



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

TRABAJO FIN DE GRADO:

“Efecto del tratamiento térmico sobre la digestión de proteínas en la seta *Sarcodon imbricatus*”

AUTOR: Sergio García Castro

TUTOR: Tomás Girbés Juan

Resumen

Los hongos son un alimento de bajo aporte calórico, con un buen perfil de nutrientes aportando gran cantidad de hidratos de carbono y baja cantidad de grasa. También contienen una cantidad elevada de fibra y un perfil proteico más aprovechable que el de plantas o vegetales, y una gran cantidad de vitaminas como pueden ser tiamina, riboflavina, piridoxina o ácido ascórbico, entre otras. En cuanto a minerales encontramos fósforo, hierro, calcio y potasio. Además, poseen propiedades, como pueden ser la capacidad antioxidante, inmunomoduladora, antialérgica, antitumoral o antiinflamatoria, que se describen en este trabajo, que les convierte en un alimento funcional muy interesante.

El presente trabajo experimental trata sobre el *Sarcodon imbricatus*, una seta comestible poco conocida y que es ampliamente consumida en centro y norte Europa, pero poco consumida en España. Existen muy pocos estudios sobre *S. imbricatus*. En el presente estudio se aborda el análisis del perfil proteínico y la digestibilidad gástrica e intestinal de sus proteínas mediante electroforesis en el de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). Se ha encontrado que, aunque la mayor parte de proteínas se degradan por un fluido gástrico simulado, hay algunas que aparentemente no sufren degradación por una digestión secuencial primero fluido gástrico simulado y después pancreatina. El resultado parece depender del procedimiento de obtención del crudo de proteínas. El cocinado por salteado suave provoca una profunda degradación de las proteínas.

PALABRAS CLAVE: *Sarcodon imbricatus*, Hongo, Propiedades medicinales, Propiedades nutricionales, Proteínas, Capacidad tolerogénica.

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE
2. INTRODUCCIÓN
 - 2.1. HONGOS MEDICINALES
 - 2.2. PROPIEDADES MEDICINALES DE LOS HONGOS
 - 2.3. CICLO Y PARTES DE LOS HONGOS
 - 2.4. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL
 - 2.5. COMPUESTOS BIOACTIVOS
 - 2.6. *SARCODON IMBRICATUS*
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
4. MATERIALES Y MÉTODOS
5. RESULTADOS
6. DISCUSIÓN
7. CONCLUSIONES
8. BIBLIOGRAFÍA
9. ANEXOS

2. INTRODUCCIÓN

Hongo y seta no son lo mismo. Hongos son todos aquellos seres vivos uni o pluricelulares, carentes de clorofila o de cualquier pigmento fotosintético, que se ven forzados a vivir a expensas de otros seres vivos, vegetales o animales, actuando como parásitos; o bien asociándose con ellos, como micorrizógenos, o utilizando materiales de desecho de ambos grupos comportándose entonces como saprofitos.

El término hongo implica un individuo completo con autonomía propia, mientras que las setas solo son una parte del hongo, es decir, el fruto del mismo, que solo producen los hongos más evolucionados, también llamados " superiores"

Los hongos fueron colocados en un reino aparte, tomando por base algunos de sus características particulares. Se trata de organismos eucarióticos, heterótrofos y, con excepción de las levaduras, pluricelulares (o multinucleares). Obtienen su alimento por absorción en vez de por ingestión. Secretan enzimas digestivas en su medio y luego absorben los productos digeridos externamente. Casi todos los hongos poseen paredes celulares de quitina, polisacárido aminados. Casi todos carecen de flagelos y se encuentran restringidos en cuanto a movilidad.

2.1 HONGOS MEDICINALES

La utilización de los hongos por el hombre, para el tratamiento de enfermedades, se remonta a los primeros tiempos de la humanidad.

En Europa existen datos sobre el uso de ciertos hongos, como el cornezuelo o la trufa utilizados como medicina desde hace miles de años.

Existen dos hongos que han marcado un antes y un después en el transcurso de la humanidad. Uno es la *Ganoderma Lucidum* conocida en China y Japón con los nombres populares de “*Ling zhi*” y “*Reishi*”, respectivamente.

El otro es el *Penicillium notatum*, a partir del cual Fleming descubrió la penicilina en el año 1928 y que sigue siendo un antibiótico activo y muy útil.

Cuando se usan hongos para el tratamiento de enfermedades hay que tener en cuenta los mismos procesos que suceden en medicina con otra clase de fármacos, teniendo en cuenta que no es lo mismo la respuesta *in vivo* que *in vitro*. También influye la vía de administración.

2.2 PROPIEDADES MEDICINALES DE LOS HONGOS

Hemos hablado que el consumo de hongos o sus compuestos bioactivos aislados suponen un beneficio para la salud. Ahora haremos una revisión de las propiedades medicinales presentes en los hongos y sus compuestos bioactivos:

1. Antioxidante:

Actualmente, la capacidad antioxidante de los alimentos está cobrando cada vez mayor importancia como medio para combatir el estrés oxidativo. El metabolismo celular produce de manera natural especies reactivas del oxígeno, los conocidos “radicales libres”. Cuando el mecanismo antioxidante no es capaz de detoxificar un exceso de estas especies, el resultado es el estrés oxidativo. Los antioxidantes pueden ser endógenos, generados por el propio organismo, o exógenos, que son los que provienen de la dieta. Incrementar la ingesta de antioxidantes ayuda a proteger al organismo de los radicales libres y retrasa el progreso de muchas enfermedades crónicas

Incrementar la ingesta de antioxidantes ayuda a proteger al organismo de los radicales libres y retrasa el progreso de muchas enfermedades crónicas. Hay varios tipos de antioxidantes según su mecanismo de acción: preventivos, los que inhiben la formación de radicales libres; secuestrantes de radicales libres y las enzimas reparadoras que se encargan de reparar el daño una vez que se ha producido. (Liu y cols., 2013)

El valor antioxidante de los hongos es comparable con el de los alimentos de origen vegetal, los compuestos responsables del poder antioxidante en los hongos son varios: selenio, compuestos fenólicos, ergotioneína, tocoferoles, carotenoides, etc.

Se ha encontrado una relación positiva entre ese mayor contenido en fenoles y la capacidad de secuestrar radicales libres, siendo estos fenoles los compuestos que más contribuyen a la capacidad antioxidante.

Además, los polisacáridos de los hongos pueden potenciar los sistemas de defensa in vivo contra el daño oxidativo.

La ergotioneína es un compuesto que se encuentra en los hongos y que es un excelente antioxidante in vivo y además protege a las células contra el daño oxidativo. (Dubost y cols., 2007; Aruoma y cols., 1999)

El selenio juega un papel muy importante en los sistemas antioxidantes del cuerpo humano, actuando como cofactor de la glutatión peroxidasa, potenciando las actividades de α -tocoferol y ayudando a los mecanismos de reparación del DNA.

2. Antitumoral

Los hongos contienen una serie de compuestos, ya citados anteriormente, que poseen actividad anticancerígena. El consumo de hongos puede reducir el riesgo de padecer algunos tumores o prevenirlos. Estudios epidemiológicos han demostrado que la ingesta habitual de hongos que presentan actividad anticancerígena como parte de una dieta normal reduce el riesgo de formación de tumores.

