de glucosa Glc-(1→, residuos (1→6)-glucosa, (1→3)-glucosa y (1→3,6)-glucosa en la estructura principal de *LdFA-II* (FIGURA 15).

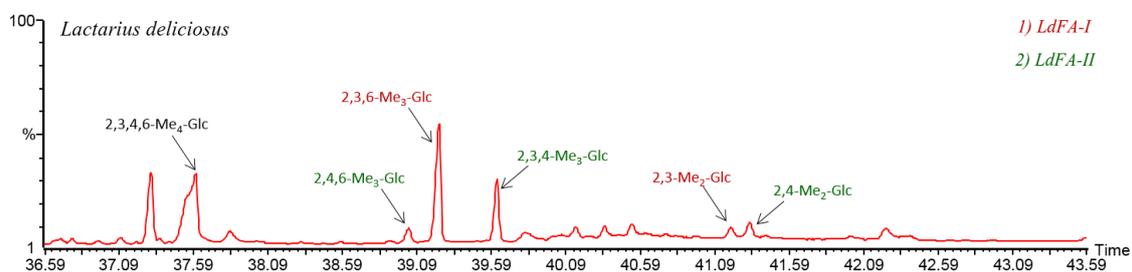


FIGURA 15. Cromatograma correspondiente a los acetatos de alditol parcialmente metilados analizados por GC-MS de la fracción *LdFA* de *L. deliciosus*. 1) Fragmentos parcialmente metilados correspondientes al polisacárido *LdFA-I*; 2) Fragmentos parcialmente metilados correspondientes al polisacárido *LdFA-II*.

Por tanto en la fracción alcalina se encontraron restos de dos polisacáridos. El primero, *LdFA-I*, se correspondería con el extraído en las fracciones *LdFF* y *LdFC*, y el segundo, *LdFA-II*, sería un nuevo polisacárido de glucosa altamente ramificado.

TABLA 12. Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados en la fracción *LdFA* de *L. deliciosus* mediante GC-MS correspondientes a los polisacáridos *LdFA-I* y *LdFA-II*.

AAPMS ^a	TR ²	% Área		Fragmentos de masas (m/z)	Tipo de enlace
		<i>LdFA-I</i>	<i>LdFA-II</i>		
2,4,6-Me ₃ -Glc	38,99	nd ³	16,08	117, 129, 101, 161, 87	→3)-Glc-(1→ (Cadena)
2,3,6-Me ₃ -Glc	39,31	87,65	nd	117, 113, 101, 99, 129	→4)-Glc-(1→ (Cadena)
2,3,4-Me ₃ -Glc	39,58	nd	51,18	101, 117, 129, 99, 161, 189, 173	→6)-Glc-(1→ (Cadena)
2,3-Me ₂ -Glc	41,14	12,35	nd	117, 85, 99, 101, 127	→4,6)-Glc-(1→ (Punto de ramificación)
2,4-Me ₂ -Glc	41,27	nd	32,73	117, 129, 101, 189, 159	→3,6)-Glc-(1→ (Punto de ramificación)

¹Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados mediante GC-MS.

²Tiempo de retención (min).

³nd: No detectado.

6.1.3. *Cantharellus cibarius*

Los resultados del análisis de metilación obtenidos para la especie *C. cibarius* confirman la presencia de tres polisacáridos de manosa y glucosa diferentes en cada fracción (TABLA 13) Los cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol parcialmente metilados obtenidos para estas fracciones se muestran en la FIGURA 16.

En la fracción *CcFF*, los resultados del análisis de metilación revelan la presencia de los fragmentos parcialmente metilados 2,3,4,6-Me₄-Glucosa, 2,3,6-Me₃-Glucosa, 2,3,4-Me₃-Manosa y 2,4-Me₂-Manosa en proporción 1:1:9:1 (TABLA 13). Estos datos indicarían la presencia de residuos terminales de glucosa Glc-(1→, (1→6)-Manosa, residuos de (1→3,6)-Manosa y un pequeño porcentaje de residuos (1→4)-Glucosa en la estructura principal del polisacárido.

TABLA 13. Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados en las fracciones *CcFF*, *CcFC* y *CcFA* de *C. cibarius* mediante GC-MS.

AAPMS ¹	TR ²	% Área			Fragmentos de masas (m/z)	Tipo de enlace
		<i>CcFF</i>	<i>CcFC</i>	<i>CcFA</i>		
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	38,39	8,5	4,4	7,8	101, 117, 129, 87, 161, 145	Glc-(1→ (Terminal)
2,4,6-Me ₃ -Man	40,09	nd ³	nd	9,6	117, 129, 101, 161, 87	→3)-Man-(1→ (Cadena)
2,3,6-Me ₃ -Glc	40,26	10,5	44,6	15,5	117, 113, 101, 99, 129	→4)-Glc-(1→ (Cadena)
2,3,4-Me ₃ -Glc	40,73	nd	nd	53,2	101, 117, 129, 99, 161, 189, 173	→6)-Glc-(1→ (Cadena)
2,3,4-Me ₃ -Man	40,76	72,6	46,3	nd	101, 117, 129, 99, 161, 189, 173	→6)-Man-(1→ (Cadena)
2,3-Me ₂ -Glc	42,18	nd	4,7	13,9	117, 85, 99, 101, 127	→4,6)-Glc-(1→ (Punto de ramificación)
2,4-Me ₂ -Man	42,62	8,4	nd	nd	117, 129, 101, 189, 159	→3,6)-Man-(1→ (Punto de ramificación)

¹Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados mediante GC-MS.

²Tiempo de retención (min).

³nd: No detectado.

Los resultados del análisis de metilación obtenidos para la fracción *CcFC* revelan la presencia de los fragmentos 2,3,4,6-Me₄-Glucosa, 2,3,6-Me₃-Glucosa, 2,3,4-Me₃-Manosa y 2,3-Me₂-Glucosa en proporción 1:10:10:1 (TABLA 13). Estos resultados indican la presencia de residuos terminales de glucosa Glc-(1→, residuos (1→4)-Glucosa, (1→6)-Manosa y (1→4,6)-Glucosa como componentes principales del polisacárido extraído.

Como resultado de los análisis de metilación de la fracción *CcFA*, se obtuvieron cinco fragmentos mayoritarios, 2,3,4,6-Me₄-Glucosa, 2,4,6-M₃-Manosa, 2,3,6-Me₃-Glucosa, 2,3,4-Me₃-Glucosa y 2,3-Me₂-Glucosa con un ratio cercano a 1:1:2:7:2 (TABLA 13). Éstos resultados indican la presencia de residuos terminales de glucosa Glc-(1→, residuos (1→3)-Manosa, (1→4)-Glucosa, (1→6)-Glucosa y (1→4,6)-Glucosa, como componentes principales de la estructura del polisacárido.

Como se observa en los resultados obtenidos tras el análisis de metilación de *CcFF* y *CcFC* (TABLA 13), el ratio entre los residuos terminales y puntos de ramificación es aproximadamente de 1.00. En la fracción *CcFA* se observa un ratio inferior de 0,56, lo que podría ser debido a una mala metilación.

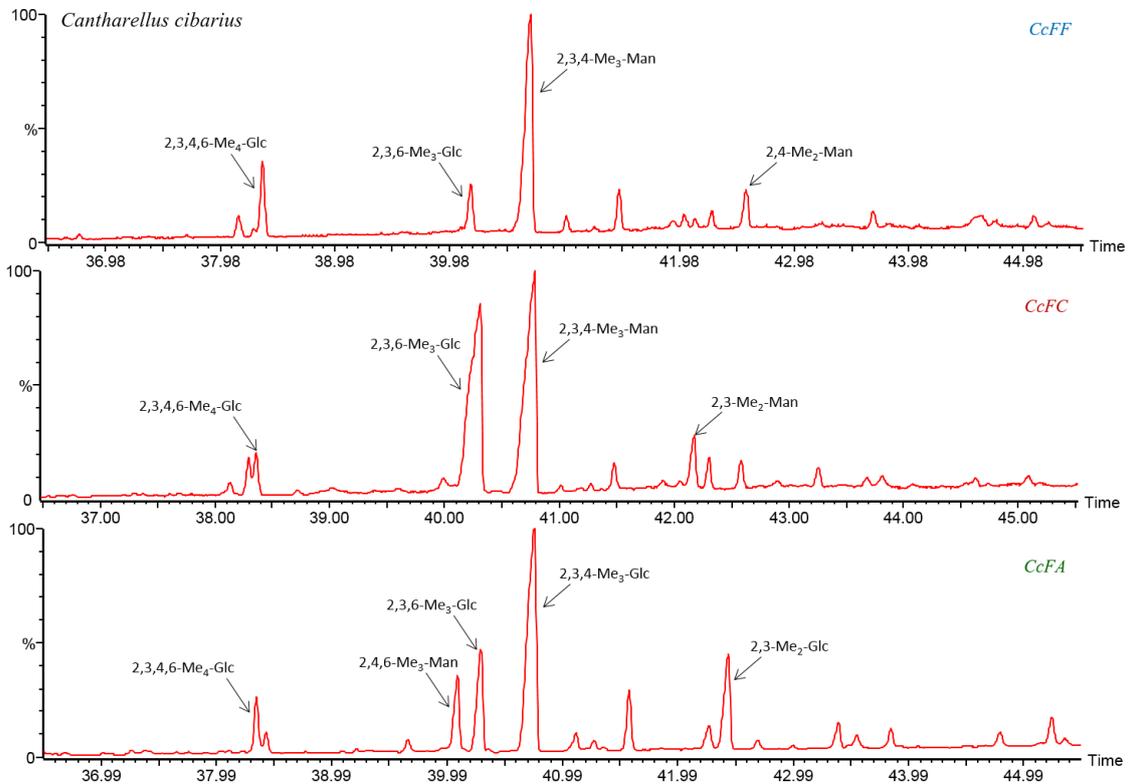


FIGURA 16. Cromatogramas correspondientes a los acetatos de alditol parcialmente metilados analizados por GC-MS de las fracciones *CcFF*, *CcFC* y *CcFA* obtenidas a partir del hongo comestible *C. cibarius*.

6.1.4. *Calocybe gambosa*

El análisis de metilación realizado mediante GC-MS de la fracción *CgFA* de *C. gambosa*, única fracción para la que se obtuvieron resultados concluyentes, produjo cuatro acetatos de alditol parcialmente metilados, 2,3,4,6-Me₄-Glucosa, 2,3,4-M₃-Glucosa, 2,4-Me₂-Glucosa y 2,3-Me₂-Glucosa en un ratio aproximado de 1:7:0,5:0,5 (TABLA 14) (FIGURA 17).

TABLA 14. Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados en la fracción *CgFA* de *C. gambosa* mediante GC-MS.

AAPMs ¹	TR ²	% Área	Fragmentos de masas (m/z)	Tipo de enlace
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	37,20	10,8	101, 117, 129, 87, 161, 145	Glc-(1→ (Terminal)
2,3,4-Me ₃ -Glc	39,50	77,5	101, 117, 99, 129, 87, 161, 189	→6)-D-Glc-(1→ (Cadena)
2,4-Me ₂ -Glc	41,01	4,7	117, 129, 101, 189, 159	→3,6)-Glc-(1→ (Punto de ramificación)
2,3-Me ₂ -Glc	41,11	7,0	117, 85, 99, 101, 127	→4,6)-Glc-(1→ (Punto de ramificación)

¹Acetatos de alditol parcialmente metilados detectados mediante GC-MS.

²Tiempo de retención (min).

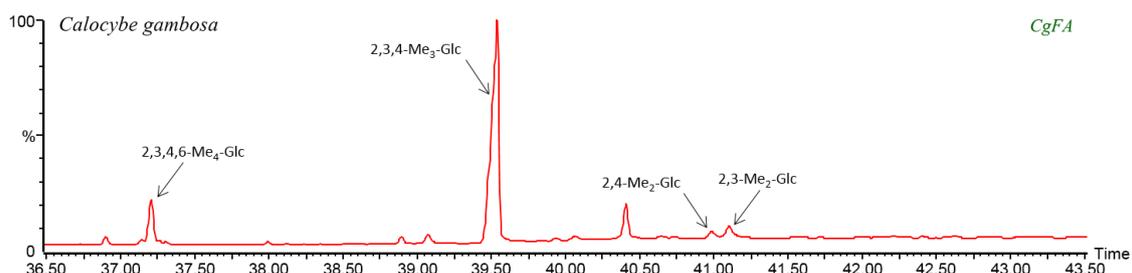


FIGURA 17. Cromatograma correspondiente a los acetatos de alditol parcialmente metilados analizados por GC-MS de la fracción *CgFA* obtenida a partir del hongo comestible *Calocybe gambosa*.

Estos resultados indican que se trata de un polisacárido formado por unidades terminales de glucosa Glc-(1→, residuos (1→6)-Glucosa, (1→3,6)-Glucosa y (1→4,6)-Glucosa. El ratio entre los residuos terminales y puntos de ramificación es aproximadamente de 1,00.

6.2. DETERMINACIÓN DE LA CONFORMACIÓN TRIPLE HÉLICE CON ROJO CONGO

El comportamiento de los complejos formados por las distintas fracciones con el colorante Rojo Congo fue evaluado a partir del cambio en la longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) del colorante a varias concentraciones de NaOH.

6.2.1. *Boletus edulis*

Como muestra la FIGURA 18, los valores de λ_{max} para Rojo Congo varían mucho en presencia de las fracciones *BeFF*, *BeFC* y *BeFA* de *B. edulis* (TABLA 15).

TABLA 15. Desviación en la λ_{max} de Rojo Congo y los complejos formados con las distintas fracciones de *B. edulis* (*BeFF*, *BeFC* y *BeFA*).

Compuesto/Complejos	λ_{max} (nm) ¹	Desplazamiento (nm)
Rojo Congo	490	--
Rojo Congo + <i>BeFF</i>	503	13**
Rojo Congo + <i>BeFC</i>	504	14**
Rojo Congo + <i>BeFA</i>	512	22**

¹ λ_{max} media a una concentración de NaOH 0,05 M. n=6.

** La diferencia con respecto a la λ_{max} de rojo congo es significativa al nivel 0,01.

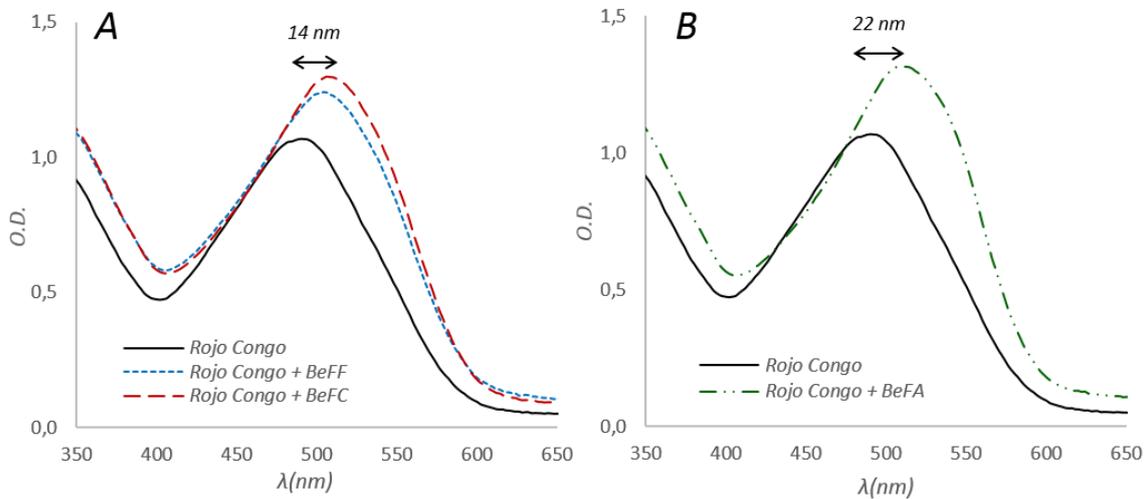


FIGURA 18. Espectro de absorción de Rojo Congo (control), y los complejos de Rojo Congo con las fracciones *BeFF* y *BeFC* (A) y con la fracción *BeFA* (B) de *B. edulis*, a una concentración de NaOH 0,05 M.

Como se observa en la FIGURA 19, no existen diferencias significativas en el comportamiento de las fracciones *BeFF* y *BeFC* en presencia del colorante rojo congo. La λ_{max} del colorante se ve desplazada en un principio hasta 510 nm y disminuye gradualmente hasta alcanzar un valor cercano al de Rojo Congo libre (482 nm) a una concentración de NaOH 0,5 M.

Esto indica que ambas fracciones presentan conformación en triple hélice, la cual se ve destruida a concentraciones de NaOH superiores a 0,2 M, lo que indica que existe una transición conformacional (FIGURA 19).

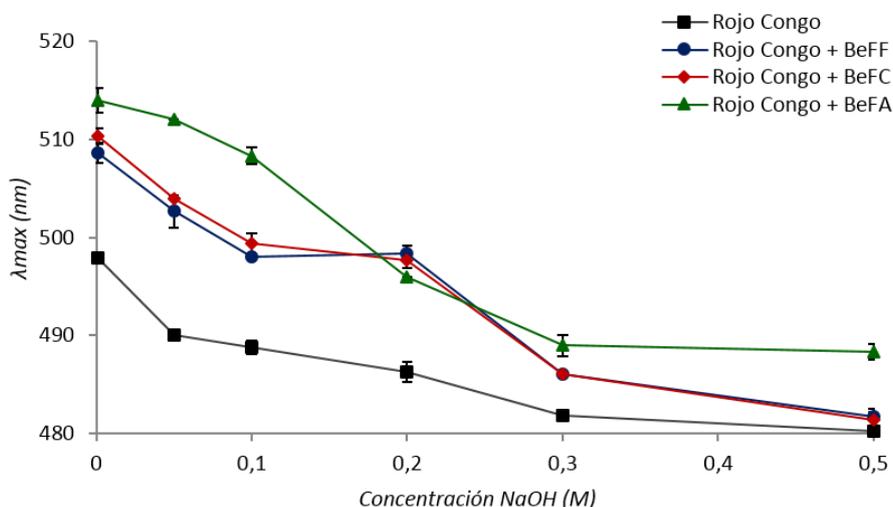


FIGURA 19. Longitud de onda de absorción máxima de Rojo Congo en presencia de las fracciones *BeFF*, *BeFC* y *BeFA* de *B. edulis*, a concentraciones crecientes de una solución de hidróxido sódico.

El comportamiento del complejo Rojo Congo-*BeFA* es muy similar al anterior. En un principio la λ_{max} se ve ampliamente incrementada hasta los 514 nm, para a continuación disminuir gradualmente hasta alcanzar los 489 nm, valor que se mantiene a concentraciones de NaOH superiores a 0,3 M. Esto indica que el polisacárido presente en esta fracción también presenta conformación en triple hélice, la cual es destruida a concentraciones de NaOH superiores a 0,2 M (FIGURA 19).

6.2.2. *Lactarius deliciosus*

Como muestra la FIGURA 20, los valores de λ_{max} para Rojo Congo varían significativamente en presencia de las fracciones *LdFF*, *LdFC* y *LdFA* de *L. deliciosus* (TABLA16).

TABLA 16. Desviación en la λ_{max} de Rojo Congo y los complejos formados con las distintas fracciones de *L. deliciosus* (*LdFF*, *LdFC* y *LdFA*).

Compuesto/Complejos	λ_{max} (nm) ¹	Desplazamiento (nm)
Rojo Congo	490	--
Rojo Congo + <i>LdFF</i>	497	7**
Rojo Congo + <i>LdFC</i>	498	8**
Rojo Congo + <i>LdFA</i>	514	24**

¹ λ_{max} media a una concentración de NaOH 0,05 M. n=6.

** La diferencia con respecto a la λ_{max} de rojo congo es significativa al nivel 0,01.

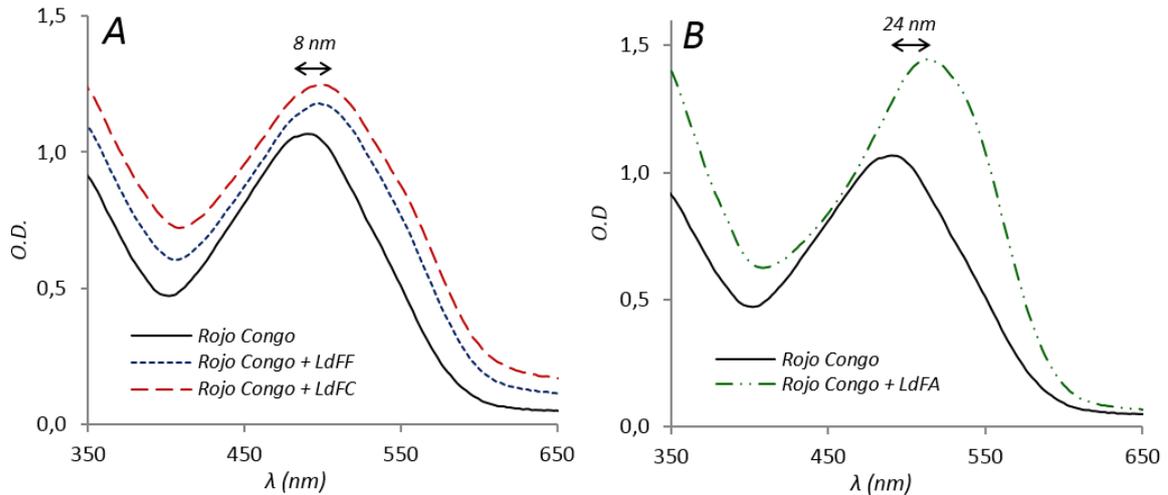


FIGURA 20. Espectro de absorción de Rojo Congo (control), y los complejos de Rojo Congo con las fracciones *LdFF* y *LdFC* (A) y con la fracción *LdFA* (B) de *L. deliciosus*, a una concentración de NaOH 0,05 M.

Como se observa en la FIGURA 21, no existen diferencias significativas en el comportamiento de las fracciones *LdFF* y *LdFC* en presencia del colorante rojo congo. A baja concentración de NaOH la λ_{max} del colorante aumenta hasta un valor máximo de 507 nm. A concentraciones de NaOH superior a 0,2 M la λ_{max} disminuye hasta alcanzar un valor cercano al de Rojo Congo libre (482 nm). Esto nos indica que ambas fracciones presentan conformación en triple hélice, la cual es destruida a concentraciones de NaOH superiores a 0,2 M (FIGURA 21).

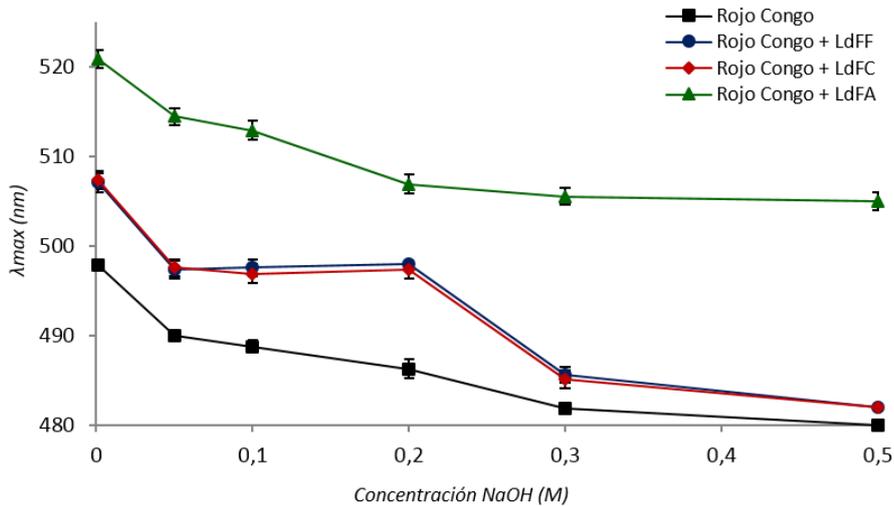


FIGURA 21. Longitud de onda de absorción máxima de Rojo Congo en presencia de las fracciones *LdFF*, *LdFC* y *LdFA* de *L. deliciosus* a concentraciones crecientes de una solución de hidróxido sódico.

En el caso de la fracción alcalina *LdFA*, a una concentración de NaOH 0.001 M, la λ_{max} de Rojo Congo se desplaza hasta un valor máximo de 521 nm y disminuye hasta mantenerse prácticamente estable a 506 nm, incluso a concentraciones de NaOH superiores a 0,3 M. Como indican los resultados de cromatografía de exclusión molecular y de metilación obtenidos, en esta fracción se observa la presencia de restos del polisacárido extraído en las fracciones *LdFF* y *LdFC*, además de un nuevo polisacárido de glucosa altamente ramificado. Se ve cómo el comportamiento del rojo congo en presencia de la fracción *LdFA* es significativamente diferente a su comportamiento en presencia de las fracciones *LdFF* y *LdFC*, lo que sugeriría que el desplazamiento de la λ_{max} de Rojo Congo con *LdFA* podría ser debido en su mayor parte al nuevo polisacárido detectado en esta fracción (*LdFA-II*) y que éste adoptaría una conformación en triple hélice altamente ordenada, que se mantiene estable incluso bajo fuertes condiciones alcalinas (FIGURA 21).

6.2.3. *Cantharellus cibarius*

Como muestra la FIGURA 22, los valores de λ_{max} para Rojo Congo varían en presencia de las fracciones *CcFF* y *CcFA* de *C. cibarius* (TABLA 17), mientras que en el caso de *CcFC* no se observa una desviación significativa de los valores de λ_{max} .

TABLA 17. Desviación en la λ_{max} de Rojo Congo y los complejos formados con las distintas fracciones de *C. cibarius*, *CcFF*, *CcFC* y *CcFA*.

Compuesto/Complejos	λ_{max} (nm) ¹	Desplazamiento (nm)
<i>Rojo Congo</i>	490	--
<i>Rojo Congo + CcFF</i>	498	8**
<i>Rojo Congo + CcFC</i>	490	0 ^{ns}
<i>Rojo Congo + CcFA</i>	507	17**

¹ λ_{max} media a una concentración de NaOH 0,05 M. n=6

** La diferencia con respecto a la λ_{max} de rojo congo es significativa al nivel 0,01.

^{ns} La diferencia con respecto a la λ_{max} de rojo congo fue no significativa.