El consumo del hongo *Maitake* incrementa la actividad de las células T auxiliares que atacan a las células cancerígenas y ejerce un efecto favorable sobre el cáncer de pecho, colón y próstata. Los hongos *shiitake* y *reishi* tienen actividad antitumoral en estudios in vivo con animales. Algunos hongos del género *Cordyceps* son capaces de inhibir la división y proliferación de células cancerígenas. Entre los compuestos con actividad antitumoral de los hongos, los polisacáridos parecen ser los más potentes. Estudios científicos muestran que los polisacáridos de los champiñones pueden evitar la oncogénesis, por su actividad antitumoral directa contra varios tumores y además previenen la metástasis del tumor. “*Su actividad se incrementa cuando se utiliza junto con la quimioterapia.*” (Wasser, 2011)

3. Inmunomoduladora

Un inmunomodulador es una sustancia que modifica (puede aumentar o disminuir) la capacidad del sistema inmune para ejercer una o más de sus funciones, como la producción de anticuerpos, el reconocimiento antigénico, o la secreción de mediadores inflamatorios. La modulación del sistema inmune a través de su estimulación o supresión puede contribuir al mantenimiento de un buen estado de salud.

Los hongos comestibles constituyen una fuente de compuestos “potenciadores de la defensa del huésped” por su actividad estimuladora del sistema inmune. Diversas sustancias con efecto inmunoestimulante se han aislado del micelio y de los cuerpos de fructificación de diferentes hongos, fundamentalmente polisacáridos con estructura tipo β -glucanos, lectinas y terpenos. Chen y Seviour (2007) indican que: “*Estos compuestos estimulan diferentes poblaciones celulares como macrófagos, células NK (un tipo de linfocito), neutrófilos o linfocitos e inducen la síntesis de citoquinas.*”

Según el peso molecular de los polisacáridos extraídos de los hongos el mecanismo de la acción inmunomoduladora será diferente. Los polisacáridos de bajo peso molecular pueden penetrar en las células y ejercer así el efecto potenciador del sistema inmune. Los de mayor peso molecular, al no poder entrar en la célula, se unen a receptores específicos de la membrana celular y propagan así la respuesta.

Una de las más representativas es la *Ganoderma*. Estudios realizados con polisacáridos de *Ganoderma lucidum* mostraron que dichos compuestos son capaces de estimular el sistema inmune de ratones inmunodeprimidos, los autores aseguran que estos compuestos podrían utilizarse como potenciadores para paliar la inmunosupresión inducida por quimioterapia

4. Antiobesidad y antihiperlipemiente

La obesidad es un serio problema de salud pública que ha alcanzado proporciones epidémicas en muchos países desarrollados. En los últimos años varios estudios han destacado los efectos beneficiosos de ciertas especies de hongos en la prevención de la obesidad y sus alteraciones asociadas.

Experimentos con *Pleurotus eryngii* y *shiitake* tienen resultados positivos en la reducción de obesidad y niveles de lípidos demostrado en estudios con ratas. (Handayani y cols., 2014; Kanagasabapathy y cols., 2013; Schneider y cols., 2011.; Jeong y cols 2010.)

5. Anticolesterolémico

Los hongos y sus extractos podrían ser considerados como una nueva fuente de compuestos con actividad hipocolesterolémica porque son ricos en derivados del ergosterol, β -glucanos e inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa.

Entre diversas especies de hongos destaca el género *Pleurotus* por su efecto potencialmente regulador del metabolismo del colesterol. Estos hongos pueden sintetizar lovastatina, una estatina altamente hipocolesterolémica porque inhibe la enzima HMG-CoA reductasa, enzima clave en la regulación de la biosíntesis del colesterol en el hígado. La lovastatina también aumenta la actividad de los receptores del colesterol LDL. Además, algunos β -glucanos de *Pleurotus* son capaces de unirse a los ácidos biliares, reduciendo la formación de las micelas y la absorción del colesterol

6. Antidiabética

Los hongos son el alimento ideal para prevenir la hiperglicemia debido a su alto contenido en fibra y proteína y por los compuestos bioactivos que poseen como los polisacáridos y las lectinas.

Mascaro (2014) indica que: “*Glucanos extraídos de Agaricus blazei reducen el nivel de glucosa, triglicéridos y colesterol en la sangre simulando la acción de la insulina*”.

7. Antihipertensiva

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica caracterizada por un incremento continuo de la presión sanguínea en las arterias. Se han identificado varios compuestos antihipertensivos en vegetales y otros alimentos. Muchos de los antihipertensivos son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) que inhiben una serie de reacciones (sistema renina angiotensina aldosterona) que regulan la presión sanguínea. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina se han detectado en varios hongos: *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum* o *Pleurotus cornucopiae*, entre otros, siendo *Ganoderma lucidum* el hongo que mostró más actividad antihipertensiva.

8. Hepatoprotectora

El hígado es uno de los órganos más complejos y a la vez más importante en nuestro organismo. El papel de los hongos y sus compuestos bioactivos en las funciones hepáticas se lleva investigando varios años, se ha comprobado que dichos compuestos pueden reparar el daño causado en el hígado por toxinas, protegerlo frente a agentes tóxicos, regenerar los hepatocitos dañados, reducir la inflamación, etc. (Ha do y cols., 2013; Sudheesh y cols., 2012)

9. Antialérgica

Una alergia es una hipersensibilidad a una partícula o sustancia que, si se inhala, ingiere o toca, produce unos síntomas característicos. Los extractos de algunos hongos son capaces de estimular el sistema inmune, lo que podría ser interesante para el tratamiento de la alergia. Es el caso de extractos acuosos obtenidos de *Hypsizygus marmoreus*, *Flammulina velutipes*, *Pholiota nameko* y *P. eryngii*, que han mostrado una actividad antialérgica significativa en ensayos en ratones con alergia inducida. (Sano y cols., 1998)

10. Antimicrobiana

Los antimicrobianos naturales, compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, son sintetizados por algunos tipos de plantas y vegetales. Los hongos producen también sustancias antibacterianas y antifúngicas para defenderse de otras especies, lo que les confieren propiedades antimicrobianas contra bacterias, levaduras y otro tipo de hongos. Muchos de los metabolitos secundarios que secretan los hongos se utilizan para combatir infecciones bacterianas y fúngicas y alargar la vida útil de otros productos alimenticios.

Uno de los hongos más estudiados, en cuanto a sus propiedades antimicrobianas, es *Lentinula edodes*. Así, (Hirasawa y cols., 1999) indican que: “*Extractos aislados de esta seta se muestran activos frente a algunas bacterias como Streptococcus spp., Actinomyces spp., Lactobacillus spp. y Pophyromonas spp.*”

11. Antiviral

Las enfermedades víricas no se pueden tratar con antibióticos comunes, son necesarios medicamentos específicos contra los virus que causan dichas infecciones. La actividad antiviral en los hongos se ha descrito tanto para los hongos enteros como para los compuestos bioactivos que se extraen de ellos. En el caso de los hongos, la acción antiviral puede producirse de forma directa mediante la inhibición de determinadas enzimas virales, de la síntesis de algunos ácidos nucleicos del virus o de la absorción y replicación del virus en las células; y también de forma indirecta, mediante la estimulación del sistema inmune.

Destacan varios triterpenos aislados de *Ganoderma lucidum*, por ejemplo, el ácido ganodérico, que han demostrado tener una importante actividad antiviral frente al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). (El-Mekkawy y cols., 1998)

Cabe destacar también la actividad antiviral del género *Pleurotus*. Una enzima aislada de este hongo es capaz de inhibir la entrada del virus de la hepatitis C a las células sanguíneas evitando su replicación. (El-Fakharany y cols., 2010).