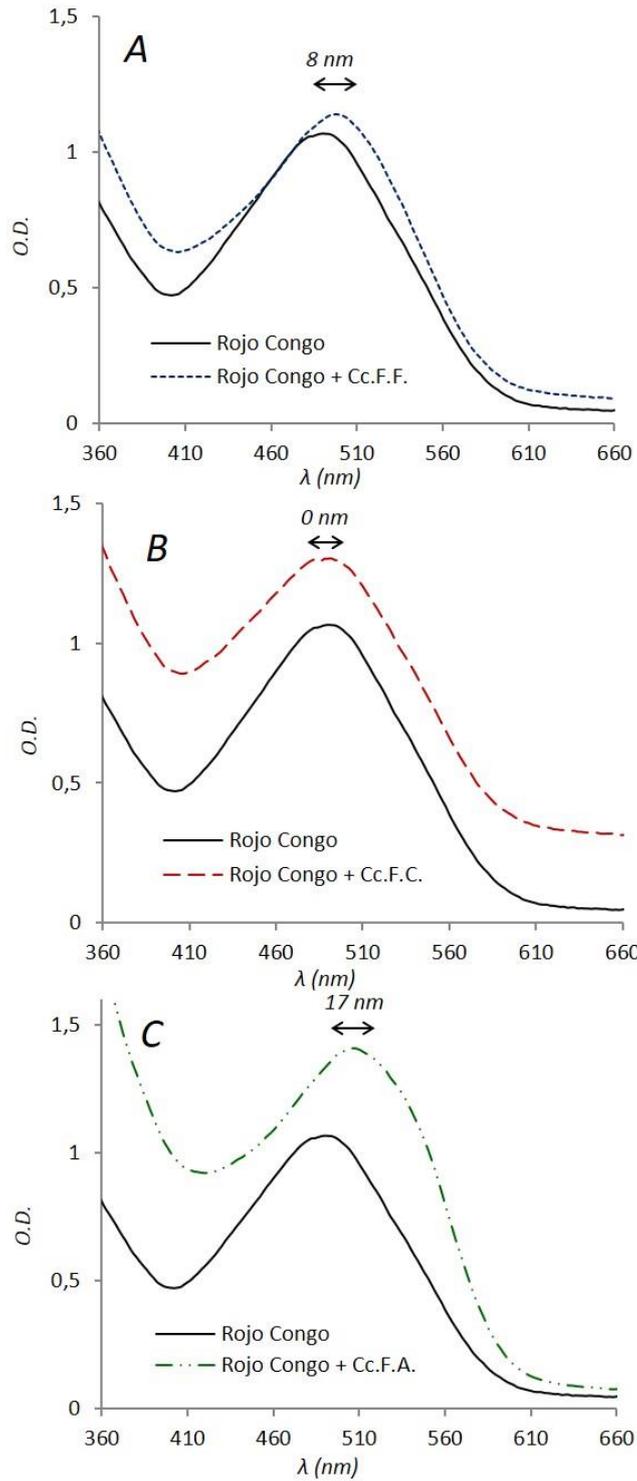


FIGURA 22. Espectro de absorción de Rojo Congo (control), y los complejos de Rojo Congo con las fracciones *CcFF* (A), *CcFC* (B) y *CcFA* (B) de *C. cibarius*, a una concentración de NaOH 0,05 M.

La λ_{max} del colorante tras su unión con la fracción *CcFF* se mantiene constante en un valor máximo aproximado de 498 nm. El comportamiento del complejo formado por Rojo Congo con la fracción *CcFA* es similar al comportamiento del colorante en presencia de la fracción *CcFF*, manteniéndose la λ_{max} prácticamente constante a unos 510 nm incluso a altas concentraciones

de NaOH (FIGURA 23). De estos resultados se puede deducir que los polisacáridos presentes en ambas fracciones presentan una estructura en triple hélice estable incluso bajo fuertes condiciones alcalinas.

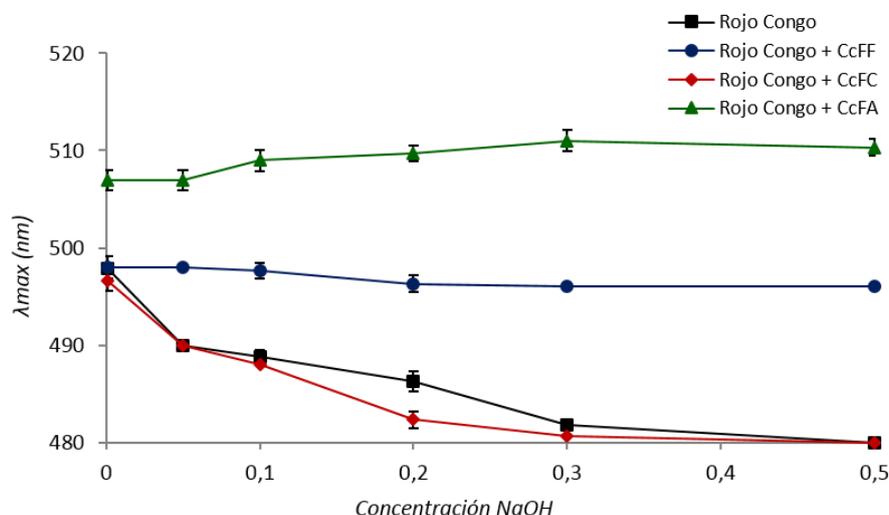


FIGURA 23. Longitud de onda de absorción máxima de Rojo Congo en presencia de las fracciones *CcFF*, *CcFC* y *CcFA* de *C. cibarius* a concentraciones crecientes de una solución de hidróxido sódico.

En el caso del complejo formado por Rojo Congo con la fracción *CcFC* no se observa desviación significativa de la λ_{max} , por lo que se puede deducir que este polisacárido no presenta una conformación en triple hélice en solución acuosa (FIGURA 23).

6.2.4. *Calocybe gambosa*

Como muestra la FIGURA 24, los valores de λ_{max} para Rojo Congo varían significativamente en presencia de la fracción *CgFA* de *C. gambosa* (TABLA 18).

TABLA 18. Desviación en la λ_{max} de Rojo Congo y el complejo formado con la fracción *CgFA* de *C. gambosa*.

Compuesto/Complejos	λ_{max} (nm) ¹	Desplazamiento (nm)
Rojo Congo	490	--
Rojo Congo + <i>CgFA</i>	518	28**

¹ λ_{max} media a una concentración de NaOH 0,05 M. n=6

** La diferencia con respecto a la λ_{max} de rojo congo es significativa al nivel 0,01.

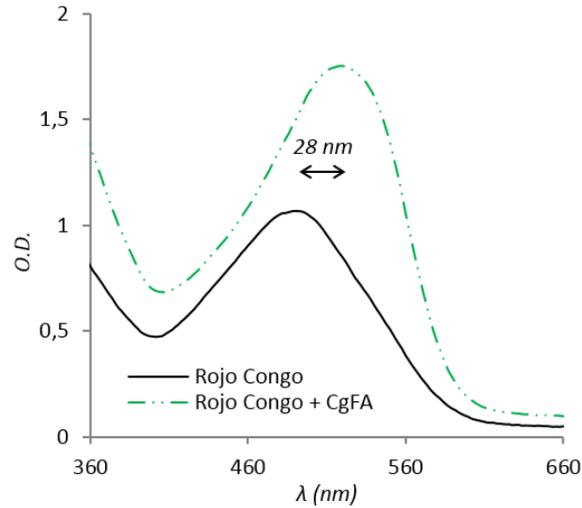


FIGURA 24. Espectro de absorción de Rojo Congo (control), y el complejo de Rojo Congo con la fracción *CgFA* de *C. gambosa* a una concentración de NaOH 0,05 M.

La λ_{max} del complejo de Rojo Congo con la fracción *CgFA* aumenta hasta un valor máximo de aproximadamente 520 nm, valor que se mantiene constante incluso a concentraciones elevadas de NaOH (FIGURA 25). Esto sugiere que este polisacárido presenta una conformación en triple hélice altamente ordenada, que se mantiene estable incluso bajo fuertes condiciones alcalinas.

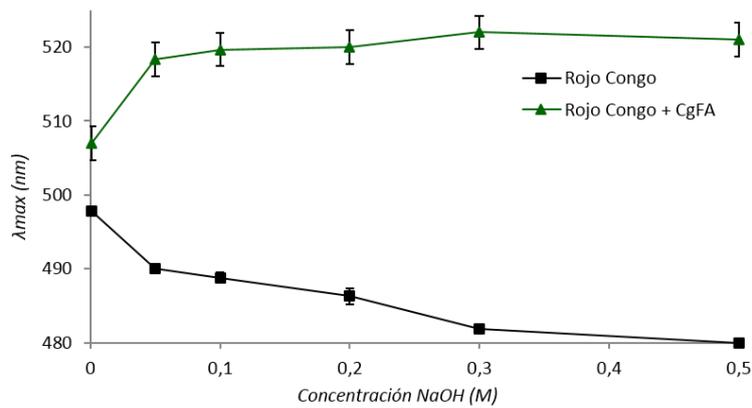


FIGURA 25. Longitud de onda de absorción máxima de Rojo Congo en presencia de la fracción *CgFA* de *C. gambosa* a concentraciones crecientes de una solución de hidróxido sódico.

7. DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS POLISACÁRIDO-PROTEÍNA

En los últimos años los polisacáridos de setas han llamado enormemente la atención de la comunidad científica gracias a su prometedora actividad biológica y funcional. Se ha podido demostrar la existencia de numerosos complejos polisacárido-proteína con actividad antioxidante [87, 88], antitumoral e inmunomoduladora [89, 90], extraídos a partir de gran variedad de especies de Basidiomicetes. Un ejemplo de ello son los complejos polisacárido-proteína PSK [91] y PSP [92], ambos aislados a partir de la seta *Coriolus versicolor*, y ampliamente comercializados en países como Japón y China como agentes inmunomoduladores y anticancerígenos [82].

Aparte de los extensamente estudiados PSK y PSP, existen ejemplos más recientes como el del complejo polisacárido-proteína PPC aislado por Kim y cols. en 2006 a partir de *Phellinus linteus* [93], el cual presenta un importante efecto inmunoestimulador. La porción polisacáridica de esta molécula está formada principalmente por unidades de D-glucosa y D-manosa y representa un 73% del polímero. La parte proteica supone un 16%, predominando los aminoácidos ácidos prolina y aspártico. Otros trabajos como el realizado por Gonzaga y cols. en 2005 y 2009 en la especie *Agaricus blazei* Murill [94, 95], demostraron también la presencia de un complejo polisacárido-proteína con una potente actividad antitumoral. Dicho complejo estaba formado por una parte proteica, aproximadamente un 25,3% de la molécula, y una parte polisacáridica, aproximadamente un 37%, constituida principalmente por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 6) y α -(1 \rightarrow 4).

En este trabajo se observaron indicios de la presencia de complejos polisacárido-proteína en algunas de las fracciones analizadas. Se detectaron pequeños porcentajes de proteína en todas las fracciones, siendo el contenido en CcFC (3,52%) y CcFA (5,03%) de *C. cibarius* significativamente superior al obtenido en el resto (TABLA 2). A pesar de la presencia de proteínas en todas las fracciones, únicamente la fracción BeFA de *B. edulis* presentó resultados positivos en el análisis electroforético SDS-PAGE (Punto 7.1), lo que indica que el contenido en proteínas presente en el resto se corresponde con restos de proteínas libres que no fueron eliminados durante los procesos de extracción y purificación. Como se indica en el siguiente apartado, en la fracción alcalina BeFA de *B. edulis* se observaron además cambios significativos en los resultados de cromatografía de exclusión molecular y en el análisis de metilación tras la hidrólisis con *Pronasa E*.

7.1. COMPLEJO POLISACÁRIDO-PROTEÍNA DETECTADO EN *BeFA* DE *B. EDULIS*.

Como se indicó anteriormente, se encontraron indicios de la presencia de un complejo polisacárido-proteína en la fracción *BeFA* de *B. edulis*. A parte del contenido en proteínas detectado (2,10%), se encontraron diferencias significativas en el análisis por cromatografía de exclusión molecular, observándose una llamativa inversión en el área de los picos *BeFA-I* y *BeFA-II* tras la hidrólisis con *Pronasa E* (FIGURA-3, Punto 4.1). Esto se explicaría gracias a la eliminación de la parte proteica, unida covalentemente a la fracción polisacáridica, tras la acción de la proteasa. Se podría deducir que el pico *BeFA-I* se corresponde con el complejo polisacárido-proteína (con un tamaño molecular de 563 KDa), y el pico *BeFA-II* con la parte polisacáridica libre (con un tamaño molecular de 57 KDa), y que por tanto el área de este último pico se ve incrementada por la eliminación de la proteína tras la hidrólisis con *Pronasa E*.

Igualmente se pudo observar una mejora en la eficiencia de metilación después del tratamiento con la proteasa. La presencia de la proteína antes de la hidrólisis podría impedir el acceso de los reactivos a la parte polisacáridica y por tanto su correcta metilación.

Con el fin de demostrar la existencia de este complejo polisacárido-proteína en *BeFA* se llevó a cabo un análisis electroforético SDS-PAGE, realizado bajo las condiciones señaladas anteriormente (Materiales y Métodos, Punto 9.2.) y siguiendo el método descrito por Laemmli en 1970 [185]. Para poner de manifiesto la presencia de glicoproteínas en los geles de poliacrilamida se realizaron tinciones en paralelo específicas para proteínas (Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250) y para polisacáridos (Reacción del Ácido periódico-Reactivo de Schiff). En ambos casos se obtuvo una única banda de color azul al teñir con Coomassie Brilliant Blue, específico para proteínas, y de color rosa al teñir el gel mediante la reacción del Ácido periódico-Reactivo de Schiff (PAS), específico para carbohidratos (FIGURA 26).

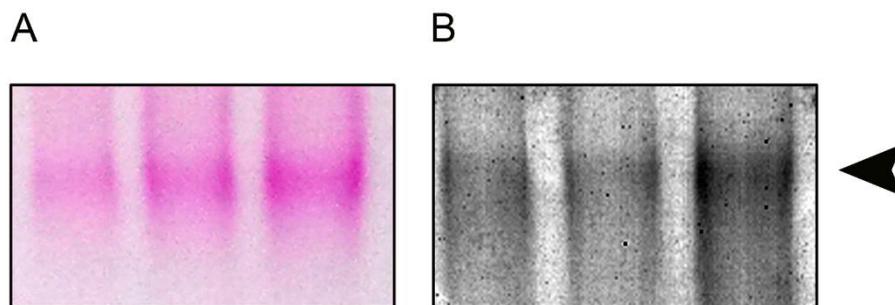


FIGURA 26. Perfil SDS-PAGE del complejo polisacárido-proteína obtenido en la fracción alcalina BeFA de *B. edulis*, en el que se observa una única banda (**A**) de color azul al teñirse con Coomassie Brilliant Blue específico para proteínas y (**B**) de color rosa al teñirse mediante la reacción del Ácido periódico-Reactivo de Schiff (PAS) específico para carbohidratos.

El resultado obtenido en el análisis mediante SDS-PAGE, junto con los indicios mencionados anteriormente, confirmaría la presencia de un complejo polisacárido-proteína en esta fracción.

DISCUSIÓN

1. DISCUSIÓN GENERAL

Las setas son altamente apreciadas como alimento por su sabor y textura únicas, además de ser reconocidas como fuente importante de compuestos biológicamente activos. Uno de los compuestos con actividad biológica más abundantes y estudiados en setas son los polisacáridos. Estos se presentan en una gran variabilidad estructural y funcional, pudiendo encontrarse como homopolímeros, principalmente de glucosa; heteropolímeros; o formando complejos con elementos de la célula como proteínas o polifenoles [67]. Pueden presentar diferencias en su estructura anomérica (α , β , o mezcla α - β) o en el tipo de enlaces presentes en la cadena, siendo los más comunes (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) y (1 \rightarrow 4) [67]. Pueden ser además lineales o ramificados, con cadenas laterales más o menos numerosas y de más o menos longitud [67]. Toda esta diversidad de elementos y sus infinitas combinaciones hacen de los polisacáridos una impresionante fuente de información celular, mucho más compleja y con más posibilidades que la propia información genética. Hoy en día se ha podido demostrar el enorme potencial funcional y farmacológico de estos polisacáridos, extraídos a partir de una gran variedad de Basidiomicetes [7, 67].

En las últimas décadas gran número de trabajos han puesto de manifiesto la enorme variedad de funciones biológicas presentadas por los polisacáridos de setas, destacando su actividad antioxidante [58-60], antitumoral [61, 62], inmunomoduladora [63-66], antinociceptiva y anti-inflamatoria [111, 188]. Sin embargo sólo unos pocos polisacáridos son utilizados actualmente en la clínica diaria [79, 189]. Dentro de los más conocidos están el lentinan [76], derivado de *Lentinus edodes*; schizophyllan [78], de *Schizophylla commune*; o los complejos polisacárido-proteína PSK [91] y PSP [92], de *Coriolus versicolor*. La gran ventaja de estos productos con respecto a otras drogas antitumorales sintéticas es su inocuidad, siendo medicamentos antitumorales seguros, con mínimos efectos secundarios [7, 79], ya que actúan como inmunomoduladores no específicos activando el sistema inmune del propio organismo sin causar una inactivación directa del tumor [80].

A pesar de que los trabajos sobre polisacáridos de setas son cada vez más numerosos, poco se sabe sobre los mecanismos de acción que envuelven su actividad biológica y la relación con su composición química y conformación estructural [82]. Se ha visto que esta actividad podría estar relacionada con ciertas características del polisacárido, como su tamaño molecular, la presencia de ramificaciones, la longitud de las cadenas laterales, el tipo de enlace, etc [61,

130, 131], pero es complicado determinar qué estructuras o características contribuyen y en qué medida a la actividad de estas moléculas.

La mayoría de polisacáridos con actividad funcional pertenecen al grupo de los β -glucanos, y su estructura más común consiste en una cadena principal con enlaces β -(1 \rightarrow 3) y ramificaciones en posición O-6 [61, 69-72], las cuales parecen ser imprescindibles para su actividad antitumoral [73-75]. A parte de los bien conocidos β -(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-glucanos, en las últimas décadas se han aislado y descrito gran cantidad de polisacáridos biológicamente activos con diferente composición química y estructural [58, 59, 62, 63, 67, 132].

La conformación en triple hélice parece jugar un papel fundamental en la actividad biológica de los polisacáridos [73, 133], junto con el grado de ramificación y el tamaño molecular, aunque en menor proporción [131]. El primer paso en la actividad inmunomoduladora y antitumoral de los polisacáridos es su interacción con los receptores celulares, la cual parece estar fuertemente influenciada por su naturaleza química y estructura terciaria [131]. Estudios como el de Andrade de Pires y cols. [61] y Bae y cols. [134] en 2013, ponen de manifiesto la relación entre el grado de ramificación del polisacárido y su actividad inmunomoduladora, observándose una actividad significativamente mayor en glicanos con un grado de ramificación del 30%. Zhang y cols. en 2005 [135] y Chen y cols. en 2009 [136] estudiaron la influencia de la conformación en triple hélice y el tamaño molecular sobre la actividad antitumoral, observándose un incremento de esta actividad junto con el aumento del peso molecular. También observaron una disminución significativa de la actividad antitumoral en el caso de polisacáridos desnaturalizados tras haber perdido su estructura terciaria en triple hélice. Por otro lado numerosos trabajos han demostrado que, tanto moléculas de pequeño tamaño como moléculas excesivamente grandes, disminuyen drásticamente su actividad antitumoral y que ésta se ve favorecida en presencia de polisacáridos con un tamaño dentro del rango de 10-40 x10⁴ Da [7, 73, 135].

Se encontraron pocos estudios acerca de polisacáridos extraídos a partir de las cuatro setas que ocupan este trabajo, *B. edulis*, *L. deliciosus*, *C. cibarius* y *C. gambosa*. Dentro del poco material existente, *B. edulis* y *L. deliciosus* son las dos especies más presentes en la bibliografía [62, 63, 129, 190-192]. Se observa como en general poseen una gran capacidad antioxidante [126, 129, 191, 193] y una importante actividad antitumoral e inmunomoduladora [63, 65, 132, 193, 194].

Para el presente trabajo se realizaron tres extracciones consecutivas con agua a temperatura ambiente, agua a 100°C y una solución acuosa de NaOH 1M a 100°C, lográndose la extracción de diferentes fracciones en distintas proporciones. Como era de esperar, los rendimientos de extracción fueron bastante bajos [126], inferiores al 10% en todos los casos, aunque también se observó un esperado aumento del rendimiento en la mayoría de fracciones alcalinas [195] (TABLA 1, Resultados). Esta diferencia en los rendimientos de extracción puede ser debida a diferencias en la naturaleza y estructura de los polisacáridos aislados y a las diferentes condiciones de extracción utilizadas (temperatura, pH, tiempo de extracción) [87, 126].

El porcentaje de proteínas totales obtenido es bajo para la mayoría de fracciones y únicamente en *BeFA* de *B. edulis* se observó la presencia de un complejo polisacárido-proteína. Los restos proteicos detectados en el resto de fracciones se corresponderían con proteínas libres no eliminadas en el proceso de extracción y purificación.

En general los porcentajes de carbohidratos totales obtenidos son elevados, aproximadamente del 90%, excepto en las fracciones *FF* y *FC* de *C. cibarius* y *C. gambosa*, donde se observó un valor significativamente inferior, alrededor de un 60% (TABLA 19).

Los tamaños moleculares estimados para los polisacáridos aislados en las fracciones *FF* y *FC* de las especies estudiadas son muy elevados, del orden de 500 KDa, a excepción del polisacárido aislado en la fracción *CcFF* de *C. cibarius*, el cual presentó un tamaño de 731 KDa, significativamente superior al resto. Por el contrario los tamaños moleculares de los polisacáridos obtenidos en las fracciones alcalinas son significativamente inferiores, no superando los 70 KDa (TABLA 1). Esta diversidad de tamaños podría deberse a diferencias en la localización del polisacárido en la célula, o a la degradación de los polisacáridos durante el proceso de extracción debido a las altas temperaturas, altos tiempos de extracción o ambientes alcalinos utilizados [126].

En todas fracciones se obtuvieron homopolisacáridos de glucosa, excepto en la especie *C. cibarius*, en la que se detectaron heteropolisacáridos de manosa y glucosa en las tres fracciones, *FF*, *FC* y *FA* de. Todos sin excepción presentaron cadenas laterales, con un grado de ramificación medio del 20%, a excepción de *Ld-II* en *L. deliciosus*, con un grado de ramificación superior al 60%, y *Cc-II* en *C. cibarius*, con un grado de ramificación inferior, del 9,12% (TABLA 19).

Tabla 19. Tabla resumen de los diferentes polisacáridos extraídos

Especie	Polisacárido	C.T. ¹	T. mol. ²	Azúcares	Estructura	GR ³	Conformación
<i>B. edulis</i>							
	Be-I	94,11	563	Glucosa	Residuos (1→4)-Glucosa y (1→4,6)-Glucosa	24,20	Triple hélice
	Be-II⁴	86,33	503	Glucosa	Residuos (1→6)-Glucosa y (1→3,6)-Glucosa	22,38	Triple hélice
<i>L. deliciosus</i>							
	Ld-I	89,66	534	Glucosa	Residuos (1→4)-Glucosa y (1→4,6)-Glucosa	22,83	Triple hélice
	Ld-II	85,16	70	Glucosa	Residuos (1→6)-Glucosa, (1→3)-Glucosa y (1→3,6)-Glucosa	65,47	Triple hélice
<i>C. cibarius</i>							
	Cc-I	55,64	731	Manosa, Glucosa	Residuos (1→4)-Glucosa, (1→6)-Manosa y (1→3,6)-Manosa	16,86	Triple hélice
	Cc-II	64,10	571	Manosa, Glucosa	Residuos (1→4)-Glucosa, (1→6)-Manosa y (1→4,6)-Glucosa	9,12	--
	Cc-III	74,73	35	Manosa, Glucosa	Residuos (1→3)-Manosa, (1→4)-Glucosa, (1→6)-Glucosa y (1→4,6)-Glucosa	21,71	Triple hélice
<i>C. gambosa</i>							
	Cg-I	83,07	44	Glucosa	Residuos (1→6)-Glucosa, (1→3,6)-Glucosa y (1→4,6)-Glucosa	22,51	Triple hélice

¹ Carbohidratos totales (%)

² Tamaño molecular (KDa).

³ Grado de ramificación (%).

⁴ Complejo polisacárido-proteína.

2. *Boletus edulis*.

Existe poca bibliografía referente a polisacáridos extraídos a partir del género *Boletus* [128] y menos concretamente acerca de la especie comestible *B. edulis* [126, 129, 190, 191]. Son aún más escasos los trabajos centrados en la caracterización estructural o conformacional de estos polisacáridos [58, 63, 196, 197] y en ningún caso los descritos se asemejan a los aislados en este trabajo de investigación.

No se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos para las fracciones *BeFF* y *BeFC* (TABLA 19). Se dedujo por tanto que se trataba de la misma molécula, ***Be-I***, con un peso molecular estimado de 563 KDa y un porcentaje aproximado de carbohidratos totales del 95%. Se trata de un polisacárido compuesto exclusivamente por residuos de glucosa unidos por enlaces (1→4) y ramificaciones en posición O-6 formadas por residuos terminales de glucosa. Los puntos de ramificación podrían estar distribuidos aproximadamente cada 8 residuos de la cadena principal. El polisacárido presenta un grado de ramificación aproximado del 24,20%. El comportamiento de ***Be-I*** en presencia de Rojo Congo indicó una estructura terciaria en triple hélice, la cual se vió destruida a concentraciones de NaOH superiores a 0,2M.

Los datos obtenidos en este trabajo no fueron suficientes para deducir con exactitud la estructura del polisacárido aislado (distribución de los diferentes enlaces, posición de las ramificaciones a lo largo de la cadena, etc), existiendo múltiples posibilidades para la estructura de ***Be-I***. Una posible opción podría ser similar a la determinada para el polisacárido aislado por Li y cols. en 2013 a partir de *Coprinus comatus* [198]. Se trata de un α -D-Glucano con una cadena principal formada por unidades de (1→4)- α -D-Glucopiranosas y ramificaciones en posición O-6 cada 8 residuos de la cadena. Las cadenas laterales estaban formadas por unidades de (1→6)- α -D-Glucopiranosas-(1→6)- α -D-Glucopiranosas (FIGURA 27). Chen y cols. en su trabajo con la especie *Pleurotus tuber regium* en 2014 [74], aisló un β -glucano con un alto grado de ramificación, con una estructura principal que podría ser similar a la presentada por ***Be-I***. La cadena principal de este polisacárido estaba formada por unidades de (1→4)- β -D-Glucopiranosas y ramificaciones en posición O-6 constituidas por residuos terminales de β -D-Glucopiranosas, además de cadenas laterales en O-6 formadas por unidades de (1→6)- β -D-Glucopiranosas-(1→6)- β -D-Glucopiranosas y oligómeros de tres unidades (1→3)- β -D-Glucopiranosas-(1→3)- β -D-Glucopiranosas-(1→3)- β -D-Glucopiranosas, con puntos de ramificación a su vez en O-6 de residuos de α -D-Glucopiranosas (FIGURA 27).

por enlaces (1→4) y residuos de manosa unidos por enlaces (1→6) en proporción 1:1. **Cc-II** también presentó un pequeño porcentaje de ramificaciones en posición O-6 de residuos de (1→4)-Glucosa, constituidas por unidades terminales de glucosa. El polisacárido presentó un grado de ramificación bajo de aproximadamente el 9,12%. De su comportamiento en presencia del colorante Rojo Congo se dedujo que **Cc-II** no presentaba estructura terciaria en triple hélice.

Los datos obtenidos no fueron suficientes para deducir con exactitud la estructura de los polisacáridos aislados (distribución de los diferentes enlaces, posición de las ramificaciones a lo largo de la cadena, etc). Tanto **Cc-I** como **Cc-II** podrían estar configurados de muy diversas maneras. En el caso del glucomanano **Cc-I**, una opción para su estructura podría ser una cadena principal de unidades de manosa enlazadas en (1→6), con puntos de ramificación en posición O-3 formados por unidades de glucosa. Los residuos (1→4)-Glucosa detectados podrían estar formando parte de la cadena principal, o bien podrían formar parte de las cadenas laterales. Una posible opción para la estructura principal del glucomanano **Cc-II**, podría ser una cadena formada por unidades de glucosa enlazadas en (1→4) y residuos de manosa unidos por enlaces (1→6), con la presencia de puntos de ramificación en O-6 de residuos de (1→4)-Glucosa formadas por unidades terminales de glucosa. Otra de las múltiples opciones posibles podría ser una cadena de glucosa con enlaces (1→4) y ramificaciones en posición O-6, constituidas por largas cadenas laterales formadas por residuos de (1→6)-Manosa.

La estructura principal de los polisacáridos **Cc-I** y **Cc-II** caracterizados en este trabajo podrían ser similares a las descritas por Roy y cols. y Ghosh y cols. en 2008, aunque con ciertas variaciones en la composición de azúcares y tipo de enlaces. Roy y cols. en 2008 [203] aisló un heteropolisacárido en la especie *Pleurotus sajor-caju*, variedad Black Japan, formado por unidades de D-Glucosa y D-galactosa en proporción 3:1. Este glucogalactano estaba constituido por una cadena principal formada por residuos de (1→6)- α -D-glucopiranosa y (1→4)- β -D-glucopiranosa, con ramificaciones en posición O-6 de residuos de (1→4)- β -D-glucopiranosa y formadas por unidades de α -D-Galactopiranosa (FIGURA 31). El polisacárido aislado por Ghosh y cols. 2008 en *Volvariella displasia* [204], estaba constituido por unidades de D-glucosa, D-manosa y D-galactosa en proporción 3:1:1. La cadena principal estaba formada por residuos (1→6)- α -D-manopiranosa, (1→4)- α -D-glucopiranosa y (1→4)- β -D-glucopiranosa, y ramificaciones en posición O-2 y O-6 de residuos de (1→4)- β -D-glucopiranosa, formadas por unidades de β -D-glucopiranosa y α -D-galactopiranosa, respectivamente (FIGURA 31).

En la bibliografía consultada no se encontraron trabajos de polisacáridos que presentaran una estructura similar a la de **Cg-I**.

Resumiendo, en este trabajo se consiguió la extracción y caracterización de 8 polisacáridos a partir de cuatro especies de setas comestibles, *B. edulis*, *L. deliciosus*, *C- cibarius* y *C. gambosa*. En la mayoría de los casos se trató de polisacáridos de glucosa, o heteropolisacáridos de glucosa y manosa, con diferencias en la proporción de azúcares, tipos de enlace (principalmente (1→3), (1→4) y (1→6)) y grados de ramificación (del 9,12% en **Cc-II**, al 65,47% en **Ld-II**).

A partir de los análisis realizados se pudo obtener una idea general de la composición química, estructura y conformación de los polisacáridos aislados. Para un conocimiento más detallado de la estructura y conformación de estos polisacáridos sería necesario el desarrollo de análisis químicos más exhaustivos y la realización de ensayos biológicos específicos con el fin de determinar su potencial funcional y farmacológico.

CONCLUSIONES

1. En cuanto a la extracción se obtuvieron diversos polisacáridos con distinta composición química, estructura y conformación en las cuatro especies de hongos estudiados y para las diferentes condiciones de extracción realizadas.
2. El porcentaje de carbohidratos totales obtenido fue aproximadamente del 90% en la mayoría de los casos.
3. El tamaño molecular de los polisacáridos extraídos en las fracciones fría y caliente es elevado, del orden de los 500 KDa. El polisacárido de mayor tamaño molecular, 731 KDa, es el polímero **Cc-I**, obtenido en la fracción fría de la especie *Cantharellus cibarius*. Los tamaños moleculares determinados para los polisacáridos aislados en las fracciones alcalinas son significativamente inferiores, no superando los 70 KDa.
4. En las especies *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus* y *Calocybe gambosa* se obtuvieron en todos los casos homopolímeros de glucosa. En la especie *Cantharellus cibarius* los tres polisacáridos extraídos se correspondieron con heteropolímeros de manosa y glucosa en distintas proporciones.
5. Todos los polisacáridos obtenidos, sin excepción, presentaron cadenas laterales con un grado de ramificación medio del 20%. El glucano **Ld-II** de *Lactarius deliciosus* presentó el porcentaje de ramificación más elevado, aproximadamente del 65%; mientras que el glucomanano **Cc-II** de *Calocybe gambosa* presentó un grado de ramificación significativamente inferior, alrededor del 9 %.
6. En cuanto a la conformación, todos los polisacáridos presentaron una estructura terciaria en triple hélice, excepto el glucomanano **Cc-II** de *Cantharellus cibarius*. Los polisacáridos **Ld-II** de *Lactarius deliciosus*, **Cc-I** y **Cc-III** de *Cantharellus cibarius* y **Cg-I** de *Calocybe gambosa*, presentaron una estructura terciaria altamente ordenada, estable incluso bajo fuertes condiciones alcalinas (NaOH 0,5 M).
7. El análisis de metilación de los polisacáridos extraídos reveló la presencia de diferentes tipos de enlace:
 - a. Los glucanos **Be-I** de *Boletus edulis*, **Ld-I** de *Lactarius deliciosus* y **Cc-II** de *Cantharellus cibarius*, presentaron enlaces (1→4) y (1→6) en diferentes proporciones.

- b. Los glucanos **Be-II** y **Ld-II**, de *Boletus edulis* y *Lactarius deliciosus* respectivamente, presentaron enlaces (1→6) y (1→3) en diferentes proporciones.
 - c. Los glucomananos **Cc-I** y **Cc-III** de *Cantharellus cibarius*, y **Cg-I** de *Calocybe gambosa*, presentaron distintas proporciones de enlaces (1→4) (1→3) y (1→6).
8. El análisis del glucano **Be-II** de *Boletus edulis* mediante electroforesis SDS-PAGE determinó que se trataba de un complejo polisacárido-proteína.

CAPÍTULO II:

Perfil de compuestos volátiles presentes en hongos comestibles

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para el presente trabajo se utilizaron los cuerpos fructificantes de seis especies comestibles de Basidiomicetes. Todas ellas son especies silvestres recolectadas en la provincia de Soria entre los años 2009 y 2011, excepto la especie cultivada *Pleurotus ostreatus*, adquirida en supermercados locales durante las mismas fechas (TABLA 1) (FIGURA 1).

TABLA 1. Clasificación taxonómica de las especies de hongos estudiados. Todos los géneros estudiados pertenecen a la división Basidiomycota.

<i>Familia</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>	<i>Nombres comunes</i>	<i>Procedencia</i>
<i>Boletaceae</i>	<i>Boletus</i>	<i>edulis</i>	Miguel Hongo	Recolectada, Soria
<i>Russulaceae</i>	<i>Lactarius</i>	<i>deliciosus</i>	Níscalo Nícalo Rovellón	Recolectada, Soria
<i>Tricholomataceae</i>	<i>Calocybe</i>	<i>gambosa</i>	Lansarón Mansarón Perrochico	Recolectada, Soria
<i>Hygrophoraceae</i>	<i>Hygrophorus</i>	<i>marzuolus</i>	Marzuelo Seta de marzo	Recolectada, Soria
<i>Cantharellaceae</i>	<i>Cantharellus</i>	<i>cibarius</i>	Rebozuelo Setas de haya	Recolectada, Soria
<i>Pleurotaceae</i>	<i>Pleurotus</i>	<i>Ostreatus</i>	Seta de chopo Seta de paca	Cultivada

Todas las muestras, a su llegada al laboratorio, fueron lavadas con agua destilada y cuidadosamente secadas y troceadas en cubos de aproximadamente 0,5 cm². Se tomaron aproximadamente 2 g de muestra fresca para su inmediato análisis, con el fin de obtener el perfil de compuestos orgánicos volátiles en estas condiciones. El resto fue congelado a -20°C durante 48 h para su posterior liofilización (TelstarCryodos 80), tras lo cual fueron homogeneizadas en un molinillo M20 (IKA Werke) hasta obtener un tamaño de partícula inferior a 500 µm. Los hongos pulverizados se almacenaron al vacío en bolsas de plástico (Tecnotrip) a 4°C para su posterior análisis, con el fin de obtener el perfil de compuestos orgánicos volátiles en estas condiciones.



FIGURA 1. Imágenes de las setas estudiadas.

2. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES POR ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía de gases por inyección de espacio de cabeza estática (Headspace-Gas chromatography, HS-GC) constituye actualmente una de las técnicas de referencia para el análisis de compuestos orgánicos volátiles (COVs) en matrices complejas. En este método, la muestra original, ya sea sólida o líquida, se introduce en un vial dejando un espacio libre en la parte superior (espacio de cabeza o Headspace, HS). En primer lugar, y durante un tiempo determinado, el vial y la muestra se mantienen en condiciones de temperatura controlada para permitir el paso de los COVs de la fase sólida a la fase gaseosa del vial hasta que alcanzar un equilibrio entre volátiles unidos a la matriz del alimento y aquellos presentes en la fase gaseosa (FIGURA 2) [208].

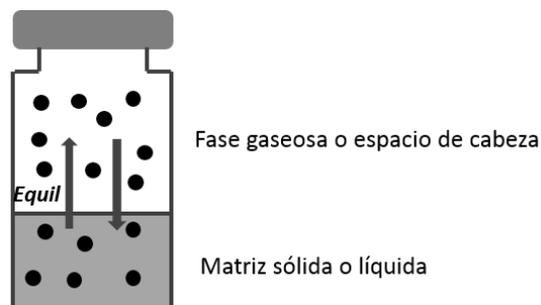


FIGURA 2. Formación del equilibrio estático en un vial de muestra para análisis por espacio de cabeza.

Tras alcanzar un equilibrio entre fases, se toma un volumen determinado de la fase gaseosa o espacio de cabeza, alícuota que es transferida a un cromatógrafo de gases equipado con una columna de separación adecuada (FIGURA 3)[208].

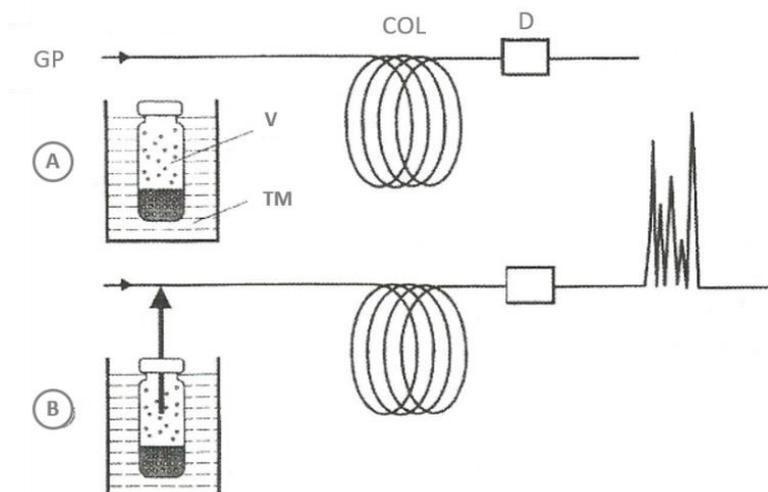


FIGURA 3. Principios de la cromatografía de gases por inyección de espacio de cabeza estático (HS-GC). (A) Fase de equilibrio de la muestra y (B) transferencia de una alícuota de la fase gaseosa al cromatógrafo de gases. GP= Gas portador, V= Vial de muestra, TM= Termostato, COL= Columna del cromatógrafo de gases, D= Detector [208].

El perfil de compuestos volátiles fue analizado mediante un muestreador de espacio de cabeza Turbomatrix 16 Headspace (Perkin Elmer) acoplado a un cromatógrafo de gases con un espectrómetro de masas como detector (GC-MS). Se introdujeron aproximadamente 2 g de muestra en viales de 4 ml, los cuales que fueron cerrados herméticamente y sometidos a 120°C durante 60 minutos en el interior del muestreador, permitiendo así la liberación de los compuestos orgánicos volátiles hacia el espacio de cabeza del vial. Tras alcanzar un equilibrio entre fases, una alícuota de la muestra fue transferida al cromatógrafo de gases.

La separación de los compuestos volátiles se llevó a cabo mediante cromatografía de gases en un equipo de la casa Perkin Elmer, modelo Clarus 500, equipado con una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 μ m, Perkin Elmer) (FIGURA 10). El gas portador fue helio con un flujo constante de 1 ml/min (25 psi) en modo splitless. La temperatura del inyector se mantuvo a 240°C. Los componentes de la muestra se separaron mediante un programa de temperatura que comienza isotérmicamente a 40°C mantenido durante 5 min, para subir a razón de 20°C/min hasta los 70°C; seguidamente se subió a razón de 10°C/min hasta los 140°C, y para terminar se elevó hasta los 250°C a razón de 5°C/min, temperatura que se mantuvo durante 2 min. La temperatura del programa fue elegida para permitir la separación de los distintos compuestos: los altamente volátiles eluyen a temperaturas superiores a 70°C y los menos volátiles a temperaturas más elevadas.

La identificación y cuantificación de los compuestos orgánicos volátiles se realizó mediante un detector de masas de la casa Perkin Elmer, modelo Clarus 560, acoplado al cromatógrafo de gases. La ionización se llevó a cabo por impacto electrónico (*ElectronImpact*, EI). La temperatura de la fuente de iones fue de 220°C y se trabajó con un potencial de ionización de 70 eV. El tiempo total de análisis fue de 37,5 min. El procesado de los datos se realizó con el programa TurboMass versión 5.4.2. La identificación de los picos se realizó por similitud con los espectros de masas recogidos en la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) y mediante comparación con los tiempos de retención y espectros de masas de las referencias bibliográficas consultadas. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos en los cromatogramas obtenidos por GC-MS. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico se utilizó el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Los datos fueron expresados como media \pm desviación estándar de tres análisis y muestras independientes.

En el caso de los resultados obtenidos para las muestras frescas y muestras liofilizadas, los valores de las medias fueron analizados por el test de Student para comprobar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos. Se realizó este análisis para cada una de las especies estudiadas.

En la comparación de resultados entre las distintas especies sometidas a los distintos tratamientos, los valores obtenidos fueron analizados usando el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas entre los valores, las medias fueron comparadas usando el test de Tukey HSD ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. GENERAL

Las setas son hongos comestibles muy populares apreciados por su característico sabor y aroma así como por su gran valor nutricional y funcional [21]. Las setas frescas son productos perecederos con una vida media muy limitada, sufriendo tras su recolección numerosos cambios fisiológicos y morfológicos que las hacen inaceptables para su consumo. Las setas son también utilizadas como materia prima en la investigación y desarrollo de alimentos funcionales, producción de aromas, etc [7, 137]. Para ello es fundamental garantizar la estabilidad del producto extendiendo su vida media mediante tratamientos de conservación adecuados.

El método más popular de conservación en setas es la desecación, destacando procesos de secado como el tradicional por calor, por convección forzada, por infrarrojos, por microondas o liofilización, entre otros [209]. A pesar de su alto coste económico y tiempo requerido, la liofilización es uno de los métodos de conservación más indicados en investigación por su excelente capacidad para preservar la calidad del alimento, manteniendo la forma y una buena capacidad de rehidratación del producto final liofilizado [210]. Por contra la liofilización tiene un gran inconveniente, la variación del perfil de COVs presentes en el alimento durante el proceso, debido a la pérdida parcial de sustancias altamente volátiles y a la formación de nuevos compuestos como resultado de diversas reacciones químicas y enzimáticas [142, 211, 212].

Los compuestos volátiles responsables del aroma y sabor característicos de setas han sido bien estudiados y documentados [144, 145, 213-215]. El típico aroma a setas frescas comprende una mezcla de COVs incluyendo alcoholes, cetonas, aldehídos, compuestos de azufre, compuestos heterocíclicos, terpenos, ácidos y ésteres e hidrocarburos, entre los que destacan una serie de compuestos derivados de 8 carbonos como principales responsables, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-ona, 3-octanona y 3-octanol entre otros [49, 216]. En particular el alcohol insaturado 1-octen-3-ol, descrito como el “alcohol de setas”, es considerado como el mayor contribuyente del olor a setas [141, 144]. Se ha podido demostrar que el origen biosintético de éstos compuestos C8, y en particular del alcohol 1-octen-3-ol, es la oxidación de los ácidos grasos linoleico y linolénico en presencia de enzimas lipoxigenasas [49, 149]. Tras el proceso de liofilización se produce la pérdida de alguno de éstos compuestos y la aparición de otros de nueva síntesis como los aldehídos 2-metilpropanal, 3-metilbutanal y 2-metilbutanal, productos típicos de la reacción de Maillard, y responsables del aroma característico a seta desecada [138, 217, 218].

En el presente trabajo se ha analizado la influencia del proceso de liofilización en el perfil de compuestos orgánicos volátiles de seis especies de setas comestibles, cinco especies silvestres, *B. edulis*, *L. deliciosus*, *C. gambosa*, *H. marzuolus* y *C. cibarius*, y una especie cultivadas, *P. ostreatus*. Las sustancias volátiles presentes en las muestras fueron evaluadas mediante la técnica HS estático combinada con GC-MS.

Este análisis nos permitió la identificación tentativa de un total de 46 compuestos, incluyendo 4 alcoholes, 10 cetonas, 15 aldehídos, 1 compuesto de azufre, 7 compuestos heterocíclicos, 5 hidrocarburos, 2 ácidos y ésteres y 2 terpenos (TABLA 1). El número de COVs identificados en cada especie varía ampliamente, desde sólo 24 compuestos detectados en *P. ostreatus* hasta un total de 35 en *C. cibarius*. En todas las especies se observó un aumento en el número de compuestos detectados tras la liofilización, como es el caso de *C. gambosa*, que pasa de 14 compuestos en muestras frescas a 28 en las liofilizadas; o el caso de *H. marzuolus*, especie en la que el número de COVs identificados varió de 21 en muestras frescas, a 30 compuestos tras la liofilización. Este aumento podría ser debido a la formación de nuevos compuestos durante el proceso de desecado como resultado de diversas reacciones químicas y enzimáticas [49, 149].

Como se puede observar en la TABLA 2, el porcentaje correspondiente a cada familia de compuestos varía considerablemente de una especie a otra. Como era de esperar tras el proceso de liofilización también se observaron cambios significativos en los porcentajes relativos correspondientes a cada familia de compuestos, detectándose en todos los casos un aumento en la proporción de aldehídos, y en general una disminución en el contenido de alcoholes, cetonas y compuestos heterocíclicos. La proporción de compuestos de azufre aumenta en las especies silvestres *B. edulis* e *H. marzuolus* tras la liofilización, mientras que disminuye significativamente en la especie cultivada *C. cibarius*. El porcentaje de hidrocarburos detectado en las especies silvestres *B. edulis* y *L. deliciosus* disminuye, mientras que en *C. cibarius* se mantiene sin cambios y aumenta significativamente en *C. gambosa* e *H. marzuolus*. Se observó un aumento significativo del contenido en terpenos en las especies *C. cibarius* y *C. gambosa* y una disminución, hasta el punto de no ser detectados, en *L. deliciosus*, sin embargo el contenido en ácidos y ésteres no sufrió cambios significativos tras el tratamiento de liofilización.

TABLA 1. Perfil de compuestos volátiles de seis especies de setas comestibles, expresado como concentración relativa (%) ± desviación estándar.

No. ¹	Compuestos	TR ²	Muestras frescas ³						Muestras liofilizadas ⁴					
			<i>B. edulis</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>C. gambosa</i>	<i>H. marzuolus</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>B. edulis</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>C. gambosa</i>	<i>H. marzuolus</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>P. ostreatus</i>
Alcoholes														
1	1-Pentanol	7,62	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,41±0,07a	nd	nd
2	1-Octen-3-ol	12,03	39,18±4,48b ⁵	32,83±5,17c	12,31±2,63e	46,98±0,42a	29,58±4,16c	41,29±1,22ab	43,51±1,15ab	1,77±0,00f	2,54±0,04f	2,85±0,20f	20,68±0,20d	6,37±0,12f
3	3-Octanol	12,42	nd	nd	nd	nd	nd	14,11±2,79b	nd	nd	1,15±0,09c	0,28±0,09c	1,23±0,12c	17,61±1,17a
4	2-Nonen-1-ol	13,66	1,82±0,52a	1,38±0,32b	nd	0,61±0,14cd	0,71±0,24c	nd	nd	nd	nd	0,18±0,02de	nd	nd
Cetonas														
5	2-Pentanona	5,13	nd	nd	nd	nd	1,46±0,24b	nd	nd	nd	nd	nd	5,44±0,37a	nd
6	3-Hexen-2-ona	9,20	nd	nd	nd	nd	0,70±0,36b	nd	nd	nd	nd	nd	1,15±0,07a	nd
7	2-Heptanona	10,24	0,42±0,13c	nd	nd	0,26±0,06d	nd	0,41±0,14c	0,14±0,01de	0,71±0,01a	0,50±0,02bc	0,69±0,04a	0,58±0,03ab	0,23±0,02d
8	1-Octen-3-ona	11,93	1,94±0,49a	0,52±0,04b	1,76±0,73a	1,86±0,60a	0,86±0,36b	0,86±0,18b	trb ⁶	nd	trb	trb	trb	nd
9	3-Octanona	12,08	3,95±0,13de	2,90±0,52def	20,73±2,84a	4,95±0,68d	1,64±0,24efg	11,61±1,54b	nd	0,98±0,01fg	2,62±0,02def	2,62±0,11def	4,19±0,14de	7,94±0,24c
10	δ-lactona	13,35	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,69±0,05b	1,16±0,05a	nd
11	2-Nonanona	14,14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,23±0,02a	nd	nd	nd	nd
12	2-Decanona	15,99	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,68±0,04a	trb	nd	0,10±0,00b	nd	nd
13	3-Decen-2-ona	16,93	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,17±0,01a	nd	nd	nd	nd	nd
14	2-Undecanona	17,89	2,61±0,20a	nd	nd	0,45±0,14b	0,55±0,10b	0,37±0,19bc	trd	nd	0,15±0,01cd	0,33±0,03bc	nd	nd
Aldehidos														
15	2-Metilpropanal	3,80	3,18±1,28ef	2,15±0,77efg	5,89±0,35d	3,57±1,10e	1,42±0,11g	1,62±0,09fg	12,90±0,44c	18,26±0,06a	19,36±0,47a	19,73±0,51a	15,18±0,63b	15,35±0,36b
16	Butanal	4,14	1,71±0,58bcd _e	1,90±0,97bcd	1,27±0,20cd _e	2,79±0,80bc	5,86±1,72a	0,38±0,04de	nd	0,72±0,09de	1,66±0,41bcd _e	1,23±0,10cde	3,40±0,19b	0,44±0,04de
17	3-Metilbutanal	5,07	9,15±3,26e	13,51±2,52d	22,02±1,34c	7,37±0,22e	2,31±0,71f	6,33±0,84e	22,12±0,22c	50,46±0,29a	32,35±0,76b	34,42±0,38b	19,03±0,50c	31,26±0,14b
18	2-Metilbutanal	5,26	2,29±1,03gh	2,32±0,98gh	7,79±1,02f	2,58±0,47g	0,85±0,22h	1,79±0,16gh	15,02±0,36d	15,73±0,66cd	24,68±0,64a	20,01±0,25b	10,00±0,01e	17,00±0,73c
19	Pentanal	5,94	0,89±0,30cde	1,03±0,54cd	0,71±0,11cd _e	0,56±0,24cde	4,40±0,73a	1,26±0,25c	0,10±0,01e	1,28±0,10c	0,29±0,02de	2,37±0,23b	2,32±0,19b	0,20±0,01de
20	3-Metilpentanal	6,86	13,20±2,95a	15,64±4,20a	2,51±0,43bc	12,16±2,84a	3,91±0,58bc	5,28±1,33b	0,26±0,01c	nd	nd	nd	nd	nd
21	2-Metilpentanal	7,05	1,81±0,38d	1,06±0,21ef	0,66±0,19fg	0,80±0,33efg	3,11±0,26b	0,74±0,16fg	0,36±0,00g	0,62±0,05fg	1,24±0,04e	2,65±0,10c	3,96±0,07a	0,41±0,01g
22	Hexanal	8,21	3,83±1,11cd	11,50±2,43b	2,60±0,27de	3,84±1,33cd	24,39±0,81a	6,49±1,45c	0,33±0,02e	4,30±0,08cd	0,48±0,02e	5,46±0,28c	4,56±0,24cd	0,72±0,07e
23	2-Metil-2-Hexenal	9,91	nd	nd	6,16±1,27a	1,91±0,40b	nd	nd	0,19±0,03c	0,15±0,05c	0,94±0,02c	nd	nd	0,23±0,07c
24	Heptanal	10,49	0,75±0,26c	0,65±0,33c	5,80±0,62a	0,79±0,22c	1,43±0,50b	0,38±0,06c	0,39±0,00c	0,24±0,03c	0,15±0,04c	0,32±0,03c	0,62±0,05c	0,12±0,03c
25	Benzaldehido	11,77	0,96±0,29a	0,42±0,20bc	nd	0,68±0,18ab	0,44±0,12bc	0,35±0,06bcd	0,12±0,04cd	0,28±0,02cd	0,28±0,05cd	0,69±0,03ab	0,33±0,11cd	0,15±0,08cd
26	Octanal	12,51	0,34±0,08cde	0,64±0,16bc	nd	nd	0,86±0,37b	1,75±0,12a	nd	0,13±0,02de	nd	0,23±0,07de	0,41±0,02cd	0,30±0,06de
27	Benceneacetaldehido	13,37	0,38±0,06bc	0,77±0,26a	nd	0,87±0,41a	nd	nd	nd	0,17±0,04bc	0,25±0,04bc	0,50±0,12ab	nd	0,14±0,04bc
28	2-octenal	13,57	nd	nd	nd	1,15±0,18a	0,48±0,13b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tabla 1. Continuación

No ¹	Compuestos	TR ²	Muestras frescas ³						Muestras liofilizadas ⁴					
			<i>B. edulis</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>C. gambosa</i>	<i>H. marzuolus</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>B. edulis</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>C. gambosa</i>	<i>H. marzuolus</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>P. ostreatus</i>
29	Nonanal	14,36	1,08±0,13a	0,85±0,42ab	0,93±0,29ab	nd	1,28±0,33a	0,52±0,09bc	nd	0,30±0,05cd	0,18±0,01cd	nd	0,29±0,02cd	nd
	Compuestos de azufre													
30	Dimetil disulfuro	6,90	nd	nd	3,81±1,29a	nd	nd	nd	0,86±0,16b	nd	trb	nd	trb	nd
	Compuestos heterocíclicos													
31	Metilpirazina	9,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,19±0,02b	nd	nd	1,47±0,13a	0,20±0,02b	nd
32	2,5-dimetilpirazina	10,86	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,63±0,09b	nd	tre	1,25±0,04a	0,40±0,02c	0,30±0,05d
33	Etilpirazina	10,94	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,28±0,06b	0,50±0,01a	nd	nd
34	2-Pentil-furano	12,21	10,16±1,12a	3,38±1,16bc	8,63±0,60a	9,79±1,73a	4,55±0,22b	4,46±1,14b	0,43±0,08d	2,27±0,05cd	3,01±0,18bc	0,64±0,04d	1,97±0,16cd	0,26±0,02d
35	2-Etil-5-metil pirazina	12,59	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,67±0,12b	0,27±0,05d	0,36±0,04cd	1,58±0,11a	0,51±0,07bc	0,54±0,20bc
36	2-Etil-3-metil pirazina	12,61	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,46±0,12a	nd	nd
37	3-Etil-2,5-dimetil pirazina	13,97	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,59±0,04b	nd	nd	1,96±0,04a	0,25±0,03d	0,44±0,12c
	Hidrocarburos													
38	1,3-Octadieno	8,71	0,19±0,08bc	1,16±0,54a	0,49±0,10b	nd	nd	nd	trbc	0,13±0,04bc	0,27±0,03bc	nd	nd	nd
39	3-Etil-2-metil 1,3-Hexadieno	13,04	0,15±0,01c	nd	0,37±0,07a	nd	nd	nd	nd	nd	0,30±0,05b	nd	nd	nd
40	Undecano	14,24	nd	1,75±0,73a	0,42±0,15b	nd	nd	nd	nd	0,28±0,02b	0,19±0,01b	0,18±0,04b	0,14±0,00b	nd
41	Tridecano	16,06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	trc	0,27±0,03a	0,30±0,03a	0,11±0,00a	0,14±0,02a	nd
42	Hexadecano	17,96	nd	nd	nd	nd	nd	nd	trd	0,22±0,04b	0,35±0,03a	0,17±0,01c	0,17±0,02c	nd
	Ácidos y ésteres													
43	Ácido octanoico metil éster	14,67	nd	nd	0,39±0,05a	nd	nd	nd	nd	nd	0,32±0,03b	nd	nd	nd
44	Ácido decanoico etil éster	19,86	nd	trb	nd	nd	nd	nd	nd	0,14±0,06a	nd	nd	nd	nd
	Terpenos													
45	Óxido de Cariofileno	24,01	nd	3,54±1,47a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
46	linalool	14,46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,19±0,04b	1,06±0,03a	nd	nd

¹ No.: Número de compuestos observados en el perfil de GC-MS.