12. Papel importante en enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas y, en particular el Alzheimer, son enfermedades relacionadas con el envejecimiento y que afectan cada vez más a la población a partir de los 65 años.

Entre las especies de hongos a las que se le atribuye actividad biológica relacionada con el sistema nervioso y la salud cerebral se encuentran: *Sarcodon scabrosus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* y *Hericium erinaceus*. *Ganoderma lucidum* contiene compuestos neuroactivos que pueden inducir la diferenciación neuronal y prevenir la apoptosis de las neuronas dependientes del NGF (factor de crecimiento tumoral) (Park y cols. 2002)

Otra especie importante es *Hericium erinaceus*. En el sistema nervioso puede regular el crecimiento y desarrollo de las neuronas. (Mori y cols., 2009)

2.4. CICLO Y PARTES DE LOS HONGOS

En todos los macromicetos o setas diferenciamos:

El micelio, formado por una serie de filamentos o hifas, en general de color blanco, que vive bajo tierra entre el humus o rodeando raíces, sobre hojas o madera muerta e incluso sobre otros hongos, plantas o animales. Constituye la parte vegetativa del hongo. Estos filamentos o hifas crecen radial e indefinidamente en todas las direcciones, formando en algunos casos círculos completos que fueron denominados “*corros de brujas o de hadas*” debido a su fructificación espontánea y misteriosa.

El carpóforo o vulgarmente denominado seta. Del extremo de los micelios fructifica el cuerpo fructífero: “seta o carpóforo”, formado, en su mayoría, por un tejido estéril. Solo una pequeña parte de la seta o carpóforo es fértil, la zona conocida como “*himenio*”, que se corresponde con las láminas, los tubos, los agujijones, y, en ciertos casos, con una superficie lisa o ligeramente arrugada. (Fig. 1)

En el *himenio* se producen las esporas que permiten la difusión de una especie. La mayoría de los hongos producen esporas; aquellos que no lo hacen se denominan hongos asporógenos. Cuando la spora madura cae sobre el sustrato que puede ser el adecuado o no. En la mayoría de los casos las esporas se pierden por no encontrar unas condiciones adecuadas. Si todo le es favorable germina y se forman las hifas, dando lugar a ramificaciones denominadas micelio primario que es microscópico. Al entrar en contacto con otro producido simultáneamente por otra spora con signo sexual contrario, se fusionan y forman el filamento secundario, que se ramifica considerablemente formando un entramado cerca de la superficie del suelo o bajo la corteza de los árboles, llamado micelio. A partir de esta acumulación nace progresivamente una forma compacta y estructurada que precede al nuevo carpóforo, en el cual se generarán nuevas esporas.

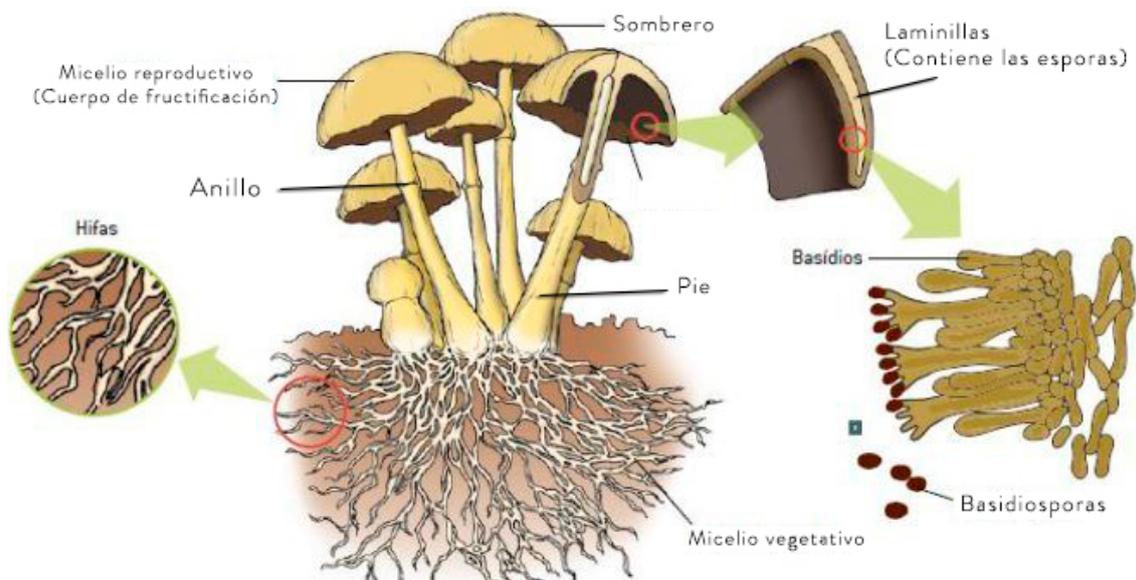


Figura 1. Esquema de las partes de un hongo.

2.5. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

El cultivo de hongos comestibles se ha incrementado considerablemente en los últimos años a nivel mundial y se prevé que la tendencia siga una línea ascendente. Como consecuencia el consumo también ha incrementado, probablemente debido a que existe un mayor conocimiento por parte del consumidor de las propiedades nutricionales y saludables de los hongos.

- **Aporte energético y humedad:**

Los hongos proporcionan aproximadamente entre 26-35 kcal/100 g en función de la especie. En concreto, el champiñón es uno de los que menos calorías aportan (26 kcal/100g) y el shiitake, aun siendo el hongo que mayor contenido energético presenta, sólo aporta 35 kcal/100 g.

Los hongos comestibles tienen un porcentaje muy alto de humedad (81,8- 94,8%). La variabilidad en dicho porcentaje depende de la especie en concreto, del cultivo, condiciones de crecimiento y de almacenamiento, etc. Poseen un bajo contenido en materia seca, que es de 60 a 140 g/kg, bajo contenido en cenizas, siendo de 0,89 g/100 g, y alto contenido en agua y actividad de agua, siendo 88 g/100 g el contenido en humedad.

Debido al alto contenido de humedad, los hongos tienen una vida útil muy corta.

Los hongos son alimentos con alto poder saciante y con baja densidad energética, que es la relación entre las calorías y el volumen de un alimento. El alto grado de humedad que tienen se relaciona con la sensación de saciedad que confieren y como además aportan muy pocas calorías, son un producto muy útil para dietas hipocalóricas.

- **Hidratos de carbono**

Los hongos son alimentos con alto poder saciante y con baja densidad energética, que es la relación entre las calorías y el volumen de un alimento. El alto grado de humedad que tienen se relaciona con la sensación de saciedad que confieren y como además aportan muy pocas calorías, son un producto muy útil para dietas hipocalóricas.

Los tipos de carbohidratos digeribles que están presentes en los hongos son: manitol (0,3-5,5% en materia seca (MS), glucosa (0,5-3,6% MS) y glucógeno (1-1,6% MS). Los carbohidratos no digeribles incluyen oligosacáridos tales como la trehalosa y polisacáridos no amiláceos tales como quitina, β -glucanos y mananos, que representan la mayor porción de carbohidratos de los hongos. El nivel de carbohidratos varía entre las diferentes especies de setas.

El contenido en hidratos de carbono complejos y fibra hacen que los hongos sean un alimento con muy bajo índice glucémico (IG=15), de modo que su digestión es más lenta y el azúcar se va liberando poco a poco. Los alimentos con un bajo índice glucémico se recomiendan para las personas que padecen diabetes puesto que suponen un menor aumento de la glucemia postprandial.

- **Proteínas:**

El contenido proteico de los hongos oscila entre 15 y 35% de peso seco, dependiendo de las especies, de las variedades y de la etapa de desarrollo del cuerpo de fructificación. La digestibilidad proteica de los champiñones y setas en general es bastante buena. Estos valores son comparables con los de las leguminosas (70-80%) pero son inferiores a los de la proteína animal que tienen una digestibilidad de más del 90%. El champiñón, a diferencia de las hortalizas, contiene todos los aminoácidos esenciales. La composición en aminoácidos de las proteínas de los hongos es comparable a la proteína animal lo cual es importante hoy en día para contrarrestar un alto consumo de alimentos proteicos de origen animal, sobre todo en los países desarrollados.

- **Lípidos:**

Los hongos son, en general, bajos en grasa (menos del 5% en peso seco). Los factores ambientales afectan al contenido de lípidos en las setas dependiendo su concentración de las condiciones de crecimiento como pueden ser factores nutricionales, oxígeno, temperatura y la naturaleza del sustrato. El contenido en ácidos grasos insaturados es predominante en los hongos y, por lo tanto, está en mayor cantidad que los saturados. El ácido linoleico es el que está presente en mayor proporción en los hongos.

Además de la importancia nutricional del ácido linoleico se debe resaltar también su función precursora de los compuestos volátiles en los hongos, tales como 1-octen-3-ol, 3-octanol, 1-octen-3-ona y 3-octanona, que son los principales compuestos aromáticos en la mayoría de las especies. Estos compuestos contribuyen también al flavor de la mayoría de las especies de hongos analizados.

- **Fibra**

Se considera fibra dietética a los polímeros procedentes de plantas que están formados por 10 o más monosacáridos que no pueden ser hidrolizados endógenamente por las enzimas digestivas y que ejercen un efecto fisiológico potencialmente beneficioso para la salud. La fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos y lignina. El consumo de fibra dietética y sus componentes promueve el mantenimiento de la salud y la prevención de ciertas enfermedades como diabetes, cáncer, enfermedad cardiovascular, hipercolesterolemia y obesidad.

Los hongos son una buena fuente de fibra dietética, contienen más cantidad de fibra insoluble (2,28–8,99 g/100 g porción comestible) que de soluble (0,32–2,20 g/100 g porción comestible). Los polisacáridos que se encuentran en mayor proporción en la fibra del champiñón son los β -glucanos (4-13% de la fibra dietética total) seguidos de la quitina. Al igual que ocurre con otros nutrientes, el contenido de fibra variará dependiendo de la especie de seta, la morfología y las condiciones de cultivo, así como de la conservación y de los tratamientos culinarios a los que se vean sometidos estos productos. Al igual que ocurre con otros nutrientes, el contenido de fibra variará dependiendo de la especie de seta, la morfología y las condiciones de cultivo, así como de la conservación y de los tratamientos culinarios a los que se vean sometidos estos productos.

- **Minerales:**

Los minerales son elementos químicos imprescindibles para el normal funcionamiento metabólico de nuestro organismo. Los nutrientes minerales desempeñan funciones estructurales y/o metabólicas esenciales. La dieta debe aportarlos en cantidades suficientes, pero no excesivas, para cubrir sus requerimientos y en forma disponible para que las necesidades puedan ser satisfechas. Algunos se requieren en cantidades superiores a 100 mg por día (calcio, fósforo, sodio y potasio) y otros se necesitan en cantidades menores que son los llamados oligoelementos (hierro, flúor, yodo, cobre, cinc, selenio, etc.). El contenido de minerales en los hongos varía entre 6 y 11% sobre materia seca según la especie. Comparado con otros vegetales, los hongos contienen una cantidad razonable de minerales.

Los macroelementos que más abundan en los hongos cultivados son calcio, fósforo, potasio y magnesio y de los microelementos destacan cobre, selenio, hierro y cinc. Los que aparecen en mayor cantidad son selenio, potasio y fósforo.

En cuanto al contenido mineral de los hongos cabe destacar que la mayoría de las setas cultivadas y también algunas especies del género *Boletus* son ricas en selenio de forma natural.

- **Vitaminas**

Las vitaminas son compuestos orgánicos imprescindibles para la vida, que al ingerirlos de forma equilibrada y en dosis esenciales promueven el correcto funcionamiento fisiológico.

Los hongos se consideran una buena fuente de vitaminas, sobre todo de B2, B3 y folatos que son aquellas que contienen en mayor cantidad.

El contenido de varias vitaminas en hongos cultivados, la concentración oscila entre 1,8 a 5,1 mg/100 g M.S para B2, de 31 a 65 mg/100 g M.S para B3 y 0,30 a 0,64 mg/100 g M.S para folatos.

El contenido en B2 en los hongos también supera la concentración presente en los vegetales, incluso, algunas variedades de *Agaricus bisporus* (champiñón) presentan concentraciones de riboflavina tan altas como las que se pueden encontrar en el huevo o el queso.

Las vitaminas B1, B12 y C también están presentes en los hongos, aunque en menor cantidad.

El contenido de vitamina B1 en hongos oscila aproximadamente entre 0,60 y 0,90 mg/100 g M.S. En el caso de la vitamina B12 la cantidad presente es mucho menor, entre 0,60 y 0,80 µg/100 g M.S, aun así, los hongos contienen más B12 que los vegetales ya que éstos apenas contienen esta vitamina, convirtiéndolos en una optativa para aquellos que siguen una dieta vegetariana.

En cuanto a la vitamina D, los hongos son el único alimento no animal que contienen esta vitamina (en forma de precursor) y, por lo tanto, son una fuente natural de vitamina D también interesante para los vegetarianos. El contenido de vitamina D2 (ergocalciferol),

una de las formas de la vitamina D, está presente en mayor cantidad en especies de hongos silvestres que en las especies cultivadas. Los niveles de ergosterol, son relativamente altos (400 a 600 mg/100 M.S). La presencia de la vitamina D en los hongos se atribuye a la exposición de la luz solar, que cataliza la conversión de ergosterol en los hongos a la vitamina D₂ a través de una serie de reacciones fotoquímicas.

2.6. COMPUESTOS BIOACTIVOS

Tradicionalmente las investigaciones científicas se han centrado en las propiedades nutricionales de los hongos. En la última década, además de estudiar la composición nutricional de los hongos, está cobrando más importancia el estudio de los compuestos biológicamente activos que poseen y de los que se ha comprobado que tienen importantes propiedades beneficiosas para la salud.

Se han identificado numerosos compuestos bioactivos en los hongos. La concentración de éstos dependerá de la variedad, el sustrato, el cultivo, condiciones de almacenamiento y procesamiento, etc. (Barros y cols., 2007b). Entre los compuestos bioactivos se encuentran polisacáridos, proteínas, compuestos fenólicos (flavonoides, lignanos y ácidos fenólicos), ligninas, triterpenos, etc. Estos compuestos son los responsables de las propiedades medicinales que tienen los hongos.

1. Polisacáridos

Entre los compuestos bioactivos de los hongos, los polisacáridos son los que presentan mayor actividad antitumoral, antiviral e inmunomoduladora.