² TR.: Tiempo de retención (min) determinado en una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 µm, Perkin Elmer).

³ Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras frescas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

⁴ Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras liofilizadas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

⁵ Misma letra en la misma línea: no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

⁶ tr: trazas, concentración relativa del compuesto <0,10%

Tabla 2. Concentración relativa (%) de los principales grupos de compuestos orgánicos volátiles identificados en muestras frescas y liofilizadas de las seis especies de setas analizadas.

	<i>Alcoholes</i>	<i>Cetonas</i>	<i>Aldehídos</i>	<i>Compuestos de azufre</i>	<i>Compuestos heterocíclicos</i>	<i>Hidrocarburos</i>	<i>Ácidos y ésteres</i>	<i>Terpenos</i>
Muestras frescas¹								
<i>B. edulis</i>	41,01±4,94c ³	8,92±0,65c	39,56±4,99f	nd	10,16±1,12ab	0,35±0,07cd	nd	nd
<i>L. deliciosus</i>	34,21±4,87d	3,42±0,47efg	52,46±5,55e	nd	3,38±1,16cde	2,91±0,70a	trd ⁴	3,54±1,47a
<i>C. gambosa</i>	12,31±2,63f	22,49±3,12a	55,41±2,27de	nd	9,79±1,73ab	nd	nd	nd
<i>H. marzuolus</i>	47,59±0,45b	7,51±1,01cd	40,35±0,57f	nd	4,55±0,22c	nd	nd	nd
<i>C. cibarius</i>	30,28±4,03d	5,21±0,67de	50,39±2,09e	3,81±1,29a	8,63±0,60b	1,28±0,20b	0,39±0,05a	nd
<i>P. ostreatus</i>	55,40±1,69a	13,25±1,31b	26,89±1,87g	nd	4,46±1,14cd	nd	nd	nd
Muestras liofilizadas²								
<i>B. edulis</i>	43,51±1,15bc	1,14±0,11g	51,79±0,84e	0,86±0,16b	2,32±0,24de	0,19±0,02d	nd	nd
<i>L. deliciosus</i>	1,77±0,00g	2,00±0,02fg	92,64±0,29a	nd	2,54±0,09cde	0,90±0,13bc	0,14±0,06c	nd
<i>C. gambosa</i>	3,69±0,06g	3,30±0,02efg	81,69±0,12b	nd	10,85±0,06a	0,47±0,05cd	nd	1,06±0,03b
<i>H. marzuolus</i>	3,72±0,30g	4,52±0,21ef	87,92±0,70a	trb	3,33±0,20cde	0,45±0,04cd	nd	nd
<i>C. cibarius</i>	21,91±0,09e	12,58±0,49b	59,97±0,63d	trb	3,73±0,20cd	1,40±0,10b	0,32±0,03b	0,19±0,04b
<i>P. ostreatus</i>	23,98±1,27e	8,16±0,21c	66,32±1,41c	nd	1,54±0,27e	nd	nd	nd

¹ Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras frescas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

² Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras liofilizadas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

³ Misma letra en la misma columna: no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

⁴ tr: trazas, concentración relativa del compuesto $< 0,10\%$

2. POR FAMILIAS

2.1. ALCOHOLES

Dentro de la familia de los **alcoholes** se identificaron un total de 4 compuestos: 1-pentanol, 1-octen-3-ol, 3-octanol y 2-nonen-1-ol (TABLA 1).

Tras el análisis de las *muestras frescas* (TABLA 3), se observó que el compuesto 1-octen-3-ol fue el más abundante en todas las especies de setas estudiadas, alcanzando valores de hasta el 46,98% en *H. marzuolus*, el 41,29% en *P. ostreatus* y el 39,18% en *B. edulis*. El alcohol 3-octanol fue identificado exclusivamente en la especie *P. ostreatus* a una concentración relativa del 14,11%. También se detectó un pequeño porcentaje de 2-nonen-1-ol en las especies *B. edulis*, *L. deliciosus*, *H. marzuolus* y *C. cibarius*.

En el análisis de las *muestras liofilizadas* (TABLA 3), además de los alcoholes anteriormente mencionados, se detectó un nuevo compuesto, 1-pentanol, en la especie silvestre *H. marzuolus* a una concentración del 0,41%. Tras la liofilización, el alcohol 3-octanol, además de en la especie *P. ostreatus*, fue detectado en *C. gambosa*, *H. marzuolus* y *C. cibarius*.

El grupo de los alcoholes, junto con la familia de los aldehídos y las cetonas, es uno de los más abundantes en muestras frescas. El mayor porcentaje de alcoholes se detectó en las especies *P. ostreatus* (55,40%) e *H. marzuolus* (47,59%), seguidas de *B. edulis* (41,01%), *L. deliciosus* (34,21%) y *C. cibarius* (30,28%), mientras que *C. gambosa* presentó una concentración significativamente inferior (12,31%) (TABLA 2).

En general tras el proceso de liofilización se observó una disminución en el contenido de alcoholes totales. Como se ve reflejado en la FIGURA 1, esta drástica disminución se debe principalmente a la pérdida del alcohol 1-octen-3-ol, hecho que ya ha sido observado por otros autores en algunos de sus trabajos [142, 219, 220]. Únicamente en *B. edulis* se mantiene la concentración relativa de este alcohol en las muestras liofilizadas. El porcentaje de 2-nonen-1-ol en las muestras desecadas disminuye hasta el punto de no ser detectado en la mayoría de especies. También se observó la aparición de un nuevo compuesto, 1-pentanol, tras el tratamiento de liofilización.

TABLA 3. Perfil de alcoholes detectados, expresado como concentración relativa (%) \pm desviación estándar.

	1-Pentanol	1-Octen-3-ol	3-Octanol	2-Nonen-1-ol
Muestras frescas¹				
<i>B.edulis</i>	nd	39,18 \pm 4,48b ⁴	nd	1,82 \pm 0,52a
<i>L.deliciosus</i>	nd	32,83 \pm 5,17c	nd	1,38 \pm 0,32b
<i>C.gambosa</i>	nd	12,31 \pm 2,63e	nd	nd
<i>H.marzuolus</i>	nd	46,98 \pm 0,42a	nd	0,61 \pm 0,14cd
<i>C.cibarius</i>	nd	29,58 \pm 4,16c	nd	0,71 \pm 0,24c
<i>P.ostreatus</i>	nd	41,29 \pm 1,22ab	14,11 \pm 2,79b	nd
Muestras liofilizadas²				
<i>B.edulis</i>	nd	43,51 \pm 1,15ab	nd	nd
<i>L.deliciosus</i>	nd	1,77 \pm 0,00f	nd	nd
<i>C.gambosa</i>	nd	2,54 \pm 0,04f	1,15 \pm 0,09c	nd
<i>H.marzuolus</i>	0,41 \pm 0,07a	2,85 \pm 0,20f	0,28 \pm 0,09c	0,18 \pm 0,02de
<i>C.cibarius</i>	nd	20,68 \pm 0,20d	1,23 \pm 0,12c	nd
<i>P.ostreatus</i>	nd	6,37 \pm 0,12f	17,61 \pm 1,17a	nd
TR³	7,62	12,03	12,42	13,66

¹ Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras frescas, expresado en porcentajes \pm desviación estándar.

² Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras liofilizadas, expresado en porcentajes \pm desviación estándar.

³ TR.: Tiempo de retención (min) determinado en una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 μ m, Perkin Elmer).

⁴ Misma letra en la misma columna: no existen diferencias significativas entre valores ($p < 0,05$).

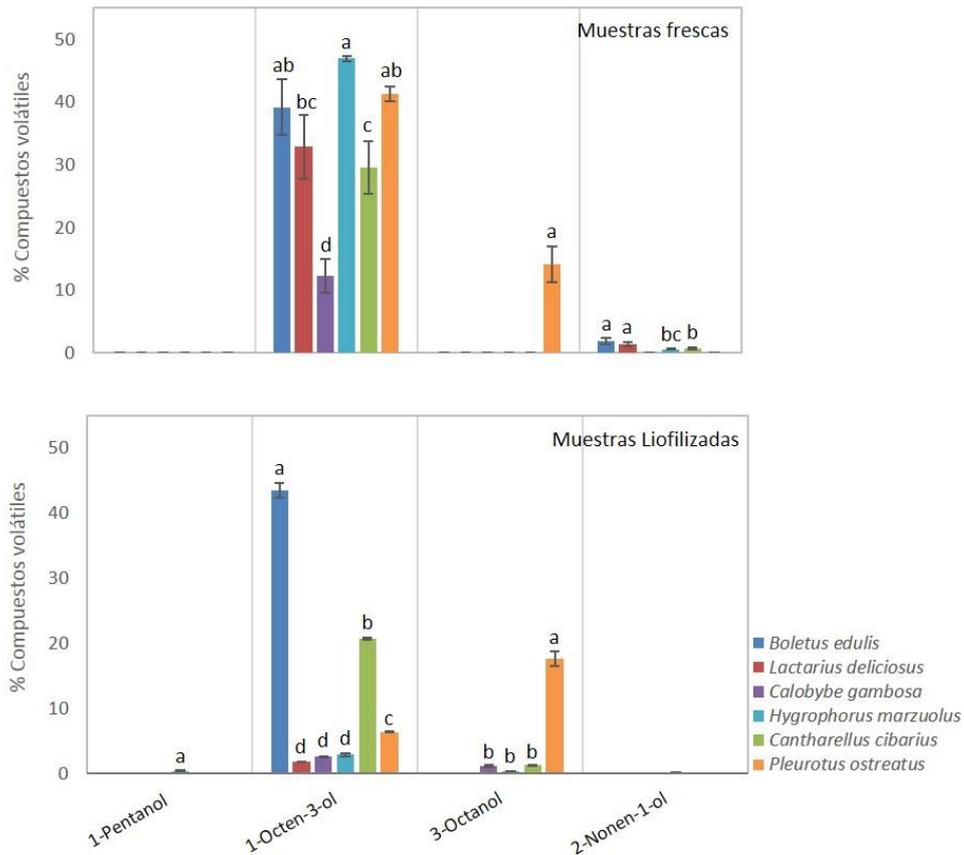


FIGURA 1. Comparación del contenido en alcoholes (%) en muestras frescas y liofilizadas de seis especies de setas comestibles. Los valores medios con diferente letra en cada tratamiento, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

2.2. CETONAS

La familia de las **cetonas** está integrada por 10 compuestos: 2-pentanona, 3-hexen-2-ona, 2-heptanona, 1-octen-3-ona, 3-octanona, δ -lactona, 2-nonanona, 2-decanona, 3-decen-2-ona y 2-undecanona (TABLA 1).

Como se observa en la TABLA 4, en el caso de las *muestras frescas* las cetonas 1-octen-3-ona y 3-octanona fueron detectadas en todas las especies analizadas, siendo la 3-octanona la más abundante en la mayoría de especies estudiadas. *C. gambosa* presenta la mayor concentración de 3-octanona (20,73%), seguida de *P. ostreatus* (11,61%) e *H. marzuolus* (4,95%). La cantidad de 1-octen-3-ona detectada fue muy similar en todas las especies analizadas, observándose una mayor concentración en *B. edulis*, *H. marzuolus* y *C. gambosa* (1,94%, 1,86% y 1,76%, respectivamente). Las cetonas 2-pentanona y 3-hexen-2-ona fueron detectadas únicamente en *C. cibarius*, resultados que fueron similares a los obtenidos por Pysalo en 1976 [216]. La cetona 2-heptanona fue detectada en pequeñas concentraciones en

las especies *B. edulis* (0,42), *H. marzuolus* (0,26%) y *P. ostreatus* (0,41%). Por último el compuesto 2-undecanona fue identificado en las especies *H. marzuolus*, *C. cibarius* y *P. ostreatus*, y en mayor proporción en *B. edulis* (2,61%).

En el análisis de las *muestras liofilizadas* (TABLA 4), se observa la aparición de nuevos compuestos cetónicos, como δ -lactona, 2-nonanona, 2-decanona y 3-decen-2-ona, detectados a baja concentración y solo en algunas de las especies de setas estudiadas.

En las muestras frescas el porcentaje de compuestos cetónicos es variable, comprendido entre un 3,4% en la especie *L. deliciosus* y un 22,49% en *C. gambosa* (TABLA 2). Tras el tratamiento de liofilización se observa una disminución significativa en la concentración de cetonas totales, exceptuando la especie *C. cibarius*, en la que la proporción aumenta significativamente del 5,21% al 12,58% tras el proceso de desecación. Esta disminución es debida básicamente a la pérdida de las cetonas 1-octen-3-ona y 3-octanona, las cuales dejan de detectarse en algunos casos. Por el contrario, como se observa en la FIGURA 2, los compuestos 2-pentanona y 3-hexen-2-ona detectados en *C. cibarius* aumentan su concentración de forma significativa. La cetona 2-heptanona aumenta su presencia en las muestras desecadas siendo ahora detectada en todas las especies de setas analizadas. Además de la disminución del contenido de algunas cetonas, se observó un aumento en el número de compuestos detectados con la identificación de 4 nuevas cetonas: δ -lactona, 2-nonanona, 2-decanona y 3-decen-2-ona (FIGURA 2).

TABLA 4. Perfil de compuestos cetónicos detectados, expresado como concentración relativa (%) ± desviación estándar.

	2-Pentanona	3-Hexen-2-ona	2-Heptanona	1-Octen-3-ona	3-Octanona	δ-lactona	2-Nonanona	2-Decanona	3-Decen-2-ona	2-Undecanona
Muestras frescas¹										
<i>B. edulis</i>	nd	nd	0,42±0,13c ⁴	1,94±0,49a	3,95±0,13de	nd	nd	nd	nd	2,61±0,20a
<i>L. deliciosus</i>	nd	nd	nd	0,52±0,04b	2,90±0,52def	nd	nd	nd	nd	nd
<i>C. gambosa</i>	nd	nd	nd	1,76±0,73a	20,73±2,84a	nd	nd	nd	nd	nd
<i>H. marzuolus</i>	nd	nd	0,26±0,06d	1,86±0,60a	4,95±0,68d	nd	nd	nd	nd	0,45±0,14b
<i>C. cibarius</i>	1,46±0,24b	0,70±0,36b	nd	0,86±0,36b	1,64±0,24efg	nd	nd	nd	nd	0,55±0,10b
<i>P. ostreatus</i>	nd	nd	0,41±0,14c	0,86±0,18b	11,61±1,54b	nd	nd	nd	nd	0,37±0,19bc
Muestras liofilizadas²										
<i>B. edulis</i>	nd	nd	0,14±0,01de	trb ⁵	nd	nd	nd	0,68±0,04a	0,17±0,01a	trd
<i>L. deliciosus</i>	nd	nd	0,71±0,01a	nd	0,98±0,01fg	nd	0,23±0,02a	trb	nd	nd
<i>C. gambosa</i>	nd	nd	0,50±0,02bc	trb	2,62±0,02def	nd	nd	nd	nd	0,15±0,01cd
<i>H. marzuolus</i>	nd	nd	0,69±0,04a	trb	2,62±0,11def	0,69±0,05b	nd	0,10±0,00b	nd	0,33±0,03bc
<i>C. cibarius</i>	5,44±0,37a	1,15±0,07a	0,58±0,03ab	trb	4,19±0,14de	1,16±0,05a	nd	nd	nd	nd
<i>P. ostreatus</i>	nd	nd	0,23±0,02d	nd	7,94±0,24c	nd	nd	nd	nd	nd
TR³	5,13	9,20	10,24	11,93	12,08	13,35	14,14	15,99	16,93	17,89

¹ Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras frescas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

² Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras liofilizadas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

³ TR.: Tiempo de retención (min) determinado en una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 µm, Perkin Elmer).

⁴ Misma letra en la misma columna: no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

⁵ tr: trazas, concentración relativa del compuesto <0,10%.

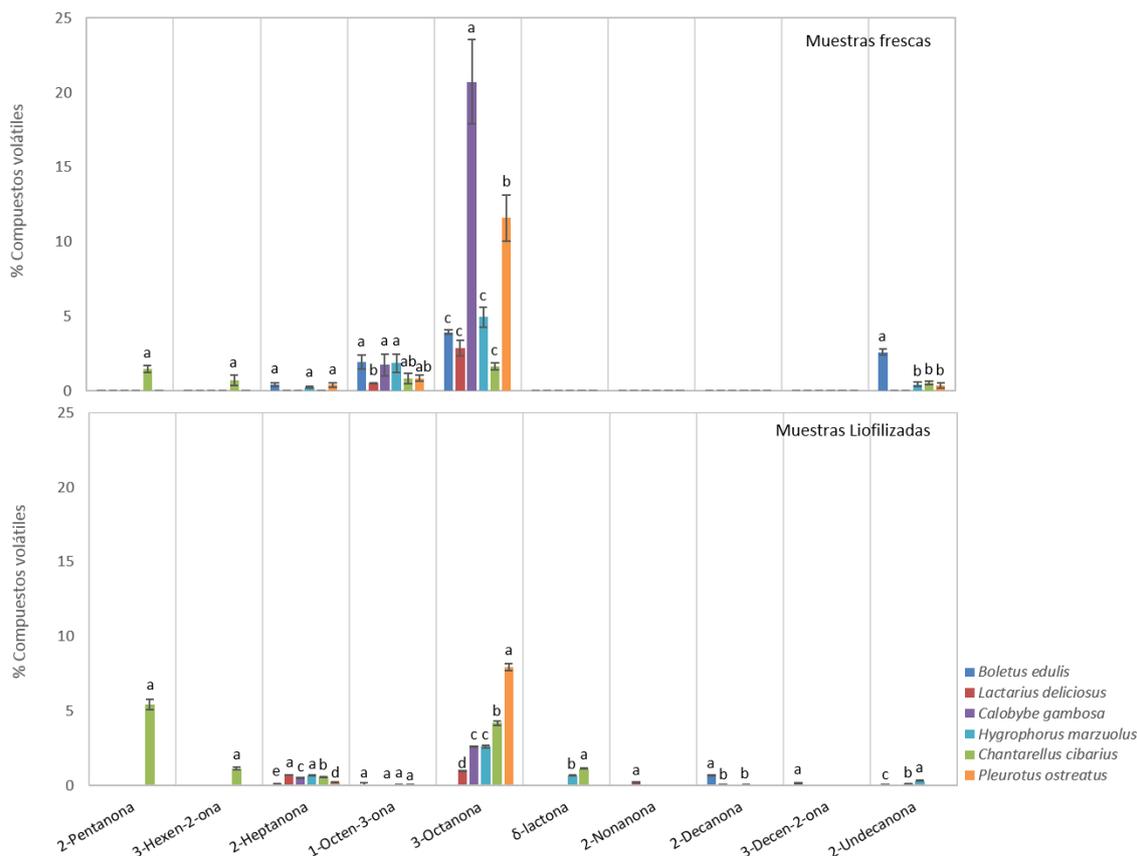


FIGURA 2. Comparación del contenido en compuestos cetónicos (%) en muestras frescas y liofilizadas de seis especies de setas comestibles. Los valores medios con diferente letra en cada tratamiento, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

2.3. ALDEHIDOS

La familia de los **aldehídos** engloba un total de 15 compuestos identificados: 2-metilpropanal, butanal, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, pentanal, 3-metilpentanal, 2-metilpentanal, hexanal, 2-metil-2-hexenal, heptanal, benzaldehído, octanal, benzeneacetaldehído, 2-octenal y nonanal (TABLA 1).

En el análisis de las *muestras frescas* (TABLA 5), el aldehído 3-metilpentanal es uno de los compuestos más abundantes (15,64% en *L. deliciosus*, 13,20% en *B. edulis* y 12,16% en *H. marzuolus*), junto con 3-metilbutanal (22,02% en *C. gambosa* y 13,51% en *L. deliciosus*) y hexanal (24,39% en *C. cibarius* y 11,50% en *L. deliciosus*). Igualmente se detectaron otros compuestos minoritarios presentes en todas las especies de setas analizadas: 2-metilpropanal, butanal, 2-metilbutanal, pentanal, 2-metilpentanal y heptanal. El aldehído 2-metil-2-hexenal se detectó únicamente en las especies silvestres *C. gambosa* (6,16%) e *H. marzuolus* (1,91%). Otros aldehídos como el octanal, 2-octenal y nonanal fueron detectados a baja concentración en

algunas de las setas analizadas. Por último también se identificaron dos aldehídos aromáticos, el benzaldehído y el benceneacetaldehído, a concentraciones inferiores al 1%.

En todas las *muestras liofilizadas* (TABLA 5), los aldehídos detectados de forma mayoritaria fueron 2-metilpropanal, 3-metilbutanal y 2-metilbutanal. Además se siguen detectando pequeñas proporciones de los aldehídos aromáticos benzaldehído y benceneacetaldehído, y de los aldehídos alifáticos butanal, pentanal, 2-metilpentanal, hexanal, 2-metil-2-hexenal, heptanal y nonanal.

La familia de los aldehídos, junto con la familia de los alcoholes, fue una de las más abundantes antes y después del tratamiento de liofilización. En muestras frescas las especies *C. gambosa* y *L. deliciosus* presentaron la mayor concentración de aldehídos, 55,41% y 52,46% respectivamente (TABLA 2). Tras la liofilización se observó un aumento significativo en la concentración total de compuestos aldehídos, de hasta un 40% en casos como el de *L. deliciosus* especie en la que se alcanza una concentración máxima del 92,64% (TABLA 2). Como podemos observar en la FIGURA 3, los compuestos implicados en este gran aumento son 2-metilpropanal, 3-metilbutanal y 2-metilbutanal, típicos productos derivados de la reacción de Maillard [138, 217, 218] y unos de los responsables del típico olor a seta desecada [138, 212] (FIGURA 5). Por el contrario, el aldehído 3-metilpentanal presente en muestras frescas, disminuye drásticamente tras la liofilización hasta el punto de no ser detectado. Se observa también una disminución significativa en la concentración de los aldehídos aromáticos benzaldehído y benceneacetaldehído, y de los aldehídos alifáticos butanal, pentanal, 2-metilpentanal, hexanal, 2-metil-2-hexenal, heptanal, octanal y nonanal. También se observa la desaparición en todas las setas analizadas del aldehído 2-octenal tras la liofilización

TABLA 5. Perfil de aldehídos detectados, expresado como concentración relativa (%) ± desviación estándar.

	2-Metilpropanal	Butanal	3-Metilbutanal	2-Metilbutanal	Pentanal	3-Metilpentanal	2-Metilpentanal
Muestras frescas¹							
<i>B.edulis</i>	3,18±1,28ef ⁴	1,71±0,58bcde	9,15±3,26e	2,29±1,03gh	0,89±0,30cde	13,20±2,95a	1,81±0,38d
<i>L.deliciosus</i>	2,15±0,77efg	1,90±0,97bcd	13,51±2,52d	2,32±0,98gh	1,03±0,54cd	15,64±4,20a	1,06±0,21ef
<i>C.gambosa</i>	5,89±0,35d	1,27±0,20cde	22,02±1,34c	7,79±1,02f	0,71±0,11cde	2,51±0,43bc	0,66±0,19fg
<i>H.marzuolus</i>	3,57±1,10e	2,79±0,80bc	7,37±0,22e	2,58±0,47g	0,56±0,24cde	12,16±2,84a	0,80±0,33efg
<i>C.cibarius</i>	1,42±0,11g	5,86±1,72a	2,31±0,71f	0,85±0,22h	4,40±0,73a	3,91±0,58bc	3,11±0,26b
<i>P.ostreatus</i>	1,62±0,09fg	0,38±0,04de	6,33±0,84e	1,79±0,16gh	1,26±0,25c	5,28±1,33b	0,74±0,16fg
Muestras liofilizadas²							
<i>B.edulis</i>	12,90±0,44c	nd	22,12±0,22c	15,02±0,36d	0,10±0,01e	0,26±0,01c	0,36±0,00g
<i>L.deliciosus</i>	18,26±0,06a	0,72±0,09de	50,46±0,29a	15,73±0,66cd	1,28±0,10c	nd	0,62±0,05fg
<i>C.gambosa</i>	19,36±0,47a	1,66±0,41bcde	32,35±0,76b	24,68±0,64a	0,29±0,02de	nd	1,24±0,04e
<i>H.marzuolus</i>	19,73±0,51a	1,23±0,10cde	34,42±0,38b	20,01±0,25b	2,37±0,23b	nd	2,65±0,10c
<i>C.cibarius</i>	15,18±0,63b	3,40±0,19b	19,03±0,50c	10,00±0,01e	2,32±0,19b	nd	3,96±0,07a
<i>P.ostreatus</i>	15,35±0,36b	0,44±0,04de	31,26±0,14b	17,00±0,73c	0,20±0,01de	nd	0,41±0,01g
TR³	3,80	4,14	5,07	5,26	5,94	6,86	7,05

¹ Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras frescas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

² Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras liofilizadas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

³ TR.: Tiempo de retención (min) determinado en una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 µm, Perkin Elmer).

⁴ Misma letra en la misma columna: no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

TABLA 5. Continuación

	Hexanal	2-Metil-2-Hexenal	Heptanal	Benzaldehído	Octanal	Benzeneacetaldehído	2-octenal	Nonanal
Muestras frescas¹								
<i>B. edulis</i>	3,83±1,11cd ⁴	nd	0,75±0,26c	0,96±0,29a	0,34±0,08cde	0,38±0,06bc	nd	1,08±0,13a
<i>L. deliciosus</i>	11,50±2,43b	nd	0,65±0,33c	0,42±0,20bc	0,64±0,16bc	0,77±0,26a	nd	0,85±0,42ab
<i>C. gambosa</i>	2,60±0,27de	6,16±1,27a	5,80±0,62a	nd	nd	nd	nd	nd
<i>H. marzuolus</i>	3,84±1,33cd	1,91±0,40b	0,79±0,22c	0,68±0,18ab	nd	0,87±0,41a	1,15±0,18a	1,28±0,33a
<i>C. cibarius</i>	24,39±0,81a	nd	1,43±0,50b	0,44±0,12bc	0,86±0,37b	nd	0,48±0,13b	0,93±0,29ab
<i>P. ostreatus</i>	6,49±1,45c	nd	0,38±0,06c	0,35±0,06bcd	1,75±0,12a	nd	nd	0,52±0,09bc
Muestras liofilizadas²								
<i>B. edulis</i>	0,33±0,02e	0,19±0,03c	0,39±0,00c	0,12±0,04cd	nd	nd	nd	nd
<i>L. deliciosus</i>	4,30±0,08cd	0,15±0,05c	0,24±0,03c	0,28±0,02cd	0,13±0,02de	0,17±0,04bc	nd	0,30±0,05cd
<i>C. gambosa</i>	0,48±0,02e	0,94±0,02c	0,15±0,04c	0,28±0,05cd	nd	0,25±0,04bc	nd	nd
<i>H. marzuolus</i>	5,46±0,28c	nd	0,32±0,03c	0,69±0,03ab	0,23±0,07de	0,50±0,12ab	nd	0,29±0,02cd
<i>C. cibarius</i>	4,56±0,24cd	nd	0,62±0,05c	0,33±0,11cd	0,41±0,02cd	nd	nd	0,18±0,01cd
<i>P. ostreatus</i>	0,72±0,07e	0,23±0,07c	0,12±0,03c	0,15±0,08cd	0,30±0,06de	0,14±0,04bc	nd	nd
TR³	8,21	9,91	10,49	11,77	12,51	13,37	13,57	14,36

¹ Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras frescas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

² Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras liofilizadas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

³ TR.: Tiempo de retención (min) determinado en una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 µm, Perkin Elmer).

⁴ Misma letra en la misma columna: no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

CAPÍTULO II: PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN HONGOS

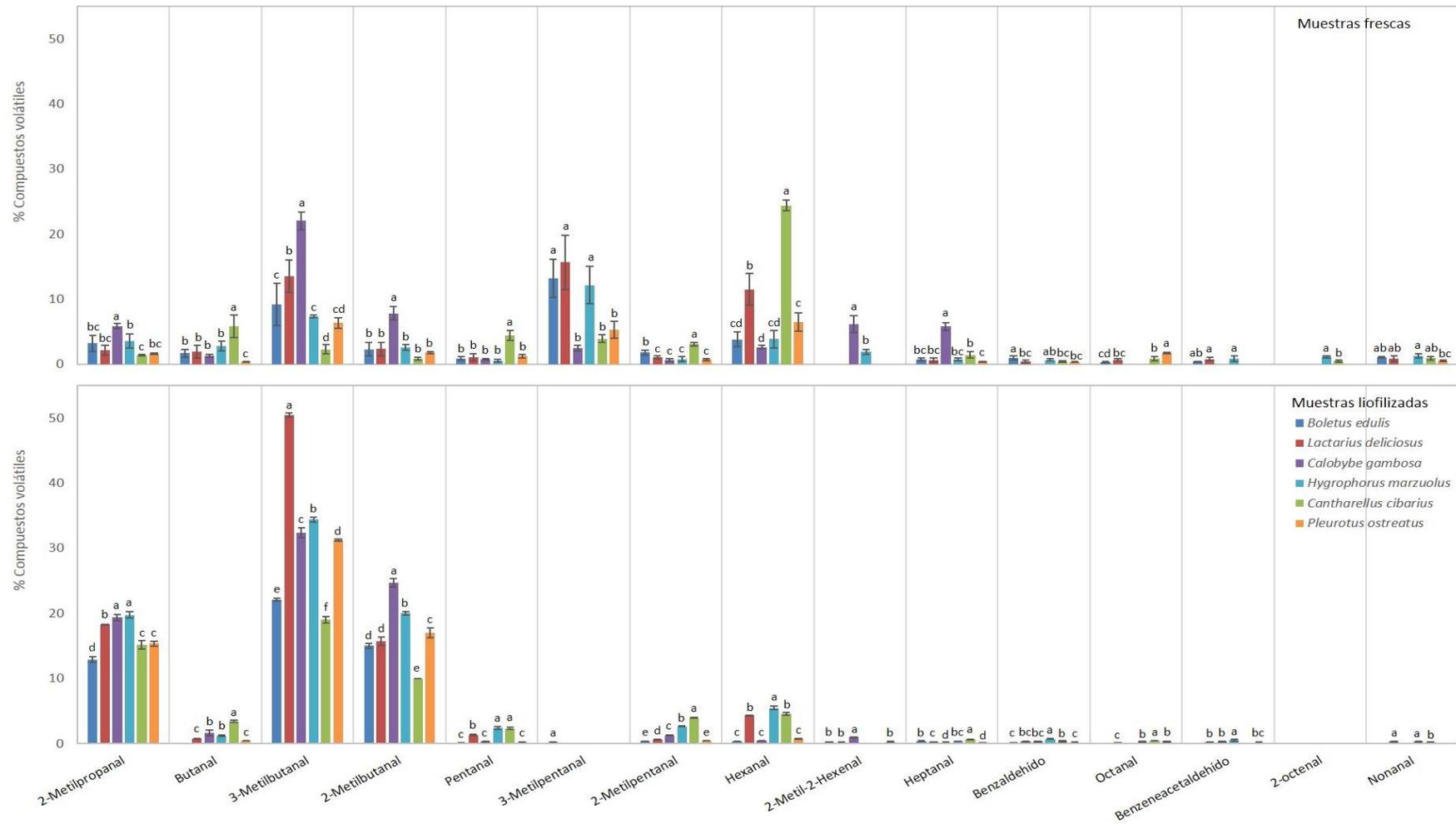


FIGURA 3. Comparación del contenido en aldehídos (%) en muestras frescas y liofilizadas de seis especies de setas comestibles. Los valores medios con diferente letra en cada tratamiento, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

2.4. COMPUESTOS DE AZUFRE Y HETEROCÍCLICOS

Como se muestra en la TABLA 6, el único **compuesto de azufre** identificado, dimetil disulfuro, fue detectado en la especie *C. cibarius* a una concentración del 3,81% en *muestras frescas*. En *muestras liofilizadas* fue detectado en *B. edulis* a una concentración inferior al 1%, y como trazas en *C. cibarius* e *H. marzuolus* (FIGURA 4). Los compuestos de azufre desaparecen tras el tratamiento de liofilización probablemente debido a su gran inestabilidad y volatilidad.

La familia de **compuestos heterocíclicos** constituye tan sólo un pequeño porcentaje del total, con valores desde el 3,38 en *L. deliciosus* al 10,16% en *B. edulis* en *muestras frescas* (TABLA 2). En total se detectaron 7 compuestos heterocíclicos (TABLA 6): metilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, etilpirazina, 2-pentilfurano, 2-etil-5-metil pirazina, 2-etil-3-metil pirazina y 3-etil-2,5-dimetil pirazina. El único compuesto heterocíclico identificado en *muestras frescas* (TABLA 6) fue 2-pentil-furano, más abundante en las especies *B. edulis*, *C. gambosa* y *C. cibarius*. En las *muestras liofilizadas* (TABLA 6) se detectaron 6 nuevos compuestos, incluyendo las pirazinas metilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, etilpirazina, 2-etil-5-metilpirazina, 2-etil-3-metilpirazina y 3-etil-2,5-dimetilpirazina, típicos productos derivados de la reacción de Maillard, y unos de los responsables del típico olor a seta desecada junto con algunos de los aldehídos detectados [138, 217, 218] (TABLA 6). En particular *C. gambosa* presenta la mayor concentración de compuestos heterocíclicos tras la liofilización, siendo 2-etil-3-metilpirazina (3,46%), 3-etil-2,5-dimetilpirazina (1,96%), 2-etil-5-metilpirazina (1,58%) y metilpirazina (1,47%) los compuestos más abundantes. En general tras la liofilización el porcentaje de compuestos heterocíclicos disminuye significativamente, excepto en *L. deliciosus* y *C. gambosa*, en las que no se observaron variaciones importantes (FIGURA 4). A pesar del descenso en la concentración, se ve un aumento en el número de compuestos heterocíclicos detectados, pasando de 1 en *muestras frescas* a 5 compuestos identificados en *muestras liofilizadas*.

TABLA 6. Perfil de compuestos de azufre y compuestos heterocíclicos detectados, expresado como concentración relativa (%) ± desviación estándar.

<i>C. Azufre</i>		<i>C. heterocíclicos</i>						
Dimetil disulfuro	Metilpirazina	2,5-dimetilpirazina	Etilpirazina	2-Pentil-furano	2-Etil-5-metil pirazina	2-Etil-3-metil pirazina	3-Etil-2,5-dimetil pirazina	
Muestras frescas¹								
<i>B. edulis</i>	nd	nd	nd	10,16±1,12 ^{a4}	nd	nd	nd	
<i>L. deliciosus</i>	nd	nd	nd	3,38±1,16bc	nd	nd	nd	
<i>C. gambosa</i>	nd	nd	nd	9,79±1,73a	nd	nd	nd	
<i>H. marzuolus</i>	nd	nd	nd	4,55±0,22b	nd	nd	nd	
<i>C. cibarius</i>	3,81±1,29a	nd	nd	8,63±0,60a	nd	nd	nd	
<i>P. ostreatus</i>	nd	nd	nd	4,46±1,14b	nd	nd	nd	
Muestras liofilizadas²								
<i>B. edulis</i>	0,86±0,16b	0,19±0,02b	0,63±0,09b	nd	0,43±0,08d	0,67±0,12b	nd	0,59±0,04b
<i>L. deliciosus</i>	nd	nd	nd	nd	2,27±0,05cd	0,27±0,05d	nd	nd
<i>C. gambosa</i>	nd	1,47±0,13a	1,25±0,04a	0,50±0,01a	0,64±0,04d	1,58±0,11a	3,46±0,12a	1,96±0,04a
<i>H. marzuolus</i>	trb	0,20±0,02b	0,40±0,02c	nd	1,97±0,16cd	0,51±0,07bc	nd	0,25±0,03d
<i>C. cibarius</i>	trb ^e	nd	tre ⁵	0,28±0,06b	3,01±0,18bc	0,36±0,04cd	nd	nd
<i>P. ostreatus</i>	nd	nd	0,30±0,05d	nd	0,26±0,02d	0,54±0,20bc	nd	0,44±0,12c
Tr³	6,90	9,00	10,86	10,94	12,21	12,59	12,61	13,97

¹ Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras frescas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

² Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras liofilizadas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

³ TR.: Tiempo de retención (min) determinado en una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 µm, Perkin Elmer).

⁴ Misma letra en la misma columna: no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

⁵ tr: trazas, concentración relativa del compuesto <0,10%.

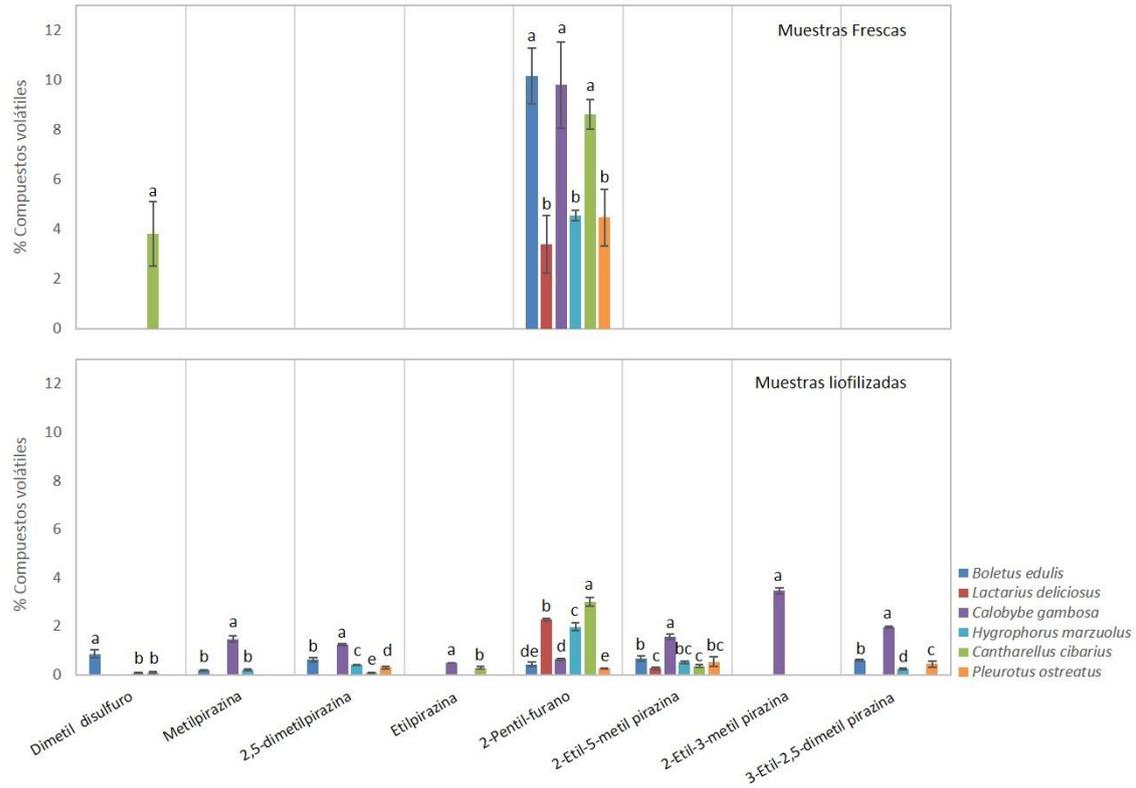


FIGURA 4. Comparación del contenido en compuestos de azufre y heterocíclicos (%) en muestras frescas y liofilizadas de seis especies de setas comestibles. Los valores medios con diferente letra en cada tratamiento, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

2.5. HIDROCARBUROS

La proporción de **hidrocarburos** es baja tanto en muestras frescas como liofilizadas, siendo en todos los casos menores del 3% (TABLA 2). Dentro de esta familia se identificaron 5 compuestos (TABLA 7): 1,3-octadieno, 3-etil-2-metil 1,3-hexadieno, undecano, tridecano y hexadecano.

En el análisis de las *muestras frescas* (TABLA 7), se detectaron únicamente tres hidrocarburos: 1,3-octadieno, uno de los más abundantes y presente en las especies *B. edulis* (0,19%), *L. deliciosus* (1,16%) y *C. cibarius* (0,49%); 3-etil-2-metil 1,3-hexadieno presente únicamente en *B. edulis* (0,15%) y *C. cibarius* (0,37%); y finalmente el hidrocarburo undecano, detectado solamente en las especies *L. deliciosus* (1,75%) y *C. cibarius* (0,42%) (TABLA 7).

En las *muestras liofilizadas* (TABLA 7), se detectaron dos nuevos compuestos: tridecano y hexadecano, presentes en todas las especies analizadas excepto en *P. ostreatus* (TABLA 7). Tras la liofilización la proporción de los hidrocarburos 1,3-octadieno y 3-etil-2-metil 1,3-

CAPÍTULO II: PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN HONGOS

hexadieno disminuye significativamente. La concentración del compuesto undecano disminuye significativamente en las especies *L. deliciosus* y *C. cibarius*, a la par que aumenta su concentración en las especies *C. gambosa* e *H. marzuolus*.

En general tras la liofilización se observa una disminución en la concentración de los compuestos 1,3-octadieno, 3-etil-2-metil 1,3-hexadieno y undecano, además de la aparición de nuevos hidrocarburos como tridecano y hexadecano (FIGURA 5).

TABLA 7. Perfil de hidrocarburos detectados, expresado como concentración relativa (%) ± desviación estándar.

	1,3-Octadieno	3-Etil-2-metil 1,3-Hexadieno	Undecano	Tridecano	Hexadecano
Muestras frescas¹					
<i>B.edulis</i>	0,19±0,08bc ⁴	0,15±0,01c	nd	nd	nd
<i>L. deliciosus</i>	1,16±0,54a	nd	1,75±0,73a	nd	nd
<i>C. gambosa</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>H. marzuolus</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>C. cibarius</i>	0,49±0,10b	0,37±0,07a	0,42±0,15b	nd	nd
<i>P. ostreatus</i>	nd	nd	nd	nd	nd
Muestras liofilizadas²					
<i>B.edulis</i>	trbc ⁵	nd	nd	trc	trd
<i>L. deliciosus</i>	0,13±0,04bc	nd	0,28±0,02b	0,27±0,03a	0,22±0,04b
<i>C. gambosa</i>	nd	nd	0,18±0,04b	0,11±0,00a	0,17±0,01c
<i>H. marzuolus</i>	nd	nd	0,14±0,00b	0,14±0,02a	0,17±0,02c
<i>C. cibarius</i>	0,27±0,03bc	0,30±0,05b	0,19±0,01b	0,30±0,03a	0,35±0,03a
<i>P. ostreatus</i>	nd	nd	nd	nd	nd
TR³	8,71	13,04	14,24	16,06	17,96

¹ Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras frescas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

² Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras liofilizadas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

³ TR.: Tiempo de retención (min) determinado en una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 µm, Perkin Elmer).

⁴ Misma letra en la misma columna: no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

⁵ tr: trazas, concentración relativa del compuesto <0,10%.

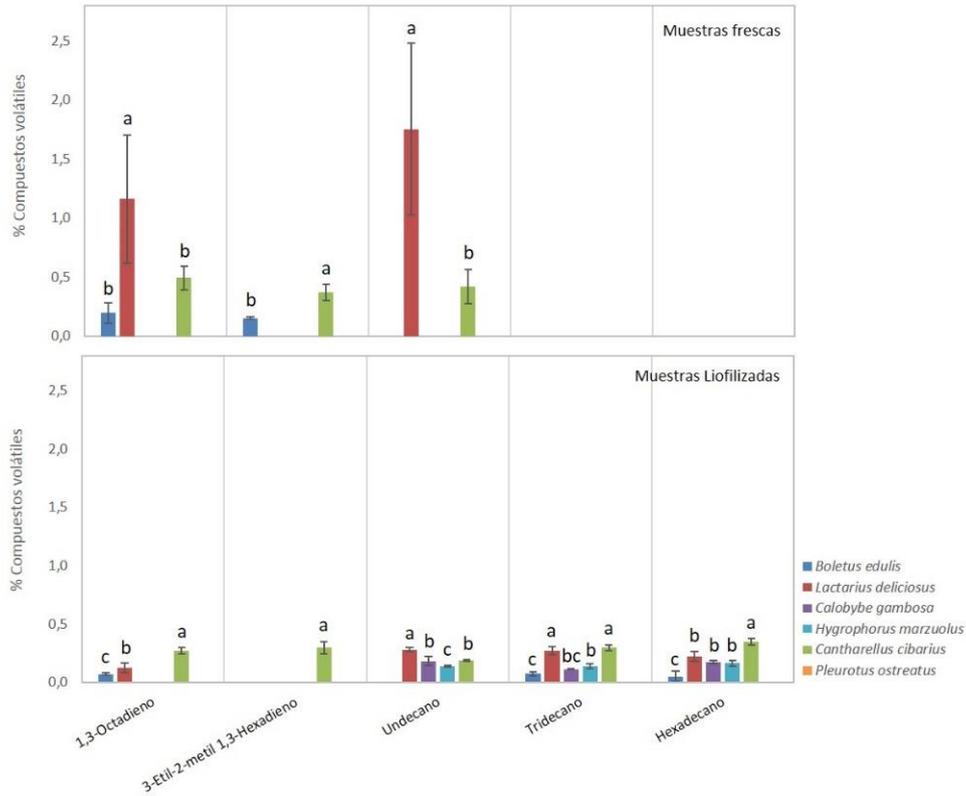


FIGURA 5. Comparación del contenido en hidrocarburos (%) en muestras frescas y liofilizadas de seis especies de setas comestibles. Los valores medios con diferente letra en cada tratamiento, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

2.6. ÁCIDOS, ÉSTERES Y TERPENOS

El contenido en compuestos **ácidos y ésteres** representan una proporción muy baja con respecto al resto de familias, por debajo del 0,40% en todos los casos (TABLA 2). Tanto en el análisis de las muestras frescas como de las liofilizadas (TABLA 8, FIGURA 6) únicamente fueron detectados dos compuestos a muy baja concentración: el ácido octanoico metil éster, presente en *C. cibarius*, y el ácido decanoico etil éster, presente en *L. deliciosus*.

Por último se detectaron pequeñas cantidades de **terpenos**, entre los que incluyen el sesquiterpeno óxido de cariofileno, identificado únicamente en *muestras frescas* de *L. deliciosus* (3,54%); y el monoterpeno linalool, presente en muestras liofilizadas de *C. cibarius* (0,19%) y *C. gambosa* (1,06%) (TABLA 8, FIGURA 6).

CAPÍTULO II: PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN HONGOS

TABLA 8. Perfil de ácidos, ésteres y terpenos detectados, expresado como concentración relativa (%) ± desviación estándar.

	Ácidos y ésteres		Terpenos	
	Ácido octanoico metil éster	Ácido decanoico etil éster	Óxido de Cariofileno	linalool
Muestras frescas¹				
<i>B.edulis</i>	nd	nd	nd	nd
<i>L. deliciosus</i>	nd	trb ⁴	3,54±1,47a ⁵	nd
<i>C. gambosa</i>	nd	nd	nd	nd
<i>H. marzuolus</i>	nd	nd	nd	nd
<i>C. cibarius</i>	0,39±0,05a	nd	nd	nd
<i>P. ostreatus</i>	nd	nd	nd	nd
Muestras liofilizadas²				
<i>B.edulis</i>	nd	nd	nd	nd
<i>L. deliciosus</i>	nd	0,14±0,06a	nd	nd
<i>C. gambosa</i>	nd	nd	nd	1,06±0,03a
<i>H. marzuolus</i>	nd	nd	nd	nd
<i>C. cibarius</i>	0,32±0,03b	nd	nd	0,19±0,04b
<i>P. ostreatus</i>	nd	nd	nd	nd
TR³	14,67	19,86	24,01	14,46

¹ Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras frescas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

² Concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles detectados en muestras liofilizadas, expresado en porcentajes ± desviación estándar.

³ TR.: Tiempo de retención (min) determinado en una columna capilar Elite 5MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 µm, Perkin Elmer).

⁴ tr: trazas, concentración relativa del compuesto <0,10%.

⁵ Misma letra en la misma columna: no existen diferencias significativas entre valores (p<0,05).

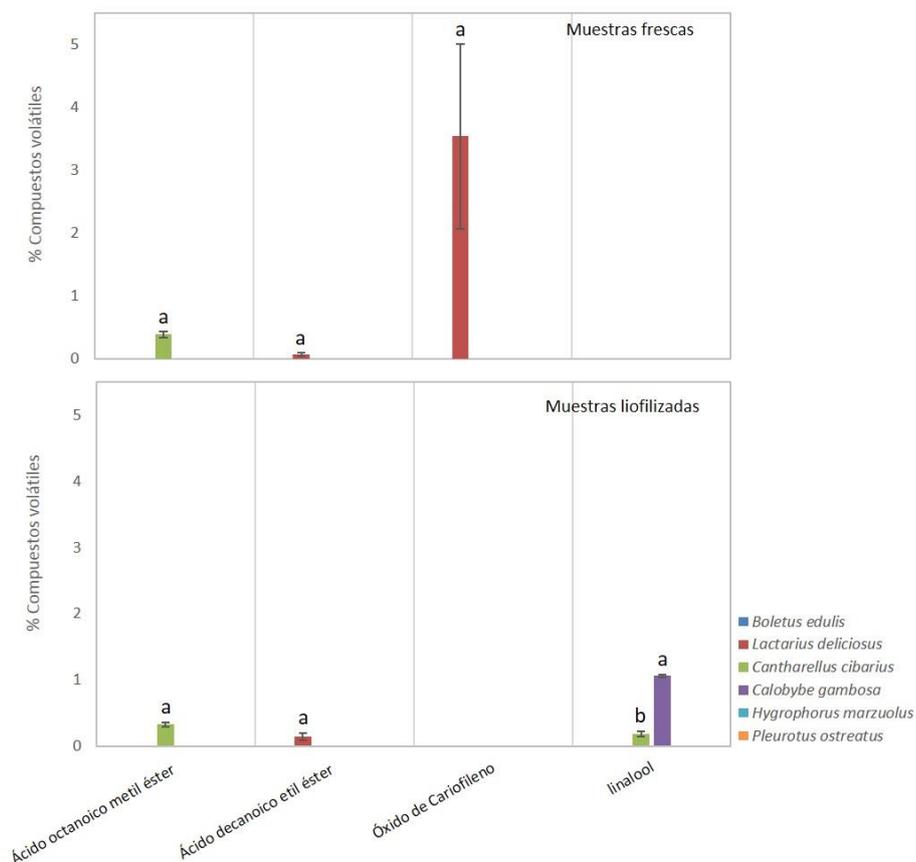


FIGURA 6. Comparación del contenido en ácidos, ésteres y terpenos (%) en muestras frescas y liofilizadas de seis especies de setas comestibles. Los valores medios con diferente letra en cada tratamiento, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

3. COMPUESTOS C8

Los **compuestos C8** 1-octen-3-ona, 3-octanona, octanal y 2-octenal, junto con los alcoholes 1-octen-3-ol y el 3-octanol, son considerados los mayores responsables del aroma característico a seta fresca [141, 144]. Sin embargo en las muestras liofilizadas analizadas la cantidad relativa de éstos compuestos C8 disminuye drásticamente en la mayoría de especies, exceptuando *B. edulis* en el que la concentración prácticamente no varía (43,61%) (FIGURA 7). Tal y como se indicó anteriormente, ésta disminución es debida principalmente a la pérdida del alcohol 1-octen-3-ol durante el proceso de liofilización [142, 219, 220].