Sobre todo, son los polisacáridos que se encuentran en la pared celular los que presentan mayor bioactividad. Estos polisacáridos son: quitina, celulosa, β -glucanos y complejos polisacáridos-proteína. Estos polisacáridos biológicamente activos se pueden encontrar en los cuerpos de fructificación, en el micelio cultivado e incluso ser extraídos del medio donde se cultivan. Existen numerosos estudios, tanto in vivo como in vitro, en los que se han aislado β -glucanos y complejos polisacáridos-proteína de diferentes hongos y se ha demostrado que éstos tienen importantes propiedades biológicas como agentes inmunomoduladores, antitumorales, hipoglicémicos y antioxidantes.

A continuación, se destacan algunos de los polisacáridos más conocidos presentes en los hongos y a los que se les atribuyen numerosas propiedades medicinales:

β -glucanos:

- Pleuran

Es un polisacárido tipo β -glucano que se encuentra en las especies de hongos que componen el género *Pleurotus*. Este polisacárido tiene una significativa actividad anticarcinogénica y estimulante de la inmunidad (Bobovčák y cols, 2010)

- Lentinan

Polisacárido del hongo *Lentinula edodes* (shiitake).

Lentinan y Pleuran son los dos β -glucanos más utilizados por la industria farmacéutica ya que parecen ser los que tienen mayor actividad biológica. Lentinan destaca principalmente por su actividad antitumoral e inmunomoduladora. También actividad antitumoral. (Sia GM y cols, 1999)

- Ganopoly

Este polisacárido se ha aislado de *Ganoderma lucidum*. Se ha demostrado su eficacia clínica en las terapias anticancerígenas porque mejora los síntomas procedentes de esta enfermedad. (GaoY y cols, 2003)

- Grifolan

Es un β -glucano extraído del hongo *Grifola frondosa*. (Suzuki I y cols, 1987)

Este compuesto posee importantes propiedades medicinales, entre ellas la de promover la actividad de los macrófagos e incrementar la producción de la interleuquina IL-1 mejorando la respuesta inmune. Además, este polisacárido tiene también actividad anticancerígena porque es capaz de restaurar la inmunidad celular. Se ha demostrado que el polisacárido Grifolan es capaz de incrementar la producción de insulina. (Manohar y cols., 2002).

Complejo polisacárido-proteína

Los complejos polisacárido-proteína de los hongos incrementan la respuesta inmune, tanto la innata como la celular, y muestran también actividad antitumoral en animales y en humanos. Junto a los complejos polisacáridos-proteína, las glicoproteínas y los complejos polisacáridos-péptidos ejercen también una actividad antitumoral e inmunomoduladora importante.

En el micelio de *Lentinula edodes* se ha encontrado un complejo polisacárido-proteína llamado LEM. Son glicoproteínas con actividad inmunoestimulante. (Rop y cols., 2009). En *Ganoderma lucidum* aparece un complejo polisacárido-péptido (GPP) con estas propiedades inmunomoduladoras.

2. Compuestos de bajo peso molecular

Los triterpenos representan uno de los grupos más importantes de compuestos bioactivos que se encuentran en los hongos medicinales. *Ganoderma lucidum* es un buen ejemplo ya que tiene más de 120 triterpenos diferentes. Varios triterpenos de *G. lucidum* son agentes antivirales activos contra el VIH tipo I y contra el virus del herpes tipo I.

Los compuestos fenólicos son también compuestos bioactivos de los hongos, se caracterizan por su alta capacidad antioxidante para inhibir la oxidación de lípidos. Además de los compuestos fenólicos, los hongos poseen otros compuestos con actividad antioxidante como β -tocoferol y β -caroteno.

3. Compuestos de alto peso molecular

Entre los compuestos de alto peso molecular destacan las lectinas. Las lectinas son proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad. Las lectinas derivadas de los hongos se caracterizan por sus actividades: inmunomoduladora, antiproliferativa y antitumoral. También tienen una actividad hipoglucémica.

2.8 *SARCODON IMBRICATUS*

En el presente estudio se ha llevado a cabo una investigación sobre el *Sarcodon imbricatus*, del cual podemos dejar la siguiente descripción tomada del libro Setas en Valladolid, escrito por D. Aurelio García Blanco:

- **Carpóforo:** carnosos hasta de 30 cm de diámetro, al principio convexos con el borde enrollado, después aplanados y en la madurez umbilicados y con el borde lobulado. De color gris pardo, marrón o pardo oscuro.
- **Cutícula:** al principio algo flocosa, luego escamosa con placas concéntricas características, anchas y más oscuras que el resto.
- **Himenóforo:** Hydnoide, con agujones decurrentes, de hasta 15 mm de longitud, de color blanco ceniza, muy quebradizos al roce.
- **Pie:** de 3-12 x 0,5-3 cm, glabro cilíndrico, de color pardo gris o marrón, con reflejos violetas, atenuado en la base.
- **Carne:** blanca y gris pardo, firme, tenaz. Olor y sabor a madera de cedro.
- **Esporas:** su globosas angulosas, nodulosas, de 7-9 x 5-6 μm , ocráceas, parcialmente gutuladas, no amiloides. Esporada marrón claro.
- **Hábitat:** fructifica exclusivamente en bosques de coníferas. Época de fructificación otoño tardío. Muy frecuente.
- **Comestibilidad:** comestible mediocre, aunque en países centroeuropeos es muy apreciada. Es conveniente quitar las agujas y el agua de la cocción para eliminar y suavizar el sabor a madera de cedro.
- **Observaciones:** el aspecto del sombrero con sus típicas escamas y el himenio con agujones, lo hacen inconfundible.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los hongos son un alimento nutricionalmente funcional y una fuente de medicamentos fisiológicamente beneficiosos. Tanto el cuerpo de fructificación como el micelio contienen compuestos con una amplia actividad funcional. Los hongos son fuentes ricas de antibióticos naturales; en estos, los glucanos de la pared celular son bien conocidos por sus propiedades inmunomoduladoras, y muchos de los metabolitos secundarios combaten las bacterias y los virus. Además, los exudados de los micelios de los hongos son activos contra los protozoos y otros microorganismos.

Los compuestos fenólicos han atraído mucho interés recientemente debido a que los estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que tienen una variedad de propiedades biológicas beneficiosas, que pueden desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la salud humana.

La mayor prevalencia de enfermedades infecciosas se está convirtiendo en un problema mundial, y el problema de resistencia exige que se haga un esfuerzo renovado para buscar agentes antimicrobianos eficaces contra microorganismos patógenos resistentes al tratamiento actual. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos productos con propiedades antimicrobianas es una base de investigación muy activa, y aquí sugerimos los recursos naturales para los que se proponen.

Además, los hongos deberían ser un alimento clave de la dieta, por su bajo contenido calórico y lípidos, alto contenido en hidratos de carbono beneficiosos como los β -glucanos y por el aporte de gran cantidad de proteínas de alta calidad.

En el siguiente estudio haremos un análisis del *S. imbricatus*, un hongo comestible de alta calidad gastronómica y nutritiva, poco conocido y poco consumido en nuestro país, pero con una alta calidad proteica y con propiedades funcionales muy interesantes. Este hongo puede ser consumido usando diferentes técnicas culinarias como puede ser el salteado.