Por otro lado, la concentración del alcohol 3-octanol en la especie *P. ostreatus* se mantiene sin cambios significativos (17,61%). En ésta especie, *P. ostreatus*, los compuestos volátiles mayoritarios fueron 1-octen-3-ol (41,29%), 3-octanol (14,11%) y 3-octanona (11,61%), coincidiendo con lo determinado por Kabbaj y cols. en 2002 (2002)[143]. Otros compuestos C8 presentes, como el octanal y 2-octenal, disminuyen su concentración o incluso dejan de ser

detectados tras la liofilización. La comparación del contenido en compuestos C8 y las diferencias estadísticas entre las especies analizadas se muestran en las FIGURAS 7 y 8.

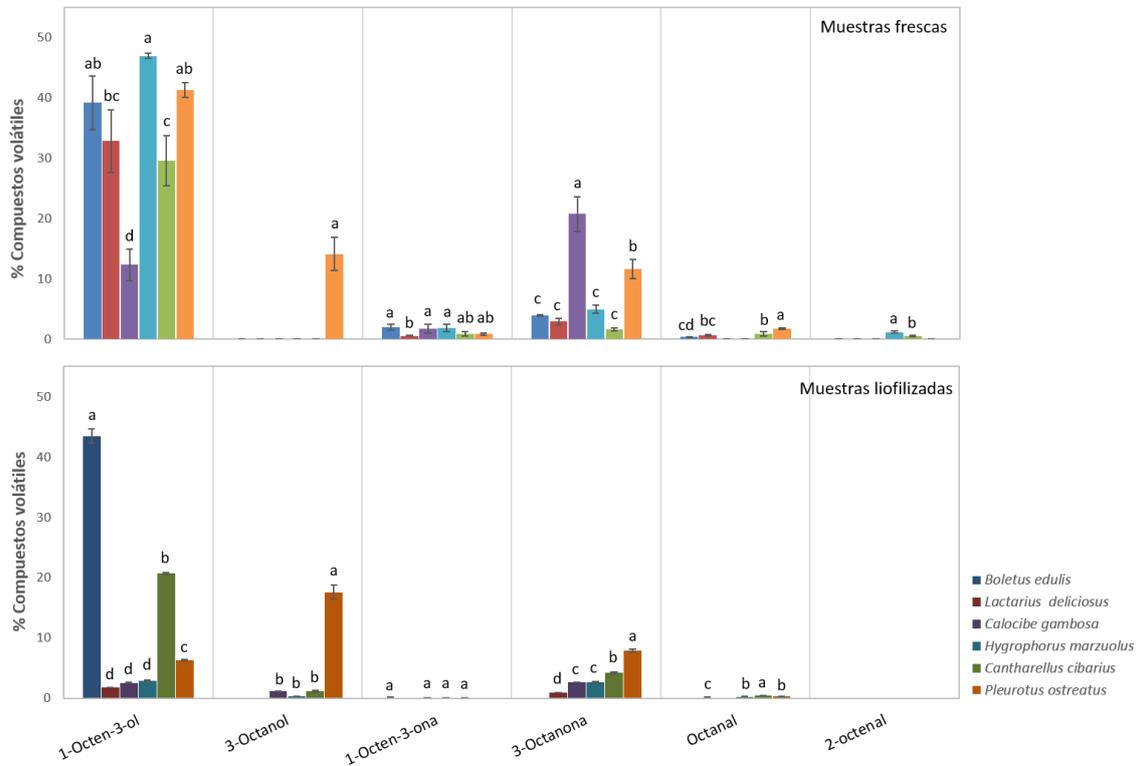


FIGURA 7. Comparación del contenido en compuestos C8 (%) en muestras frescas y liofilizadas de seis especies de setas comestibles analizadas. Los valores medios con diferente letra en cada tratamiento, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

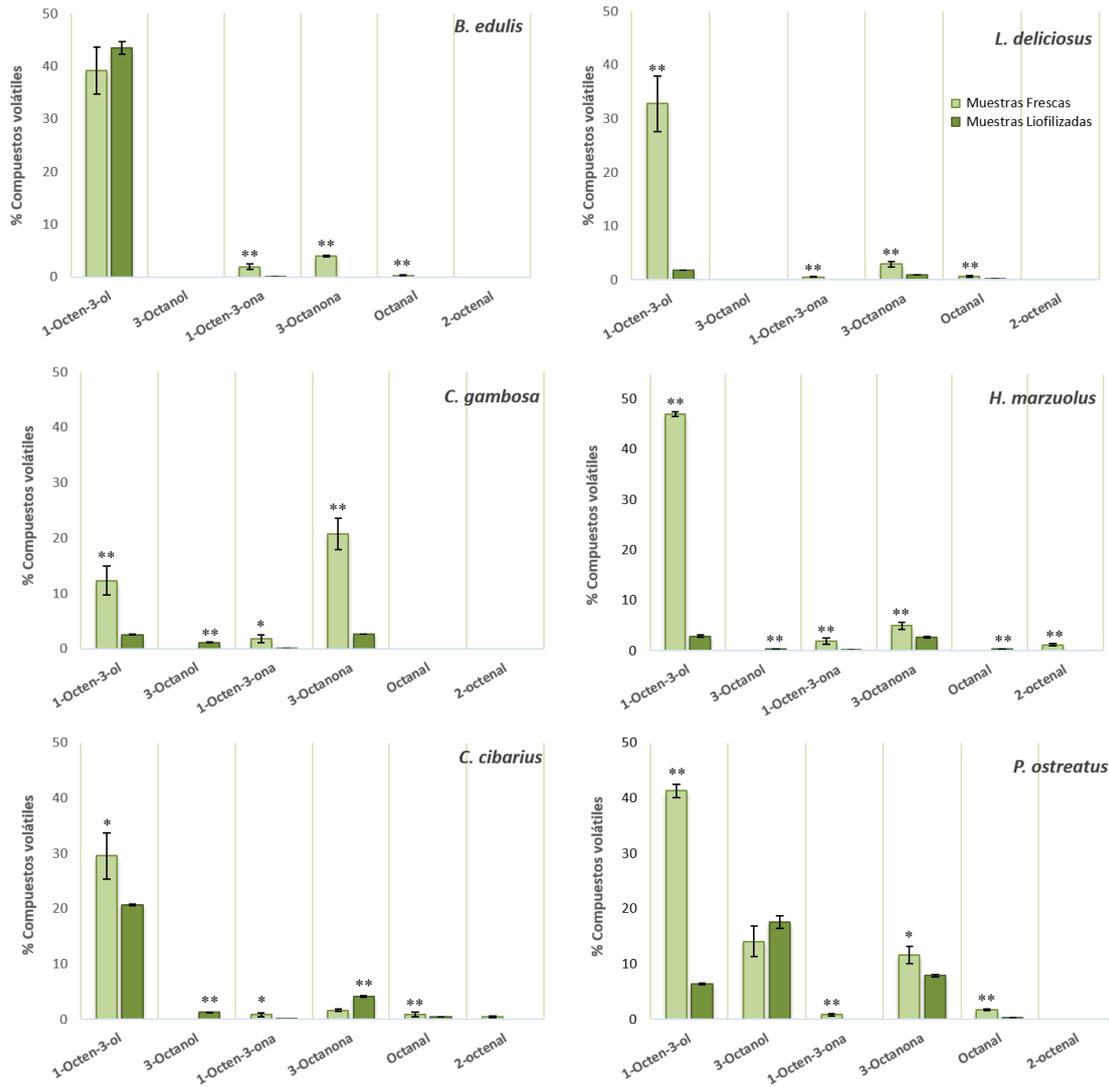


Figura 8. Comparación del contenido en compuestos C8 (%) en muestras frescas y liofilizadas para cada una de las especies analizadas. * La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

4. PRINCIPALES COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN HONGOS COMESTIBLES

Por tanto encontramos que el perfil de volátiles orgánicos en muestras frescas y liofilizadas está formado por diferentes clases de compuestos [221].

Los compuestos derivados de 8 carbonos, principalmente 1-octen-3-ol, 3-octanol y 3-octanona, junto con los aldehídos hexanal, 3-methylpentanal y el compuesto heterocíclico 2-pentil-furano, fueron los **compuestos volátiles principales** identificados en *muestras frescas*, derivados mayoritariamente de la oxidación de los ácidos grasos linoleico y linolénico mediante la acción de enzimas lipoxigenasas [49, 149] (FIGURAS 9 y 10).

Por otro lado el perfil de compuestos volátiles en las *muestras liofilizadas* está dominado por los aldehídos 2-metilpropanal, 3-metilbutanal y 2-metilbutanal, junto con un mayor número de pirazinas, como metilpirazina y 2,5-dimetilpirazina entre otros, productos típicos derivados de la reacción de Maillard [138, 217, 218] y, como se ha mencionado anteriormente, responsables del aroma característico a seta desecada [138, 212] (FIGURAS 9 y 11).

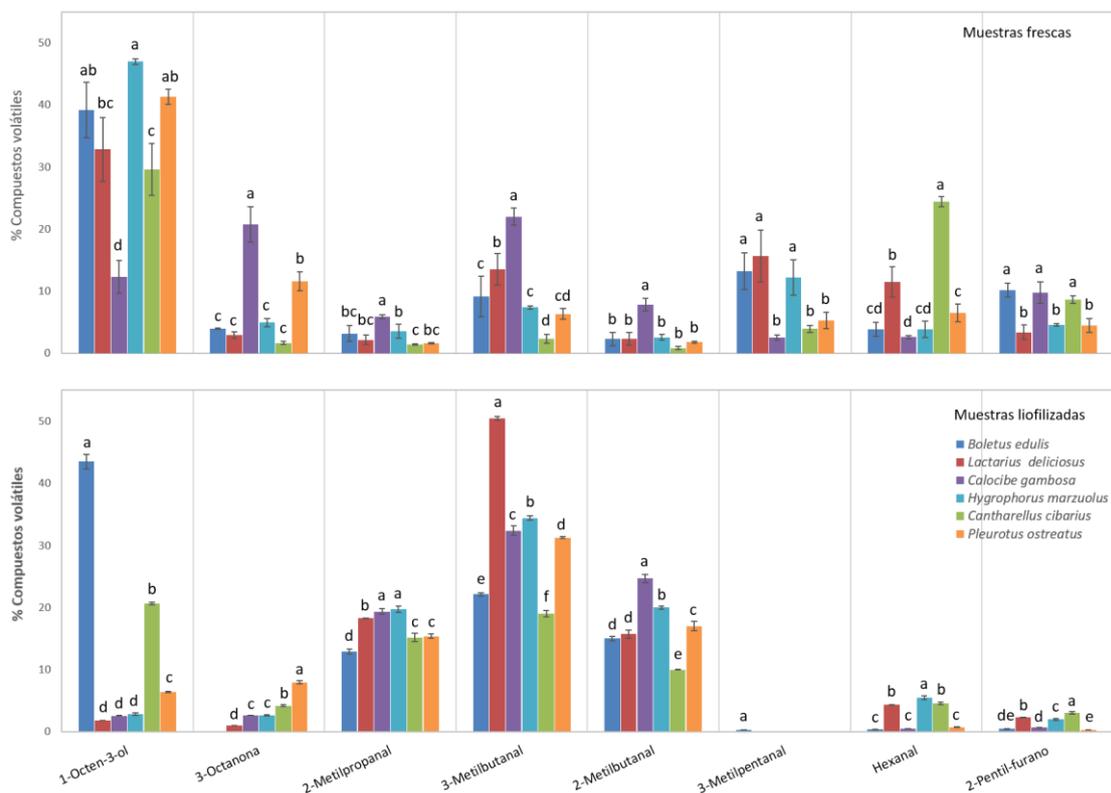


FIGURA 9. Comparación de la concentración relativa (%) de los compuestos volátiles mayoritarios en muestras frescas y liofilizadas de seis especies de setas comestibles. Los valores medios con diferente letra en cada tratamiento, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

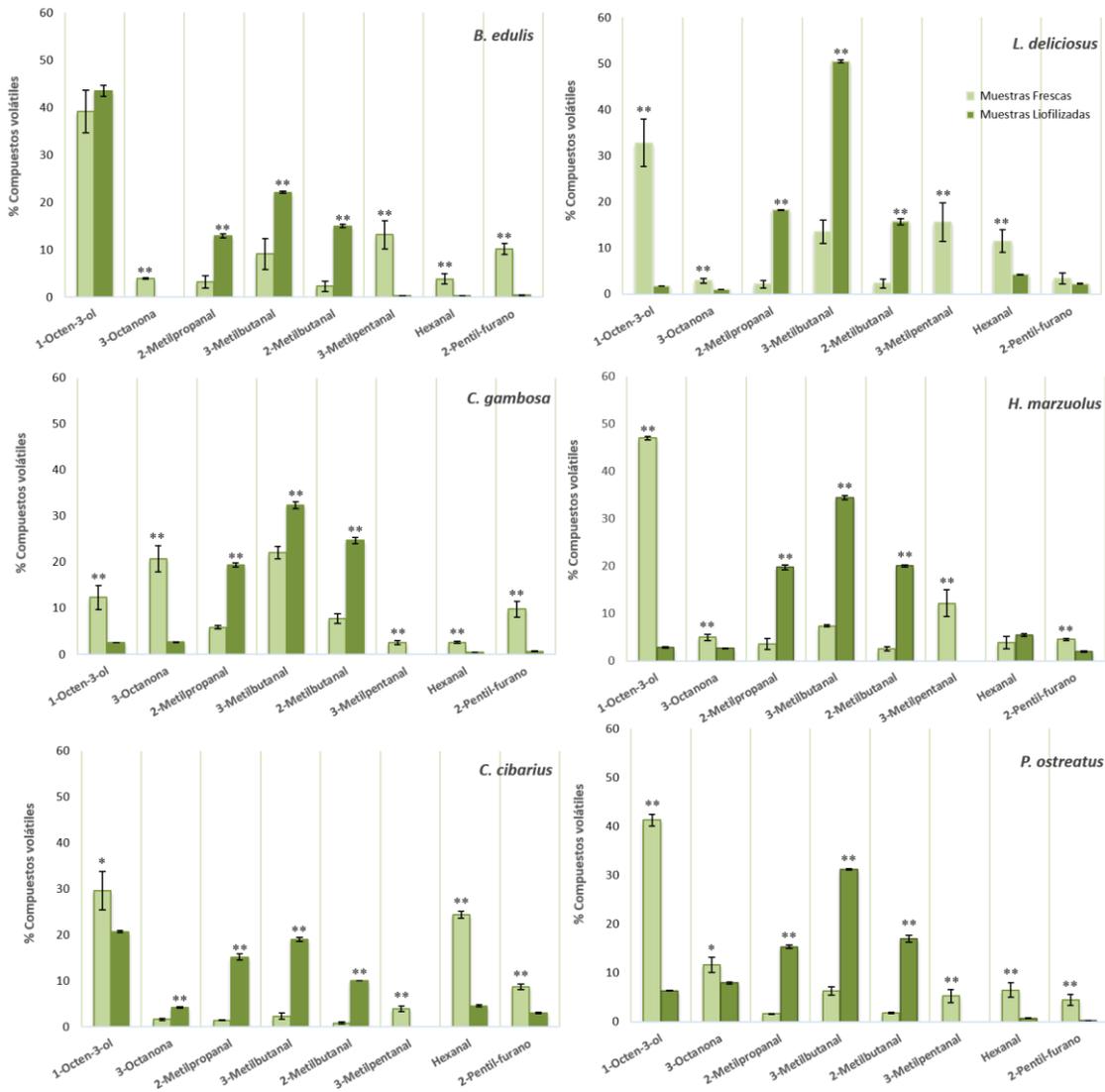
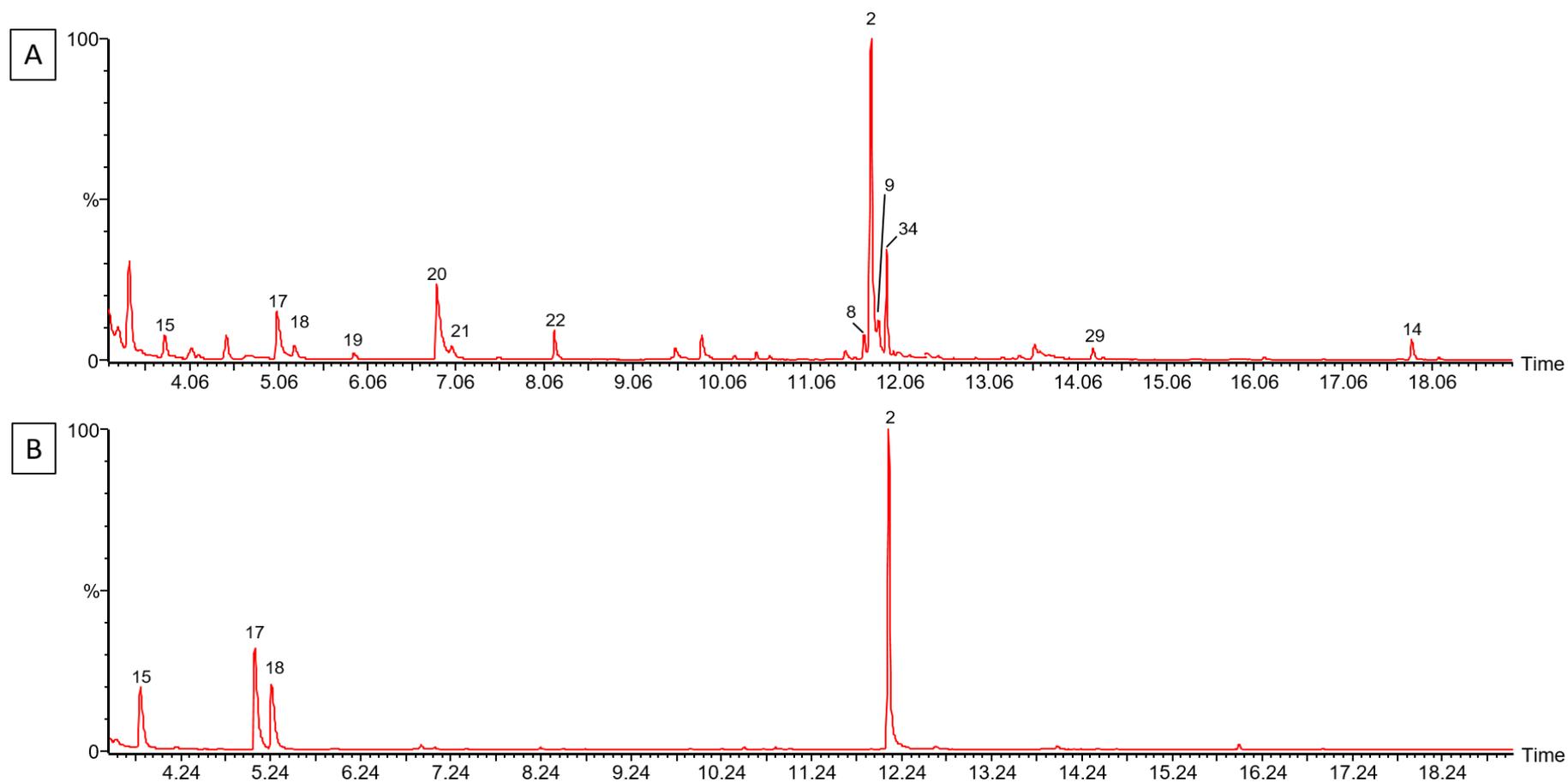


FIGURA 10. Comparación de la concentración relativa (%) de los compuestos volátiles mayoritarios en muestras frescas y liofilizadas de cada una de las setas comestibles analizadas. * La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

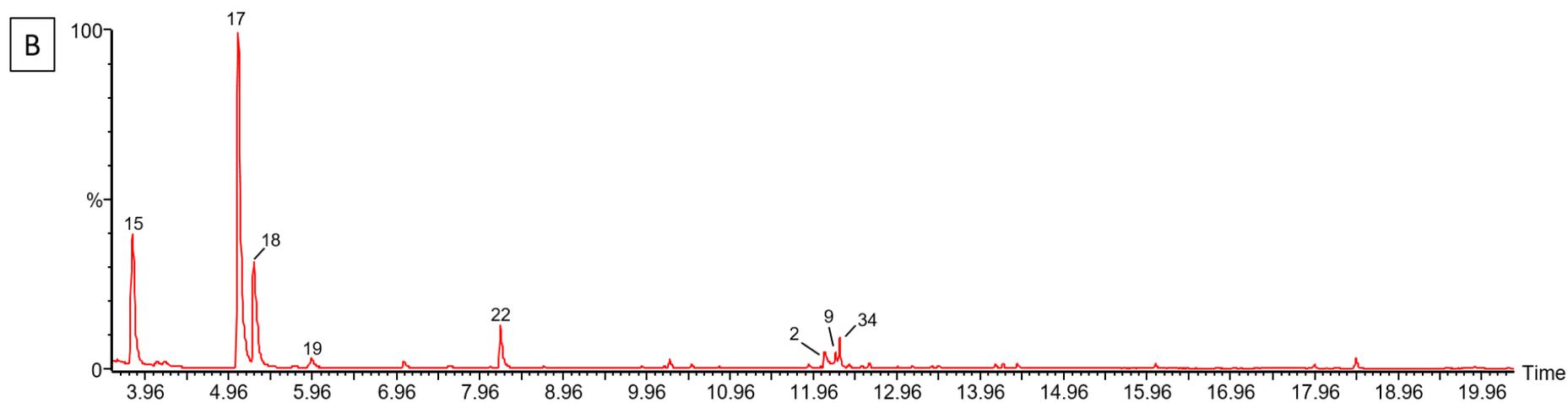
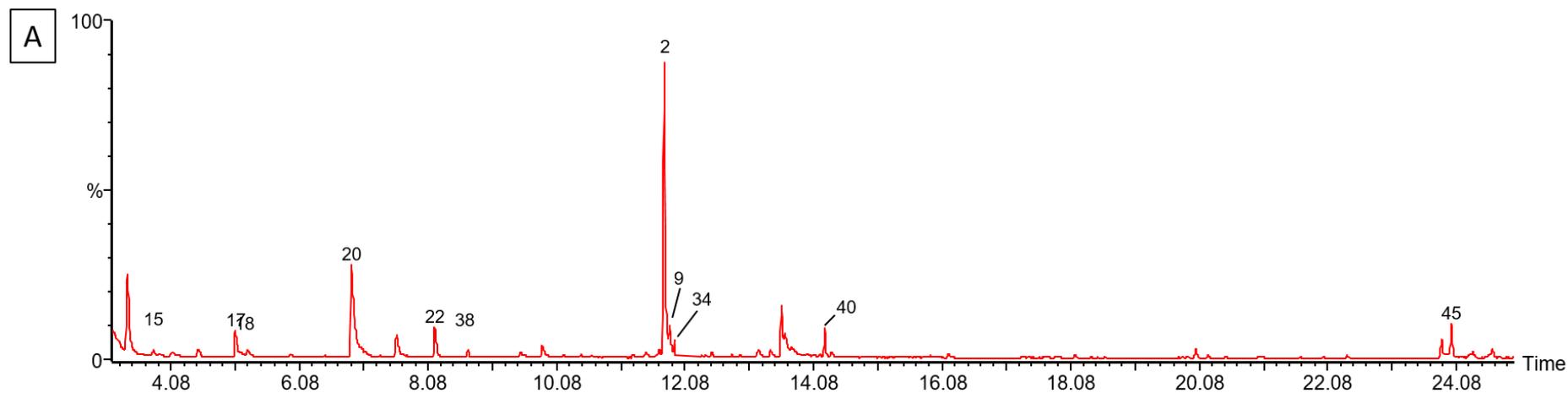
Se observó por tanto un cambio muy evidente en el perfil de los compuestos volátiles detectados en muestras frescas y liofilizadas, llamando sobretodo la atención la pérdida significativa de alcoholes tras la liofilización, principalmente 1-octen-3-ol, al igual que el significativo aumento en la concentración de aldehídos y en el número de pirazinas, tendencia que ya ha sido observada por otros autores en variedad de trabajos [142, 219, 220]. La gran variación existente en el perfil de volátiles entre las distintas setas estudiadas puede ser resultado de las diferencias entre especies, diferentes estadios de maduración de los cuerpos fructificantes o las condiciones después de la recolección [140, 145, 222].

Hoy por hoy no existen prácticamente trabajos acerca del perfil de COVs de las setas aquí analizadas, y menos sobre los cambios producidos en dicho perfil tras el proceso de liofilización. Sería por tanto de gran interés profundizar en la extracción e identificación de los volátiles presentes en algunas de las setas menos estudiadas, como son *L. deliciosus*, *C. gambosa*, *C. cibarius* e *H. marzuolus*.

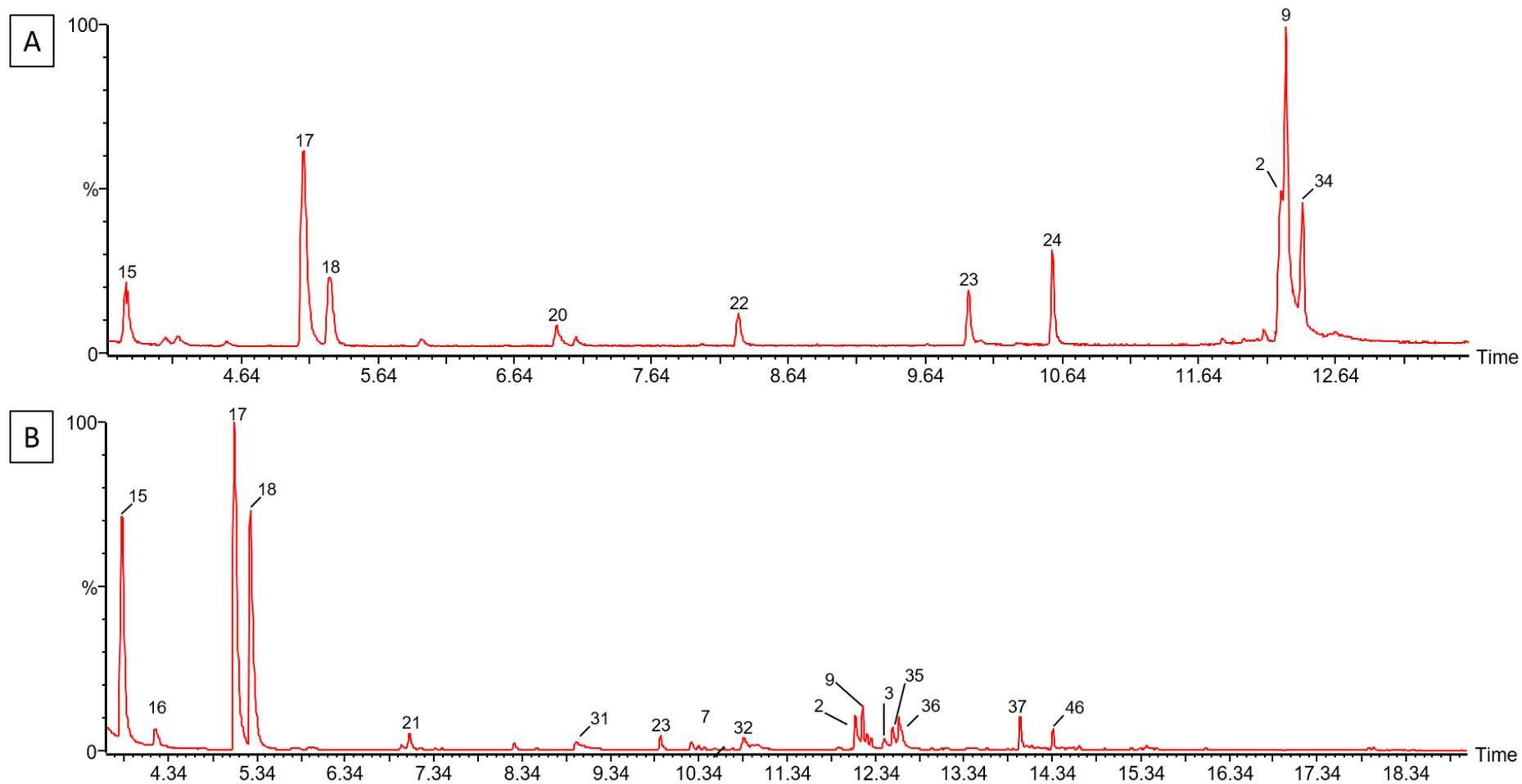
5. CROMATOGRAMAS



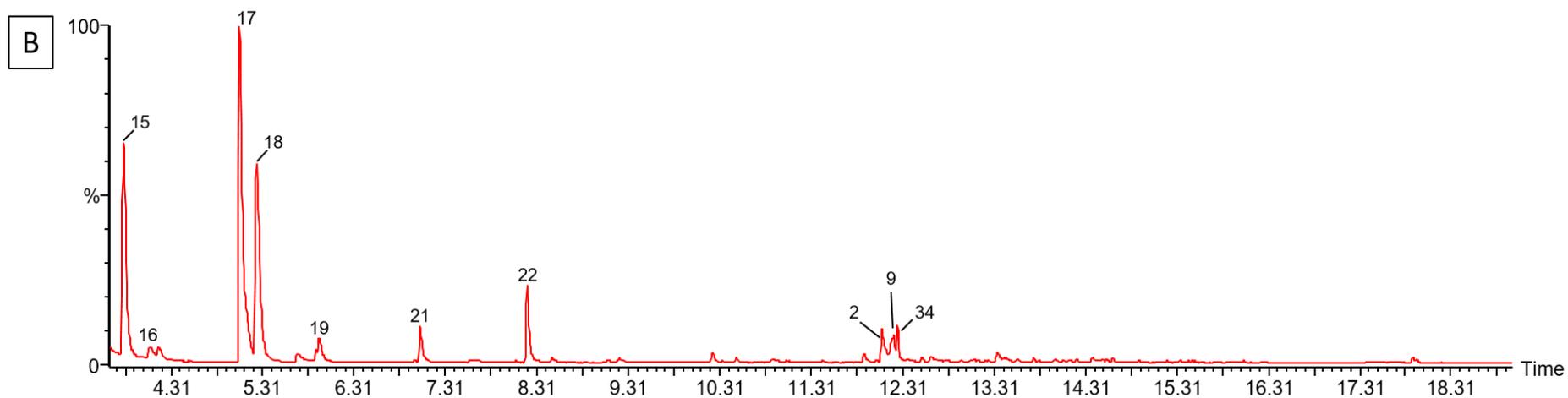
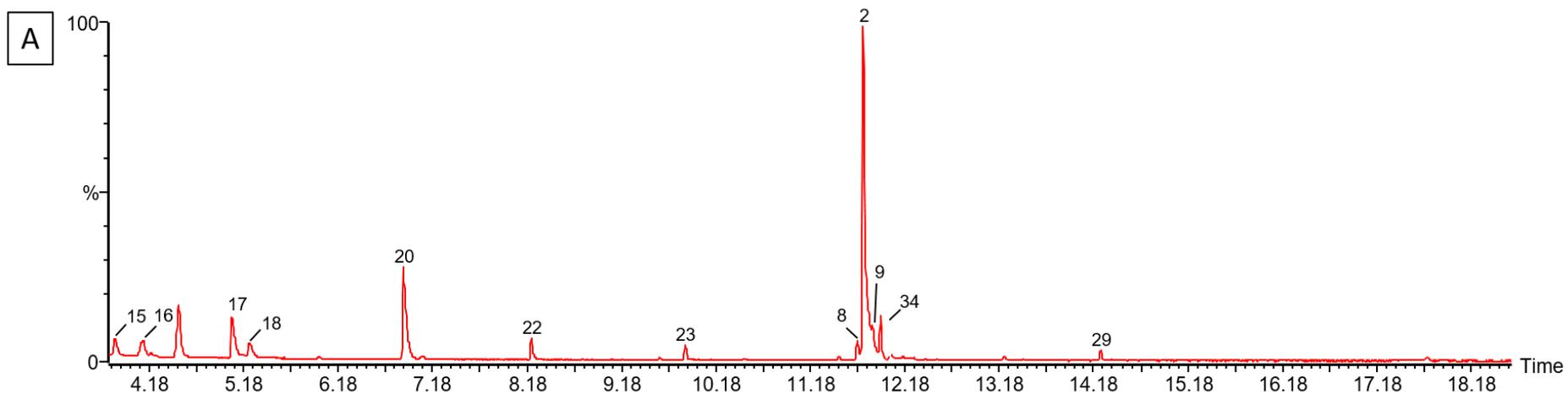
Cromatogramas correspondientes a las muestras frías (A) y liofilizadas (B) de la especie comestible *B. edulis*, obtenidos mediante las técnicas de espacio de cabeza y cromatografía de gases (HS-GC).



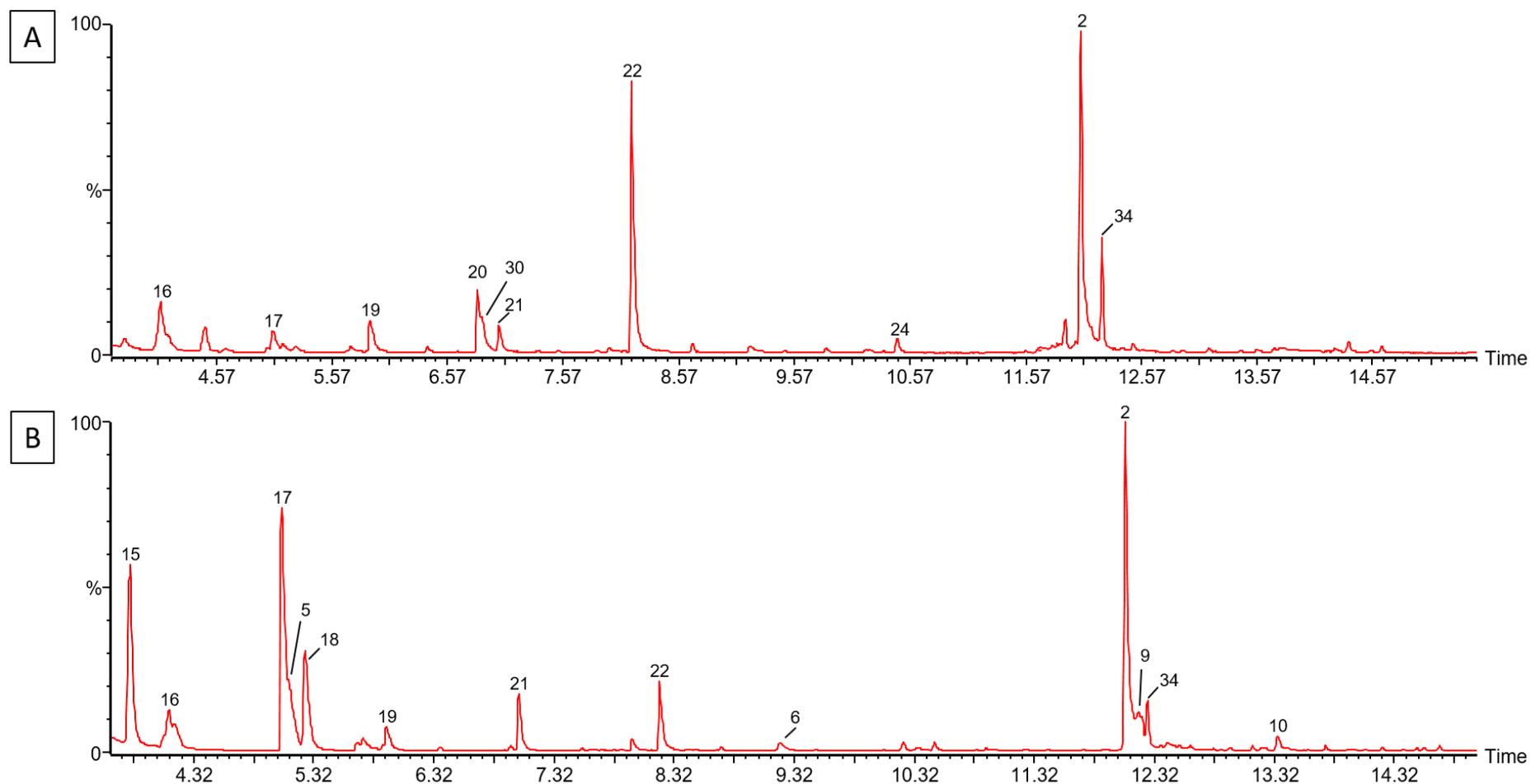
Cromatogramas correspondientes a las muestras frías (A) y liofilizadas (B) de la especie comestible *L. deliciosus*, obtenidos mediante las técnicas de espacio de cabeza y cromatografía de gases (HS-GC).



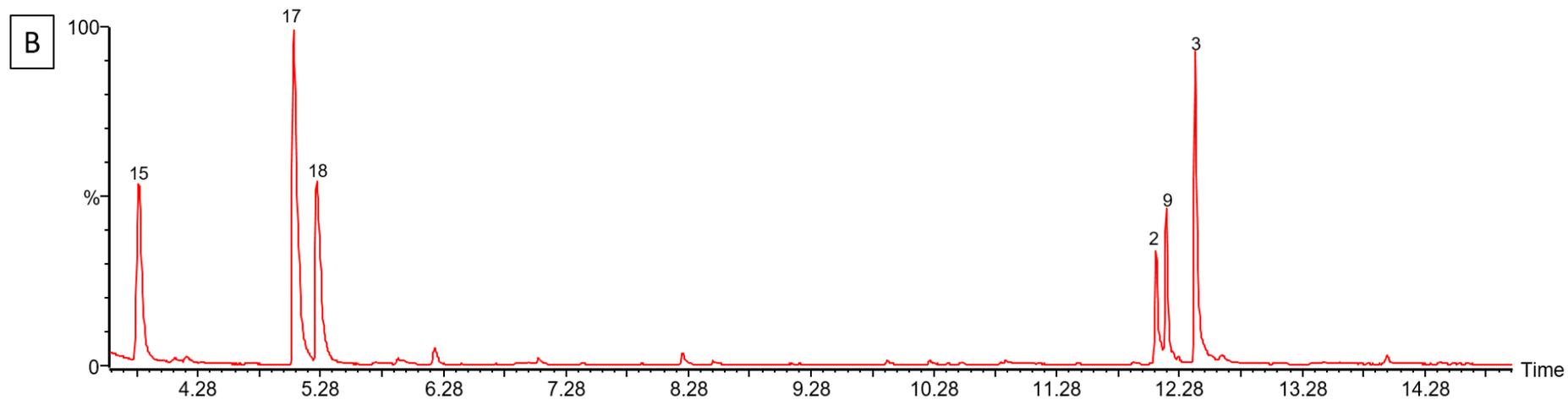
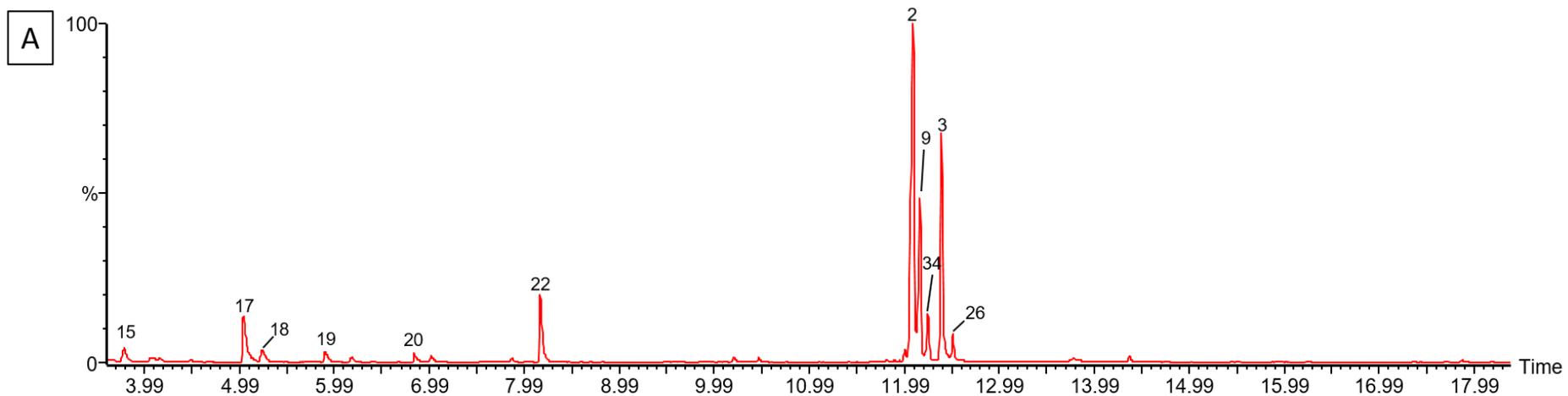
Cromatogramas correspondientes a las muestras frías (A) y liofilizadas (B) de la especie comestible *C. gambosa*, obtenidos mediante las técnicas de espacio de cabeza y cromatografía de gases (HS-GC).



Cromatogramas correspondientes a las muestras frías (A) y liofilizadas (B) de la especie comestible *H. marzuolus*, obtenidos mediante las técnicas de espacio de cabeza y cromatografía de gases (HS-GC).



Cromatogramas correspondientes a las muestras frías (A) y liofilizadas (B) de la especie comestible *C. cibarius*, obtenidos mediante las técnicas de espacio de cabeza y cromatografía de gases (HS-GC).



Cromatogramas correspondientes a las muestras frías (A) y liofilizadas (B) de la especie comestible *P. ostreatus*, obtenidos mediante las técnicas de espacio de cabeza y cromatografía de gases (HS-GC)

CONCLUSIONES

1. Este análisis permitió la identificación tentativa de un total de 46 compuestos, incluyendo 4 alcoholes, 10 cetonas, 15 aldehídos, 1 compuesto de azufre, 7 compuestos heterocíclicos, 5 hidrocarburos, 2 ácidos y ésteres y 2 terpenos.
2. Los compuestos de ocho carbonos o compuestos C8, responsables del típico olor a seta, son los más abundantes en todas las muestras frescas analizadas. El compuesto principal y presente en mayor proporción es el alcohol 1-octen-3-ol, siendo la especie *Pleurotus ostreatus* la que presenta un mayor porcentaje (55,40%).
3. El perfil de compuestos volátiles en muestras liofilizadas está dominado por compuestos aldehídos, principalmente 2-metilpropanal, 3-metilbutanal y 2-metilbutanal, productos típicos derivados de la reacción de Maillard y responsables junto con las pirazinas del característico olor a seta desecada.
4. Tras el proceso de liofilización se observaron cambios significativos en el perfil de compuestos orgánicos volátiles:
 - a. Se observó un aumento en el número total de COVs identificados.
 - b. La pérdida de compuestos C8 es significativa, en particular del alcohol 1-octen-3-ol.
 - c. Se observó un aumento significativo de compuestos aldehídos y pirazinas de nueva síntesis, productos típicos derivados de la reacción de Maillard.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Chang, S.-T. and P.G. Miles, *Overview*, in *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*, B. Ratón, Editor. 2004, FL: CRC Press. p. 1-26.
2. Pegler, D.N., *Useful fungi of the world: The 'Poor man's truffles of Arabia' and 'Manna of the Israelites'*. *Mycologist*, 2002. **16**(1): p. 8-9.
3. Chang, S.T. and J.A. Buswell, *Mushroom nutraceuticals*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1996. **12**(5): p. 473-476.
4. Fernández-Toiran, L.M., et al., *Conceptos y fundamentos de micología forestal*, in *Manual para la gestión del recurso micológico forestal en Castilla y León*, S.-J.d.C.y. León, Editor. 2011, Junta de Castilla y León. p. 30-43.
5. Chang, S.T. and P.G. Miles, *Mushroom biology--a new discipline*. *The Mycologist*, 1992. **6**: p. 64-65.
6. Hawksworth, D.L., *The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited*. *Mycological Research*, 2001. **105**: p. 1422-1432.
7. Wasser, S.P., *Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002. **60**(3): p. 258-274.
8. Frank, B., *Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze*. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 1885. **3**: p. 128-145.
9. Cannon, P. and P. Kirk, *Dictionary of the Fungi*. 10th ed, ed. S. JA. 2008, London, UK: CABI International.
10. Cannon, P. and P.M. Kirk, *Fungal families of the world*, ed. P. Cannon and P.M. Kirk. 2007: Cabi Publishing.
11. Kirk, P.M., et al., *Ainsworth & Brisby's dictionary of the fungi*. 10th edn ed, ed. P.M. Kirk, et al. 2008, Wallingford: CABI International.
12. Hibbett, D.S., et al., *A higher-level phylogenetic classification of the Fungi*. *Mycological Research*, 2007. **111**(5): p. 509-547.
13. Ágreda, T., L.M. Fernández-Toirán, and F. Martínez-Peña, *Descripción de especies e ilustraciones fotográficas*, in *Manual para la gestión del recurso micológico forestal en Castilla y León*, S.-J.d.C.y. León, Editor. 2011, Junta de Castilla y León. p. 358-423.
14. Chang, S.-T. and P.G. Miles, *MUSHROOMS: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. 2nd ed, ed. B. Ratón. 2004: FL: CRC Press. 1-26.
15. MAGRAMA, *Base de datos de consumo en hogares , periodo diciembre 2013*.
16. Martínez de Azagra Paredes, A., J.A. Oria de Rueda Salguero, and P. Martínez Zurimendi, *Estudio sobre la potencialidad de los diferentes usos del bosque para la creación de*

- empleo en el medio rural de Castilla y León* ed. A. Martínez de Azagra Paredes. 1998: Junta de Castilla-león y Fondo Social Europeo.
17. Oria de Rueda Salguero, J.A., *Bases para la selvicultura y ordenación de montes productores de hongos micorrizógenos comestibles*. Montes, 1991. **26**: p. 48-55.
 18. Roncero Ramos, I., *Propiedades nutricionales y saludables de los hongos*, ed. I. Roncero Ramos. 2015: Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de la Rioja (CTICH).
 19. Masic, U. and M.R. Yeomans, *Umami flavor enhances appetite but also increases satiety*. American Journal of Clinical Nutrition, 2014. **100**(2): p. 532-538.
 20. Nakamura, E., K. Tori, and H. Uneyama, *Physiological roles of dietary free glutamate in gastrointestinal functions*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2008. **31**(10): p. 1841-1843.
 21. Barros, L., et al., *Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**(8): p. 2742-2747.
 22. Kalac, P., *Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review*. Food Chemistry, 2009. **113**(1): p. 9-16.
 23. Boa, E., *Wild edible fungi, a global overview of their use and importance to people*. Non-Wood Forest Products, ed. E. Boa. Vol. 17. 2005, Rome: FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
 24. Ramberg, J.E., E.D. Nelson, and R.A. Sinnott, *Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature*. Nutrition Journal, 2010. **9**.
 25. Lindequist, U., T.H.J. Niedermeyer, and W.D. Julich, *The pharmacological potential of mushrooms*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2005. **2**(3): p. 285-299.
 26. Rodriguez, R., et al., *Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients*. Trends in Food Science & Technology, 2006. **17**(1): p. 3-15.
 27. Heleno, S.A., et al., *Targeted metabolites analysis in wild Boletus species*. Lwt-Food Science and Technology, 2011. **44**(6): p. 1343-1348.
 28. Barros, L., et al., *Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of portuguese wild edible mushrooms*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(12): p. 4781-4788.
 29. Akata, I., B. Ergonul, and F. Kalyoncu, *Chemical Compositions and Antioxidant Activities of 16 Wild Edible Mushroom Species Grown in Anatolia*. International Journal of Pharmacology, 2012. **8**(2): p. 134-138.
 30. Vaz, J.A., et al., *Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions*. Food Chemistry, 2011. **126**(2): p. 610-616.

31. Chye, F.Y., J.Y. Wong, and J.S. Lee, *Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Selected Edible Wild Mushrooms*. Food Science and Technology International, 2008. **14**(4): p. 375-384.
32. Barros, L., et al., *Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: A comprehensive study*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(10): p. 3856-3862.
33. Beluhan, S. and A. Ranogajec, *Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms*. Food Chemistry, 2011. **124**(3): p. 1076-1082.
34. Manzi, P., A. Aguzzi, and L. Pizzoferrato, *Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy*. Food Chemistry, 2001. **73**(3): p. 321-325.
35. Khan, M.A. and M. Tania, *Nutritional and Medicinal Importance of Pleurotus Mushrooms: An Overview*. Food Reviews International, 2012. **28**(3): p. 313-329.
36. Manzi, P., et al., *Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study*. Food Chemistry, 1999. **65**(4): p. 477-482.
37. Diez, V.A. and A. Alvarez, *Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain*. Food Chemistry, 2001. **75**(4): p. 417-422.
38. Dabbour, I.R. and H.R. Takruri, *Protein quality of four types of edible mushrooms found in Jordan*. Plant Foods for Human Nutrition, 2002. **57**(1): p. 1-11.
39. Chitra, U., et al., *Variability in phytic acid content and protein digestibility of grain legumes* Plant Foods for Human Nutrition, 1995. **47**(2): p. 163-172.
40. McDonough, F.E., et al., *In vivo rat assay for true protein digestibility-Colaborative study* Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1990. **73**(5): p. 801-805.
41. Chang, S.-T. and P.G. Miles, *The Nutritional attributes of edible mushrooms*, in *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*, B. Ratón, Editor. 2004, FL: CRC Press. p. 27-37.
42. Guillamon, E., et al., *Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases*. Fitoterapia, 2010. **81**(7): p. 715-723.
43. Barros, L., et al., *Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal*. Food Chemistry, 2007. **105**(1): p. 140-145.
44. Pedneault, K., et al., *Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of Pleurotus ostreatus and P-cornucopiae var. 'citrino-pileatus' grown at different temperatures*. Mycological Research, 2007. **111**: p. 1228-1234.
45. Pedneault, K., et al., *Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae*. Mycological Research, 2006. **110**: p. 1179-1183.
46. Barros, L., et al., *Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal*. Food Chemistry, 2007. **105**: p. 140-145.

47. Barros, L., et al., *Effect of fruiting body maturity stage, on chemical composition and antimicrobial activity of Lactarius sp mushrooms*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(21): p. 8766-8771.
48. Ergonul, P.G., et al., *Fatty Acid Compositions of Six Wild Edible Mushroom Species*. Scientific World Journal, 2013.
49. Combet, E., et al., *Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: Properties, analysis, and biosynthesis*. Mycoscience, 2006. **47**(6): p. 317-326.
50. Mattila, P., et al., *Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(5): p. 2343-2348.
51. Mattila, P., et al., *Sterol and vitamin D-2 contents in some wild and cultivated mushrooms*. Food Chemistry, 2002. **76**(3): p. 293-298.
52. Phillips, K.M., et al., *Vitamin D-4 in Mushrooms*. Plos One, 2012. **7**(8).
53. Cheung, P.C.K., *Mushrooms as Functional Foods*, ed. P.C.K. Cheung. 2008: John Wiley & sons, INC.
54. Cocchi, L., et al., *Heavy metals in edible mushrooms in Italy*. Food Chemistry, 2006. **98**(2): p. 277-284.
55. Kim, M.-Y., et al., *Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms*. Food Chemistry, 2009. **113**(2): p. 386-393.
56. Reis, F.S., et al., *Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study*. Food and Chemical Toxicology, 2012. **50**(2): p. 191-197.
57. Manzi, P., et al., *Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking*. Food Chemistry, 2004. **84**(2): p. 201-206.
58. Ding, X., Y.-l. Hou, and W.-r. Hou, *Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from Boletus speciosus Forst*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **50**(3): p. 613-618.
59. Wang, F., et al., *Structure elucidation and antioxidant effect of a polysaccharide from Lactarius camphoratum (Bull.) Fr*. International Journal of Biological Macromolecules, 2013. **62**: p. 131-136.
60. Maity, P., et al., *Structure elucidation and antioxidant properties of a soluble β -D-glucan from mushroom Entoloma lividoalbum*. International Journal of Biological Macromolecules, 2014. **63**: p. 140-149.
61. Andrade Pires, A.d.R., et al., *Cytotoxic effect of Agaricus bisporus and Lactarius rufus β -D-glucans on HepG2 cells*. International Journal of Biological Macromolecules, 2013. **58**: p. 95-103.

62. Ding, X., Y. Hou, and W. Hou, *Structure feature and antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from Lactarius deliciosus Gray*. Carbohydrate Polymers, 2012. **89**(2): p. 397-402.
63. Wang, D., et al., *Characterization of a water-soluble polysaccharide from Boletus edulis and its antitumor and immunomodulatory activities on renal cancer in mice*. Carbohydrate Polymers, 2014. **105**(0): p. 127-134.
64. Roy, S.K., et al., *Structural studies of an immunoenhancing water-soluble glucan isolated from hot water extract of an edible mushroom, Pleurotus florida, cultivar Assam Florida*. Carbohydrate Research, 2009. **344**(18): p. 2596-2601.
65. Han, X.-Q., et al., *Structure characterization and immunocompetence of a glucan from the fruiting bodies of Cantharellus cibarius*. Journal of Asian Natural Products Research, 2013. **15**(11): p. 1204-1209.
66. Samanta, S., et al., *Structural characterization of an immunoenhancing glucan isolated from a mushroom Macrolepiota dolichaula*. International Journal of Biological Macromolecules, 2013. **61**: p. 89-96.
67. Synytsya, A. and M. Novak, *Structural diversity of fungal glucans*. Carbohydrate Polymers, 2013. **92**(1): p. 792-809.
68. Zhang, M., et al., *Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity*. Trends in Food Science & Technology, 2007. **18**(1): p. 4-19.
69. Carbonero, E.R., et al., *A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms Pleurotus eryngii and Pleurotus ostreatoroseus*. Carbohydrate Polymers, 2006. **66**(2): p. 252-257.
70. Carbonero, E.R., et al., *Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom Pleurotus sajor-caju*. Carbohydrate Polymers, 2012. **90**(2): p. 814-819.
71. Santos-Neves, J.C., et al., *A gel-forming β -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom Pleurotus florida*. Carbohydrate Research, 2008. **343**(9): p. 1456-1462.
72. Liu, Y., et al., *Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive β -D-glucan from the fruiting bodies of Ganoderma lucidum*. Carbohydrate Polymers, 2014. **101**: p. 968-974.
73. Bohn, J.A. and J.N. BeMiller, *(1 \rightarrow 3)- β -D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships*. Carbohydrate Polymers, 1995. **28**(1): p. 3-14.
74. Chen, L., et al., *Cell wall structure of mushroom sclerotium (Pleurotus tuber-regium): Part 2. Fine structure of a novel alkali-soluble hyper-branched cell wall polysaccharide*. Food Hydrocolloids, 2014. **38**: p. 48-55.
75. Sletmoen, M. and B.T. Stokke, *Review : Higher order structure of (1,3)- β -D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities*. Biopolymers, 2008. **89**(4): p. 310-321.