En la actualidad existen muy pocas investigaciones sobre *S. imbricatus* al igual que la mayoría del reino Fungi, ya que se trata de un territorio novedoso e inexplorado, con muchas posibilidades. Por todo ello se ha abordado el estudio proteómico de la seta y los efectos de la digestión con fluidos gástrico e intestinal simulados, así como los efectos de la cocción sobre las proteínas.

En primer lugar, se ha realizado una búsqueda en la base de datos Pubmed de los trabajos sobre setas y sobre esta seta en particular. Se han seleccionado todos los trabajos aparecidos desglosando los correspondientes a los últimos 10 y 5 años.

PALABRAS DE BÚSQUEDA	REVIEW			TRABAJOS		
	AÑOS	TOTAL	10	5	TOTAL	10
Mushrooms	618	367	237	11.796	6575	3616
Mushrooms chemical composition	300	206	115	6326	4126	2261
Mushrooms medicinal	136	112	65	1153	1000	648
<i>Sarcodon imbricatus</i>	0	0	0	8	6	5
<i>Sarcodon imbricatus</i> medicinal	0	0	0	2	2	2
<i>Sarcodon imbricatus</i> proteins	0	0	0	2	1	1

Tabla 1. Trabajos en PubMed

OBJETIVOS:

Los objetivos por los cuales se ha llevado a cabo este trabajo son los siguientes:

- ✓ Revisar la composición nutricional y las propiedades medicinales más relevantes de los hongos comestibles, como alimento importante de la dieta.
- ✓ Estudiar el perfil y cantidad de proteínas del hongo comestible *Sarcodon imbricatus* utilizando dos procedimientos distintos para concentrar las proteínas de las muestras.
- ✓ Estudiar la digestibilidad del hongo tanto gástrica como intestinal.
- ✓ Estudiar los efectos de la cocción sobre la digestibilidad.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales biológicos:

La seta *Sarcodon imbricatus* fue facilitada por D. Aurelio Garcia Blanco al profesor Tomás Girbés tras una exposición local organizada por la Asociación Vallisoletana de Micología. Todas las muestras fueron congeladas en congelador a -24° grados y descongeladas justo antes de su uso.



Figura 2. Muestras de *S. imbricatus*. Foto originales realizadas en la exposición por el profesor T. Girbés.

Para realizar este trabajo se ha utilizado, además, equipo instrumental de investigación, así como diferentes productos químicos y reactivos, así como distintos materiales de laboratorio que se pueden encontrar en el Anexo I.

MÉTODOS:

En esta investigación no se han estudiado el pie y el sombrero de *S. imbricatus* por separado debido a las conclusiones obtenidas previamente en el laboratorio del Prof. Girbés (Román 2013) en donde se describió que no hay defirencias relevantes entre el pie y el sombrero.

El estudio se ha realizado con seta cruda y con seta concinada mediante un salteado suave. El salteado se ha realizado con fragmento sde seta completa de aproximadamente Se ha realizado el proceso en dos condiciones, por un lado el hongo congelado tal y como lo encontramos en la naturaleza, y por otro, el hongo cocinado simulando un proceso de salteado, que es una de las formas más habituales de consumirlo, cocinando en una sartén partes de *Sarcodon imbricatus* de 2 cm (largo) x 2 cm (ancho) x 3 mm (alto) durante 90 segundos a fuego medio-alto por cada lado, para simular la situación real.

Elaboración de los extractos de los hongos

Para elaboración de los extractos se pesan 10 g de muestra cruda o cocinada y se añaden 40 ml de tampón de extracción (*Anexo II*). Se tritura la mezcla en un mortero rodeado de hielo picado para retardar en lo posible el ennegrecimiento de la seta por pardeamiento enzimático, para posteriormente acabar la trituración con un disgregador MICRA D-9/RT de alta velocidad

La pasta resultante se centrifuga en tubos de 50 ml a 3.500 rpm a 4°C durante 30 minutos. Tras la centrifugación, la mezcla se separa en una fase líquida (sobrenadante) y otra fase sólida llamada sedimento. Se recoge el sobrenadante, del que extraemos una alícuotas para realizar el biuret del extracto de la seta y el resto se almacena congelado a -24°C para posteriormente ser dializado.

Método del biuret

El método de biuret es un procedimiento empleado en la cuantificación de proteínas totales en una solución. Se fundamenta en una reacción coloreada producida por la formación de un complejo, de color púrpura, entre el reactivo de biuret y una solución alcalina de sulfato de cobre.

Los peptidos y las proteínas reaccionan con el reactivo de biuret mientras que el ión cúprico forma un complejo de coordinación con los pares de electrones no compartidos del nitrógeno presente en los aminoácidos de las proteínas. La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta. El Potasio proporciona el medio alcalino necesario para que se lleve a cabo la reacción. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos). Esta intensidad de color se mide mediante espectroscopia ultravioleta-visible a una longitud de onda de 540 nm. (Guarnizo Franco y Martínez Yepes, 2009)

Para llevar a cabo el método se prepararon las soluciones descritas en el *Anexo IV*.

El porcentaje de proteínas se cuantificó empleando la recta de calibrado realizada con el patrón de BSA 10 mg/ml.

Preparación de las bolsas de diálisis y diálisis de los extractos:

La preparación de las bolsas de diálisis para eliminar en los posible pigmentos y material no proteínico, así como sales y material de bajo peso molecular. Se utilizaron diferentes membranas de una longitud aprox. 50cm y diámetro 14,3mm, elegido en función de la cantidad de extracto a dializar. Antes de utilizar las membranas se lavan con agua Elix-Millipore. Se anuda uno de los extremos de la tripa mientras que por el otro introducimos el extracto, y se cierra. Una vez con la bolsa cerrada se deja en un depósito de 5 L con agua Elix-Millipore a 4°C en agitación constante. Se realizan 4 cambios de agua con un mínimo de 4 horas entre cada cambio. Posteriormente se seca la bolsas con un papel de filtro y se vacía cortando uno de sus extremos. El extracto dializado se almacena en microtubos de 1.5 ml, guardados a -24°C hasta su uso.

Digestión *in vitro* con fluido gástrico simulado:

Para la digestión gástrica preparamos en microtubos de 2ml las cantidades de la Tabla. Añadiendo muestra de SI natural dializado, cocinado dializado, BSA y Pepsina. Que se usarán como referencia en la electroforesis final para ver la degradación de proteína.

La pepsina se mantiene en baño de hielo hasta justo el momento antes de su uso, ya que puede autodegradarse. La pepsina actúa a pH ácido (aprox. 1,2) por esta razón se añade en último lugar.

	Muestra	BSA	Pepsina
Muestra / BSA	800µl	50µl	-
NaCl 2M (pH 1.15 – 68:4 ml HCl 6M)	18µl	18µl	18µl
Elix	362µl	1112µl	1162µl
Pepsina	20µl	20µl	20µl
V _{total} (mezcla+ 1µl HCl 6M para llevar el pH a aprox. 1.2; confirmar pH con tiras de pH)	1200µl	1200µl	1200µl

Tabla 2. Solución fluido gástrico simulado

Introducimos los microtubos con las soluciones en el baño de digestión durante 30 min a 37°C y 70 rpm.