76. Zhang, Y., et al., *Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**(2): p. 196-206.
77. Mizuno, M. and Y. Nishitani, *Immunomodulating compounds in Basidiomycetes*. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2013. **52**(3): p. 202-207.
78. Takedatsu, H., et al., *A New Therapeutic Approach Using a Schizophyllan-based Drug Delivery System for Inflammatory Bowel Disease*. Molecular Therapy, 2012. **20**(6): p. 1234-1241.
79. Kidd, P.M., *The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment*. Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic, 2000. **5**(1): p. 4-27.
80. Moradali, M.-F., et al., *Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)*. International Immunopharmacology, 2007. **7**(6): p. 701-724.
81. Giavasis, I., *Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals*. Current Opinion in Biotechnology, 2014. **26**(2014): p. 162-173.
82. Ooi, V.E.C. and F. Liu, *Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes*. Current Medicinal Chemistry, 2000. **7**(7): p. 715-729.
83. Moradali, M.F., et al., *Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)*. International Immunopharmacology, 2007. **7**(6): p. 701-724.
84. Jesenak, M., et al., *Immunomodulatory effect of pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections*. International Immunopharmacology, 2013. **15**(2): p. 395-399.
85. Bobek, P., V. Nosalova, and S. Cerna, *Effect of pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in diet or drinking fluid on colitis in rats*. Molecular Nutrition and Food Research 2001. **45**(5): p. 360-363.
86. Bobek, P. and S. Galbavy, *Effect of pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon*. British Journal of Biomedical Science, 2001. **58**(3): p. 164-168.
87. Cheung, Y.-C., et al., *Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide-protein complexes from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction*. Process Biochemistry, 2012. **47**(5): p. 892-895.
88. Li, N., et al., *Isolation and identification of a novel polysaccharide-peptide complex with antioxidant, anti-proliferative and hypoglycaemic activities from the abalone mushroom*. Bioscience Reports, 2012. **32**(3): p. 221-228.
89. Zhang, M., et al., *Fractionation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides and polysaccharide-protein complexes from *Pleurotus geesteranus**. International Journal of Biological Macromolecules, 2011. **48**(1): p. 5-12.

90. Hoshi, H., et al., *Isolation and characterization of a novel immunomodulatory α -glucan-protein complex from the mycelium of *Tricholoma matsutake* in basidiomycetes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(23): p. 8948-8956.
91. Tsukagoshi, S., et al., *Krestin (PSK)*. Cancer Treatment Reviews, 1984. **11**(2): p. 131-155.
92. Yang, Q.Y., et al., *Antitumor and Immunomodulating Activities of the Polysaccharide-Peptide (PSP) of *Coriolus-versicolor** Eos-Rivista Di Immunologia Ed Immunofarmacologia, 1992. **12**(1): p. 29-34.
93. Kim, G.-Y., et al., *Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus**. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2006. **70**(5): p. 1218-1226.
94. Gonzaga, M.L.C., et al., *Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill*. Carbohydrate Polymers, 2005. **60**(1): p. 43-49.
95. Gonzaga, M.L.C., et al., *In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an α -(1 \rightarrow 4)-glucan- β -(1 \rightarrow 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill*. Journal of Natural Medicines, 2009. **63**(1): p. 32-40.
96. El-Mekkawy, S., et al., *Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum**. Phytochemistry, 1998. **49**(6): p. 1651-1657.
97. Mothana, R.A.A., et al., *Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi**. Journal of Natural Products, 2000. **63**(3): p. 416-418.
98. Luo, D.Q., et al., *Rufuslactone, a new antifungal sesquiterpene from the fruiting bodies of the basidiomycete *Lactarius rufus**. Journal of Antibiotics, 2005. **58**(7): p. 456-459.
99. Mau, J.L., H.C. Lin, and S.F. Song, *Antioxidant properties of several specialty mushrooms*. Food Research International, 2002. **35**(6): p. 519-526.
100. Elmastas, M., et al., *Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms*. Journal of Food Composition and Analysis, 2007. **20**(3-4): p. 337-345.
101. Heleno, S.A., et al., *Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity*. Food Chemistry, 2010. **119**(4): p. 1443-1450.
102. Martins, D., et al., *Nutritional and in vitro antioxidant properties of edible wild greens in Iberian Peninsula traditional diet*. Food Chemistry, 2011. **125**(2): p. 488-494.
103. Heleno, S.A., et al., *Phenolic, Polysaccharidic, and Lipidic Fractions of Mushrooms from Northeastern Portugal: Chemical Compounds with Antioxidant Properties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(18): p. 4634-4640.
104. Barros, L., et al., *Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts*. European Food Research and Technology, 2007. **225**(2): p. 151-156.

105. Zaidman, B.Z., et al., *Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005. **67**(4): p. 453-468.
106. Lull, C., H.J. Wichers, and H.F.J. Savelkoul, *Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites*. Mediators of Inflammation, 2005. **2005**(2): p. 63-80.
107. Brown, G.D. and S. Gordon, *Immune recognition - A new receptor for β -glucans*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 36-37.
108. Brown, G.D. and S. Gordon, *Immune recognition of fungal β -glucans*. Cellular Microbiology, 2005. **7**(4): p. 471-479.
109. Chen, J. and R. Seviour, *Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans*. Mycological Research, 2007. **111**: p. 635-652.
110. Chan, G.C.-F., W.K. Chan, and D.M.-Y. Sze, *The effects of β -glucan on human immune and cancer cells*. Journal of Hematology & Oncology, 2009. **2**.
111. Ruthes, A.C., et al., *Lactarius rufus (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)- β -D-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects*. Carbohydrate Polymers, 2013. **94**(1): p. 129-136.
112. Ye, L., et al., *Biochemical characterization of a proteoglycan complex from an edible mushroom Ganoderma lucidum fruiting bodies and its immunoregulatory activity*. Food Research International, 2011. **44**(1): p. 367-372.
113. Yu, Z., et al., *Structure, chain conformation and antitumor activity of a novel polysaccharide from Lentinus edodes*. Fitoterapia, 2010. **81**(8): p. 1163-1170.
114. Han, X.-Q., et al., *Isolation, characterization and immunological activity of a polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, Sarcodon aspratus (Berk.) S. Ito*. Food Research International, 2011. **44**(1): p. 489-493.
115. Sun, Y. and J. Liu, *Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of Pleurotus ostreatus*. Bioresource Technology, 2009. **100**(2): p. 983-986.
116. Dey, B., et al., *Glucans of Pleurotus florida blue variant: Isolation, purification, characterization and immunological studies*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **50**(3): p. 591-597.
117. Hearst, R., et al., *An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (Lentinula edodes) and Oyster (Pleurotus ostreatus) mushrooms*. Complementary Therapies in Clinical Practice, 2009. **15**(1): p. 5-7.
118. Wang, H.X. and T.B. Ng, *Examination of lectins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases*. Planta Medica, 2001. **67**(7): p. 669-672.
119. Wang, J.C.Y., et al., *Hypoglycemic effect of extract of Hericium erinaceus*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**(4): p. 641-646.

120. Kim, J.-I., et al., *Effect of King Oyster Mushroom (Pleurotus eryngii) on Insulin Resistance and Dyslipidemia in db/db Mice*. Food Science and Biotechnology, 2010. **19**(1): p. 239-242.
121. Badole, S.L., et al., *Interaction of aqueous extract of Pleurotus pulmonarius (Fr.) Quel-Champ. with glyburide in alloxan induced diabetic mice*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2008. **5**(2): p. 159-164.
122. Hu, S.H., et al., *Antihyperglycemic effect of polysaccharide from fermented broth of Pleurotus citrinopileatus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **70**(1): p. 107-113.
123. Mascaro, M.B., et al., *Effects of Dietary Supplementation with Agaricus sylvaticus Schaeffer on Glycemia and Cholesterol after Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2014.
124. Ferreira, I.C.F.R., L. Barros, and R.M.V. Abreu, *Antioxidants in wild mushrooms*. Current Medicinal Chemistry, 2009. **16**(12): p. 1543-1560.
125. Clemens, R. and J. Dubost, *The mushrooming health benefits of fungi*. Food Technology, 2007. **61**(8): p. 17-17.
126. You, Q., X. Yin, and C. Ji, *Pulsed counter-current ultrasound-assisted extraction and characterization of polysaccharides from Boletus edulis*. Carbohydrate Polymers, 2014. **101**: p. 379-385.
127. Luo, A., J. Huang, and Y. Fan, *Purification, characterization and antioxidant activities in Vitro and in vivo of the polysaccharides from Boletus edulis bull*. Molecules, 2012. **17**(7): p. 8079-8090.
128. Zheng, J.-Q., et al., *Characterization and antioxidant activity for exopolysaccharide from submerged culture of Boletus aereus*. Process Biochemistry, 2014. **49**(6): p. 1047-1053.
129. Zhang, A., et al., *Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of polysaccharides extracted from Boletus edulis*. International Journal of Biological Macromolecules, 2011. **49**(5): p. 1092-1095.
130. Mantovani, M.S., et al., *β -glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer*. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, 2008. **658**(3): p. 154-161.
131. Mueller, A., et al., *The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line*. Glycobiology, 2000. **10**(4): p. 339-346.
132. Mandal, E.K., et al., *Structural characterization of an immunoenhancing cytotoxic heteroglycan isolated from an edible mushroom Calocybe indica var. APK2*. Carbohydrate Research, 2011. **346**(14): p. 2237-2243.
133. Falch, B.H., et al., *The cytokine stimulating activity of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation*. Carbohydrate Research, 2000. **329**(3): p. 587-596.
134. Bae, I.Y., et al., *Correlation of branching structure of mushroom β -glucan with its physiological activities*. Food Research International, 2013. **51**(1): p. 195-200.

135. Zhang, L., et al., *Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan*. Carbohydrate Research, 2005. **340**(8): p. 1515-1521.
136. Chen, X., et al., *Chain conformation and anti-tumor activities of phosphorylated (1 →3)-β-D-glucan from Poria cocos*. Carbohydrate Polymers, 2009. **78**(3): p. 581-587.
137. Morath, S.U., R. Hung, and J.W. Bennett, *Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential*. Fungal Biology reviews, 2012. **26**: p. 73-83.
138. Misharina, T.A., et al., *Formation of flavor of dry champignons (Agaricus bisporus L.)*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2010. **46**(1): p. 108-113.
139. Stoppacher, N., et al., *Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus Trichoderma atroviride by HS-SPME-GC-MS*. Journal of Microbiological Methods, 2010. **81**(2): p. 187-193.
140. Wu, S.M., et al., *Characteristic volatiles from young and aged fruiting of wild Polyporus sulfureus (Bull.: Fr.) fr.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(11): p. 4524-4528.
141. Cho, I.H., et al., *Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (Tricholoma matsutake Sing.)*. Food Chemistry, 2008. **106**(1): p. 71-76.
142. Chandravadana, M.V., et al., *Volatile flavour components of dry milky mushrooms (Calocybe indica)*. Flavour and Fragrance Journal, 2005. **20**(6): p. 715-717.
143. Kabbaj, W., et al., *Comparison of volatile compound production in fruit body and in mycelium of Pleurotus ostreatus identified by submerged and solid-state cultures*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002. **102**: p. 463-469.
144. Venkateshwarlu, C., M.V. Chandravadana, and R.P. Tewari, *Volatile flavour components of some edible mushrooms (Basidiomycetes)*. Flavour and Fragrance Journal, 1999. **14**(3): p. 191-194.
145. Zhou, J., T. Feng, and R. Ye, *Differentiation of Eight Commercial Mushrooms by Electronic Nose and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Journal of Sensors, 2015: p. 1-14.
146. Cronin, D.A. and M.K. Ward, *Characterization of some mushrooms volatile* Journal of the Science of Food and Agriculture, 1971. **22**(9): p. 477-&.
147. Misharina, T.A., et al., *The composition of volatile components of cepe (Boletus edulis) and oyster mushrooms (Pleurotus ostreatus)*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2009. **45**(2): p. 187-193.
148. Fraatz, M.A. and H. Zorn, *Fungal Flavours*, in *Industrial Applications*, M. Hofrichter, Editor. 2011, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 249-268.
149. Tressl, R., D. Bahri, and K.H. Engel, *Formation of 8-carbon and-10-carbon components in mushrooms (Agaricus-campestris)* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1982. **30**(1): p. 89-93.

150. Breheret, S., et al., *Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (Basidiomycetes)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(3): p. 831-836.
151. Calvo, A.M., et al., *Relationship between secondary metabolism and fungal development*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002. **66**(3): p. 447-459.
152. Tressl, R., D. Bahri, and K.H. Engel, *Lipid oxidation in fruits and vegetables* Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1980. **180**(AUG): p. 99-AGFD.
153. Macías-Rodríguez, L., et al., *Recent Advancements in the role of volatile organic compounds from fungi*, in *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments*, V.K. Gupta, R.L. Mach, and S. Sreenivasaprasad, Editors. 2015, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK. p. 87-99.
154. Müller, A., et al., *Volatile profiles of fungi - Chemotyping of species and ecological functions*. Fungal Genetics and Biology, 2013. **54**: p. 25-33.
155. Beltran-Garcia, M.J., M. Estarrón-Espinosa, and T. Ogura, *Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) and their antibacterial activities*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(10): p. 4049-4052.
156. Jelen, H.H., et al., *Main compounds responsible for off-odour of strawberries infected by Phytophthora cactorum*. Letters in Applied Microbiology, 2005. **40**(4): p. 255-259.
157. Vikram, A., et al., *Metabolic fingerprinting to discriminate diseases of stored carrots*. Annals of Applied Biology, 2006. **148**(1): p. 17-26.
158. Malheiro, R., et al., *Volatile biomarkers for wild mushrooms species discrimination*. Food Research International, 2013. **54**(1): p. 186-194.
159. Shores, M., G.E. Harman, and F. Mastouri, *Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents*, in *Annual Review of Phytopathology, Vol 48*, N.K. VanAlfen, G. Bruening, and J.E. Leach, Editors. 2010. p. 21-43.
160. Hung, R., S. Lee, and J.W. Bennett, *Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015. **99**(8): p. 3395-3405.
161. Izydorczyk, M., *Understanding the chemistry of food carbohydrates*, in *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications*, S.W. Cui, Editor. 2005, Taylor & Francis Group.
162. Synytsya, A., et al., *Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms Pleurotus ostreatus and Pleurotus eryngii: Structure and potential prebiotic activity*. Carbohydrate Polymers, 2009. **76**(4): p. 548-556.
163. Bradford, M.M., *Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
164. Brummer, Y. and S.W. Cui, *Understanding Carbohydrate Analysis*, in *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications*, S.W. Cui, Editor. 2005, Taylor & Francis Group.

165. Dubois, M., et al., *Colorimetric method for the determination of sugars and related substances* Analytical Chemistry, 1956. **28**(3): p. 350-356.
166. Saha, S.K. and C.F. Brewer, *Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the Phenol Sulfuric-acid method* Carbohydrate Research, 1994. **254**: p. 157-167.
167. Dong, M.W., *Introduction*, in *Modern HPLC for Practicing Scientists*, M.W. Dong, Editor. 2006, John Wiley & Sons, Inc. . p. 1-14.
168. Johansson, L., et al., *Hydrolysis of β -glucan*. Food Chemistry, 2006. **97**(1): p. 71-79.
169. Blakeney, A.B., et al., *A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharides analysis*. Carbohydrate Research, 1983. **113**(2): p. 291-299.
170. McMaster, M.C., *Introduction*, in *GC/MS. A Practical User's Guide*, Willey-Interscience, Editor. 2008, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey. p. 3-20.
171. Ciucanu, I. and F. Kerek, *A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates* Carbohydrate Research, 1984. **131**(2): p. 209-217.
172. Ciucanu, I. and C.E. Costello, *Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(52): p. 16213-16219.
173. Ciucanu, I. and R. Caprita, *Per-O-methylation of neutral carbohydrates directly from aqueous samples for gas chromatography and mass spectrometry analysis*. Analytica Chimica Acta, 2007. **585**(1): p. 81-85.
174. Tao, Y. and L. Zhang, *Determination of molecular size and shape of hyperbranched polysaccharide in solution*. Biopolymers, 2006. **83**(4): p. 414-423.
175. Picken, M.M., *Amyloidosis-Where Are We Now and Where Are We Heading?* Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2010. **134**(4): p. 545-551.
176. Mao, C.-F., M.-C. Hsu, and W.-H. Hwang, *Physicochemical characterization of grifolan: Thixotropic properties and complex formation with Congo Red*. Carbohydrate Polymers, 2007. **68**(3): p. 502-510.
177. Rout, D., et al., *The structure and conformation of a water-insoluble (1 \rightarrow 3)-, (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan from the fruiting bodies of *Pleurotus florida**. Carbohydrate Research, 2008. **343**(5): p. 982-987.
178. Ogawa, K., J. Tsurugi, and T. Watanabe, *Complex of gel-forming β -1,3-D-glucan with congo-red in alkaline solution* Chemistry Letters, 1972(8): p. 689-&.
179. Young, S.H., W.J. Dong, and R.R. Jacobs, *Observation of a partially opened triple-helix conformation in (1 \rightarrow 3)- β -glucan by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(16): p. 11874-11879.
180. Zhang, L., et al., *Transition from triple helix to coil of Lentinan in solution measured by SEC, viscometry, and C-13 NMR*. Polymer Journal, 2002. **34**(6): p. 443-449.

181. Kavooosi, G. and S.K. Ardestani, *Gel Electrophoresis of Protein - From Basic Science to Practical Approach in Gel Electrophoresis - Principles and Basics* D.S. Magdeldin, Editor. 2012, InTech: Rijeka, Croatia. p. 69-88.
182. Shapiro, A.L., E. Vinuela, and J.V. Maizel, *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-Polyacrylamide gels*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967. **28**(5): p. 815-8.
183. Segrest, J.P., et al., *Human erythrocyte membrane glycoprotein: A re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1971. **44**(2): p. 390-395.
184. Durchschlag, H., P. Christl, and R. Jaenicke, *Comparative determination of the particle weight of glycoproteins by SDS-PAGE and analytical ultracentrifugation* Progress in Analytical Ultracentrifugation, ed. W. Borchard. Vol. 86. 1991. 41-56.
185. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
186. García-Descalzo, L., et al., *Gel Electrophoresis of Proteins in Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, D.S. Magdeldin, Editor. 2012, InTech: Rijeka, Croatia p. 57-68.
187. Van-Seuningen, I. and M. Davril, *A rapid periodic acid-Schiff staining procedure for the detection of glycoproteins using the PhastSystem*. Electrophoresis, 1992. **13**(1-2): p. 97-99.
188. Komura, D.L., et al., *Structure of Agaricus spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties*. Bioresource Technology, 2010. **101**(15): p. 6192-6199.
189. Borchers, A.T., C.L. Keen, and M.E. Gershwin, *Mushrooms, tumors, and immunity: An update*. Experimental Biology and Medicine, 2004. **229**(5): p. 393-406.
190. Lemieszek, M.K., et al., *Boletus edulis biologically active biopolymers induce cell cycle arrest in human colon adenocarcinoma cells*. Food & Function, 2013. **4**(4): p. 575-585.
191. Luo, A., et al., *Purification, Characterization and Antioxidant Activities in Vitro and in Vivo of the Polysaccharides from Boletus edulis Bull*. Molecules, 2012. **17**(7): p. 8079-8090.
192. Daniewski, W.M., et al., *Search for Bioactive Compounds from Cantharellus cibarius*. Natural Product Communications, 2012. **7**(7): p. 917-918.
193. Maity, K., et al., *Structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant property of a novel polysaccharide isolated from the aqueous extract of a somatic hybrid mushroom of Pleurotus florida and Calocybe indica variety APK2*. International Journal of Biological Macromolecules, 2011. **48**(2): p. 304-310.
194. Mandal, E.K., et al., *Chemical analysis of an immunostimulating (1 → 4)-, (1 → 6)-branched glucan from an edible mushroom, Calocybe indica*. Carbohydrate Research, 2012. **347**(1): p. 172-177.

195. Chen, L., et al., *Cell wall structure of mushroom sclerotium (Pleurotus tuber regium): Part 1. Fractionation and characterization of soluble cell wall polysaccharides*. Food Hydrocolloids, 2014. **36**: p. 189-195.
196. Chauveau, C., et al., *A water-soluble β -D-glucan from Boletus erythropus*. Phytochemistry, 1996. **43**(2): p. 413-415.
197. Zhang, A.-q., et al., *Structural investigation of a novel heteropolysaccharide from the fruiting bodies of Boletus edulis*. Food Chemistry, 2014. **146**: p. 334-338.
198. Li, B., et al., *Structural investigation of water-soluble polysaccharides extracted from the fruit bodies of Coprinus comatus*. Carbohydrate Polymers, 2013. **91**(1): p. 314-321.
199. Dong, Q., et al., *Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of Agaricus blazei Murr.* Carbohydrate Research, 2002. **337**(15): p. 1417-1421.
200. Ruthes, A.C., et al., *Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from Agaricus bisporus and Lactarius rufus*. Carbohydrate Polymers, 2012. **87**(2): p. 1620-1627.
201. Ojha, A.K., et al., *Glucans from the alkaline extract of an edible mushroom, Pleurotus florida, cv Assam Florida: isolation, purification, and characterization*. Carbohydrate Research, 2010. **345**(15): p. 2157-2163.
202. Grass, J., et al., *Discovery and Structural Characterization of Fucosylated Oligomannosidic N-Glycans in Mushrooms*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(8): p. 5977-5984.
203. Roy, S.K., et al., *Structural analysis of a polysaccharide isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, Pleurotus sajor-caju, cultivar Black Japan*. Carbohydrate Research, 2008. **343**(6): p. 1108-1113.
204. Ghosh, K., et al., *Structural investigation of a polysaccharide (Fr. I) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, Volvariella diplasia*. Carbohydrate Research, 2008. **343**(6): p. 1071-1078.
205. Bhunia, S.K., et al., *Structural characterization of an immunoenhancing heteroglycan isolated from an aqueous extract of an edible mushroom, Lentinus squarrosulus (Mont.) Singer*. Carbohydrate Research, 2010. **345**(17): p. 2542-2549.
206. Mandal, S., et al., *Chemical analysis of new water-soluble (1 \rightarrow 6)-, (1 \rightarrow 4)- α , β -glucan and water-insoluble (1 \rightarrow 3)-, (1 \rightarrow 4)- β -glucan (Calocyban) from alkaline extract of an edible mushroom, Calocybe indica (Dudh Chattu)*. Carbohydrate Research, 2010. **345**(18): p. 2657-2663.
207. Mandal, E.K., et al., *Chemical analysis of an immunostimulating (1 \rightarrow 4)-, (1 \rightarrow 6)-branched glucan from an edible mushroom, Calocybe indica*. Carbohydrate Research, 2013. **347**(1): p. 172-177.
208. Kolb, B. and L.S. Ettre, *General introduction*, in *Static HeadSpace-Gas Chromatography. Theory and Practice*, B. Kolb and L.S. Ettre, Editors. 2006, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey. p. 1-18.

209. Chandra, S. and Samsher, *Dehydration and sensory quality evaluation of edible mushrooms: A critical review*. Journal of Food Science and Technology, 2006. **43**(3): p. 221-227.
210. Ratti, C., *Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review*. Journal of Food Engineering, 2001. **49**(4): p. 311-319.
211. Aprea, E., et al., *Volatile compound changes during shelf life of dried Boletus edulis: comparison between SPME-GC-MS and PTR-ToF-MS analysis*. Journal of Mass Spectrometry, 2014. **50**(1): p. 56-64.
212. Misharina, T.A., et al., *The Composition of Volatile Components of Dry Cepe and Oyster Mushroom*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2009. **45**(5): p. 544-549.
213. Lizarraga-Guerra, R., H. Guth, and M.G. Lopez, *Identification of the most potent odorants in huitlacoche (Ustilago maydis) and austern pilzen (Pleurotus sp.) by aroma extract dilution analysis and static head-space samples*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(4): p. 1329-1332.
214. Ouzouni, P.K., et al., *Volatile compounds from the fruiting bodies of three Hygrophorus mushroom species from Northern Greece*. International Journal of Food Science and Technology, 2009. **44**(4): p. 854-859.
215. Rapior, S., et al., *Investigation of some volatile components of seven fresh wild mushrooms (Basidiomycetes)*. Journal of Essential Oil Research, 1996. **8**(2): p. 199-201.
216. Pyysalo, H., *Identification of volatile compounds in seven edible fresh mushrooms*. Acta Chemica Scandinavica, 1976. **30b**: p. 235-244.
217. Maga, J.A., *Mushroom flavor*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1981. **29**(1): p. 1-4.
218. Belitz, H.-D., W. Grosch, and P. Schieberle, *Aroma Compounds*, in *Food Chemistry*, H.-D. Belitz, W. Grosch, and P. Schieberle, Editors. 2009, Springer. p. 340-402.
219. Kompany, E. and F. Rene, *Aroma Retention of Cultivated Mushrooms (Agaricus bisporus) During the Freeze-drying Process*. LWT - Food Science and Technology, 1993. **26**(6): p. 524-528.
220. Ashmore, L., J.D. Craske, and G. Szrednicki, *Volatile compounds in fresh, cooked fresh, dried and cooked dried Agaricus bisporus using ambient temperature vacuum distillation*. International Food Research Journal, 2014. **21**(1): p. 263-268.
221. Picardi, S.M. and Issenber.P, *Investigation of some volatile constituents of mushrooms (Agraicus-bisporus)- Changes which occur ruring heating* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1973. **21**(6): p. 959-962.
222. Cho, I.H., H.K. Choi, and Y.S. Kim, *Difference in the volatile composition of pine-mushrooms (Tricholoma matsutake Sing.) According to their grades*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(13): p. 4820-4825.