Digestión in vitro secuencial con fluido gástrico y fluido intestinal simulados:

Tras someter las muestras a digestión gástrica (30 min) procedemos a la realización de la digestión intestinal del contenido resultante. Para ello, realizamos una solución de KH_2PO_4 0.5M y pancreatina 13mg/ml (que se añadirán al volumen total gástrico (1200 μ l + 100 μ l de ésta), produciendo un volumen total final para la digestión intestinal de 1300 μ l).

Posterior añadimos NaOH 1mM necesario para neutralizar el pH de la digestión gástrica y llevarlo de pH \approx 1.2, a pH \approx 7.5. Para neutralizar la digestión gástrica utilizamos \approx 3 μ l de NaOH 1mM. Una vez añadidos los 100 μ l de la solución tampón de pancreatina y neutralizar la mezcla llevamos a cabo la segunda digestión a 37°C, 70rpm durante 60 min.

Precipitación con Ácido tricloroacético (TCA) y lavados con acetona

Es un proceso que se realiza para concentrar las proteínas de la muestra por precipitación y resuspensión en un volumen menos que el inicial. El procedimiento es el que sigue: Se añade a la muestra $\frac{1}{4}$ de volumen de 50% TCA (ácido tricloroacético) frío y mantener la mezcla en baño de hielo-agua (hielo picado) durante 30 minutos para permitir la precipitación de las proteínas. Después se centrifuga la mezcla a 11.000rpm durante 15 minutos en la MICROCENTRÍFUGA "SPECTRAFUGE 24D". Se desecha el sobrenadante eliminando al máximo el TCA. Lavar el sedimento con acetona fría y centrifugar de nuevo a 11.000 rpm durante 15 minutos, repitiendo el proceso de lavado y secado tres veces para eliminar el ácido.

La muestra así obtenida se utiliza para la electroforesis, añadiendo al sedimento de proteína 36 μ l de Elix y 12 μ l de "sample buffer" (SB).

Ultrafiltración:

Ultrafiltración es un método alternativo al de precipitación con TCA y sirve también para la concentración de proteínas. Se utilizaron filtros Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters. Se partió de muestras de 500 μ l y se siguió el procedimiento indicado por el fabricante. La centrifugación se realizó a 11.000 rpm durante 20 min. La recuperación fue alrededor de 55 μ l.

Preparación de muestras para electroforesis

Para preparar las muestras de electroforesis se añaden 6 μ l de SB por cada 18 μ l de muestra. Para mantener una concentración constante de proteína en las muestras y poder comparar las bandas en la electroforesis, estas cantidades varían en función de la cantidad de extracto concentrado que se haya obtenido en la ultrafiltración según los siguientes valores:

- *Sarcodon imbricatus* (54 μ l) → 17.50 μ l + 5.50 μ l Sample Buffer.
- *Sarcodon imbricatus* DG (55 μ l) → 18.00 μ l + 6.00 μ l Sample Buffer.
- *Sarcodon imbricatus* DI (54 μ l) → 17.50 μ l + 5.50 μ l Sample Buffer.
- *Sarcodon imbricatus* CO (57 μ l) → 18.50 μ l + 6.00 μ l Sample Buffer.
- *Sarcodon imbricatus* CODG (65 μ l) → 21.00 μ l + 7.00 μ l Sample Buffer.
- *Sarcodon imbricatus* CODI (58 μ l) → 19.00 μ l + 6.50 μ l Sample Buffer.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una de las técnicas más utilizadas para separar proteínas. Los geles son sumergidos en tampón TRIS (Running buffer; RB) con dodecil sulfato sódico (SDS) que se fija a las proteínas y les confiere carga total negativa por lo que se mueven al polo positivo (ánodo). La electroforesis en presencia de SDS permite separar las moléculas cargadas, en función de su tamaño y forma. Así, las proteínas migrarán de distinta forma por el gel, y la distancia recorrida por cada fragmento será inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular.

Para que sea posible el cálculo posterior del peso molecular de las muestras, en uno de los pocillos se coloca una solución con marcadores de peso molecular conocido (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de Bio-Rad®) que sirven de referencia.

En primer lugar, se preparan las soluciones de tampón TRIS (Running buffer) y solución fijadora de tinte (QC Colloidal Coomassie Stain Bio-Rad®). A continuación, se coloca el gel preformado en la cubeta y se añaden las muestras en los pocillos. Posteriormente se procede al desarrollo de la electroforesis a 200 voltios durante aproximadamente 30 minutos, tiempo requerido para que el colorante llegue al borde inferior del gel. Por último, se extrae el gel, se introduce primero 5 minutos en agua con agitación, después 15 minutos en la solución fijadora, y se concluye con la tinción durante una noche en agitación.

5. RESULTADOS

Determinación de la concentración de proteínas de *Sarcodon imbricatus* por el método biuret.

El procedimiento en este trabajo empleado para determinar el contenido de proteínas fue el método biuret descrito anteriormente.

En primer lugar, se realiza la curva de calibrado con una disolución de BSA 10 mg/ml y posteriormente se efectuó el ensayo de las muestras, obteniendo los resultados de la cantidad de proteína presentados en la siguiente tabla:

Natural	Natural Dializado	D. Gástrica	D. Intestinal	Cocinado	Cocinado Dializado	Cocinado D. Gástrica	Cocinado D. Intestinal
5,95 %	1,12 %	0,89 %	2,66 %	6,07 %*	1,10 %	1,00 %	1,63 %

Tabla 3. Cantidad de proteína para los diferentes extractos de *S. imbricatus* según el método biuret. El porcentaje indica gramos por 100 de seta húmeda. *El color se ve afectado por el ennegrecimiento debido a reacción de Maillard.

Si observamos la cantidad de proteína nos damos cuenta que el valor más alto se encuentra en el extracto de *S. imbricatus* cocinado. Esto no es real sucede debido al ennegrecimiento provocado por la reacción de Maillard producida en el proceso de cocción.

También apreciamos una cantidad alta de proteína en el *S. imbricatus* cruda. Esto se debe a que aún no se han eliminado los polímeros presentes en el extracto por el proceso de diálisis lo que conlleva una medición sobreestimada.

Lo que sí que podemos observar con certeza es que en la digestión gástrica disminuyen las proteínas comparándolo con la seta no digerida, ya sea cruda o cocinada. Sin embargo, se aprecian valores más altos en la digestión secuencial. Esto es debido a las enzimas de digestión intestinal que se añaden, en concreto pancreatina, que es un extracto pancreático que contiene diversas enzimas.

Determinación del perfil proteico de *Sarcodon imbricatus* por electroforesis.

Se ha llevado a cabo la electroforesis de *S. imbricatus*; por un lado cruda, y por otro lado cocinada, en ambos casos se han comparado las proteínas con el proceso de digestión gástrica y secuencial intestinal. Para realizar las electroforesis se ha utilizado un gel de poliacrilamida del 12% en presencia de SDS y se han seguido los pasos explicados en el *Anexo V*. El peso molecular de las proteínas más relevantes se ha calculado de acuerdo a los pesos de los patrones de peso molecular utilizados como referencia.

La concentración de proteínas del extracto mediante el método de la precipitación de proteínas con TCA provoca la precipitación de material complejo, fundamentalmente proteínas y polisacáridos que dado el tamaño parte se retiene en los pocillos y parte entra en el gel quedándose en la parte alta entre 500 kD y 115 kD.

Las bandas en esta zona son muy probablemente compuestas por más de una proteína. Las proteínas mayoritarias son las de 45 kD, 43 kD, 30 kD, 11 kD y 12 kD.

La digestión con fluido gástrico simulado degrada parcialmente las proteínas entre 45 kD y 30 kD, degrada totalmente la de 23 kD y de nuevo la de 11 kD resulta poco afectada.

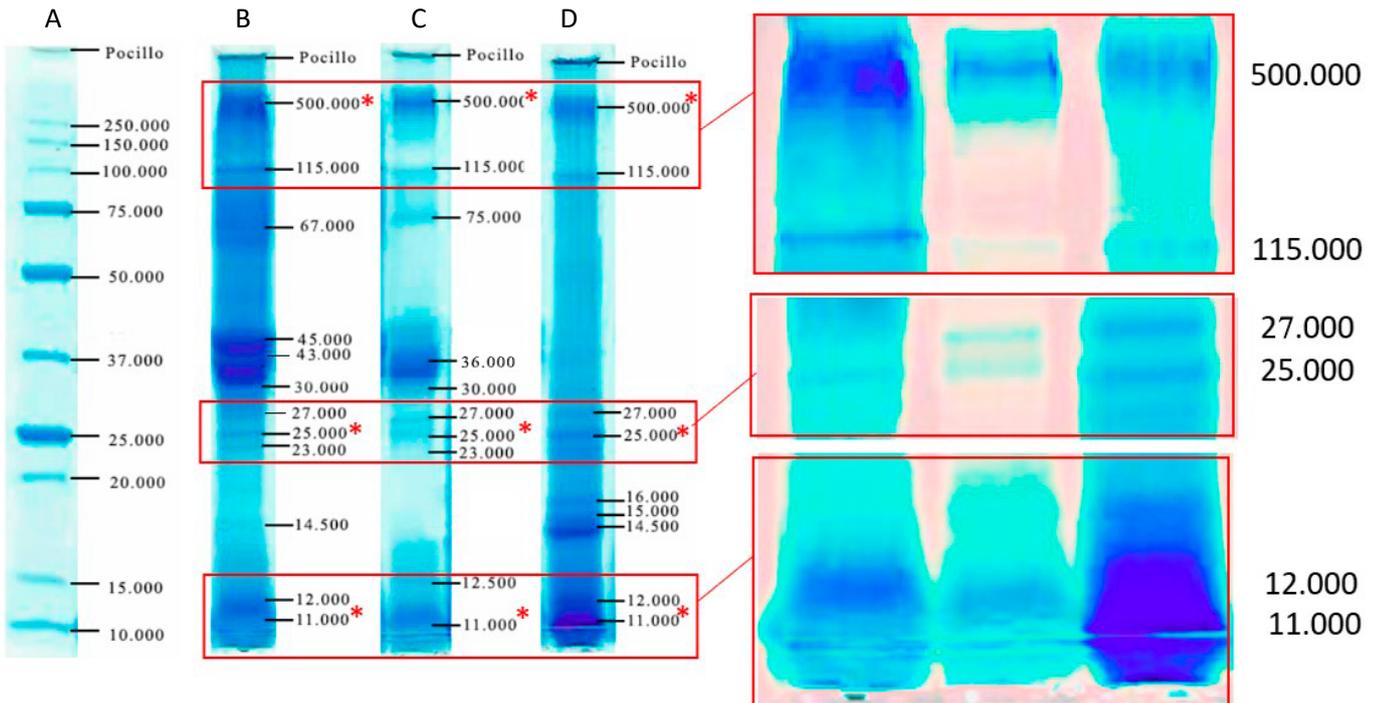


Figura 3. Electroforesis de SS-PAGE de la seta *S. imbricatus* cruda. Los extractos se obtuvieron como se indica en métodos y las proteínas se concentraron mediante precipitación con TCA 12,5% en frío. A: Patrones de peso molecular; B: extracto crudo; C: Extracto sometido a digestión con fluido gástrico simulado; D: Digestión secuencial con fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado. Las condiciones de digestión son las indicadas en materiales y métodos. Los insertos a la derecha son ampliaciones de las zonas encuadradas en rojo. Los asteriscos indican proteínas mayoritarias y proteínas que resisten a la digestión.

El cocinado promueve la degradación de la mayor parte de las proteínas de la seta no digerida excepto el de las proteínas de 43 kD, 12 kD y 11 kD.

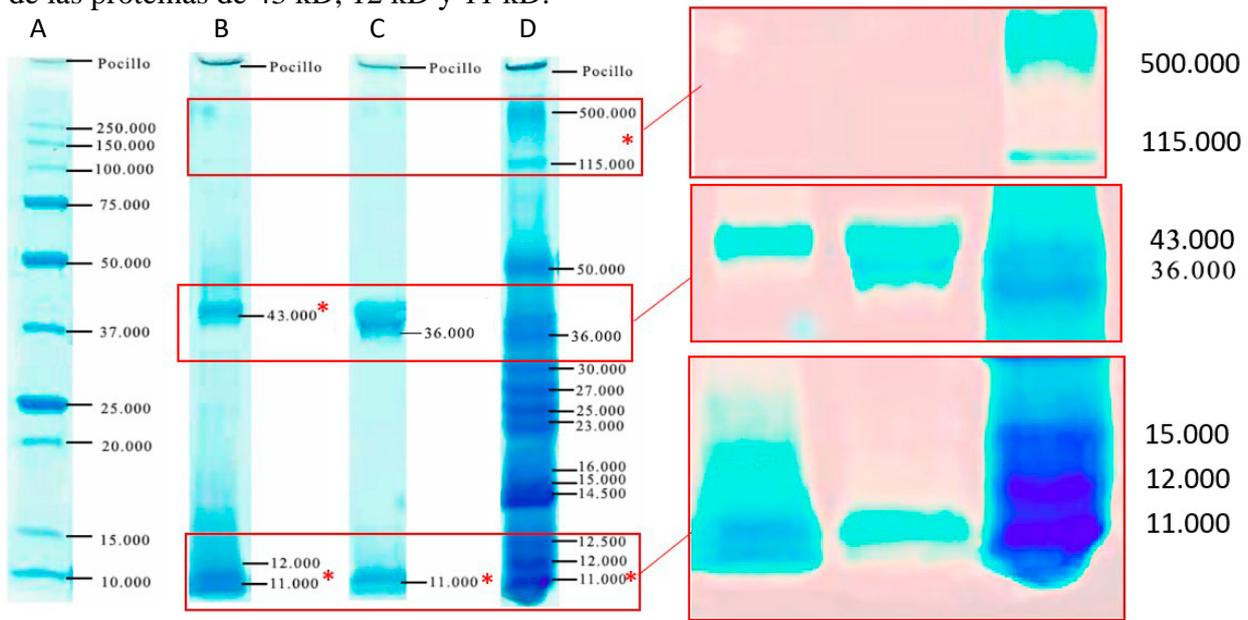


Figura 4. Electroforesis de SS-PAGE de la seta *S. imbricatus* cocinado por salteado suave. Los extractos se obtuvieron como se indica en métodos y las proteínas se concentraron mediante precipitación con TCA 12,5% en frío. A: Patrones de peso molecular; B: extracto cocinado por salteado suave; C: Extracto sometido a digestión con fluido gástrico simulado; D: Digestión secuencial con fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado. Las condiciones de digestión son las indicadas en materiales y métodos. Los insertos a la derecha son ampliaciones de las zonas encuadradas en rojo. Los asteriscos indican proteínas mayoritarias y proteínas que resisten a la digestión.

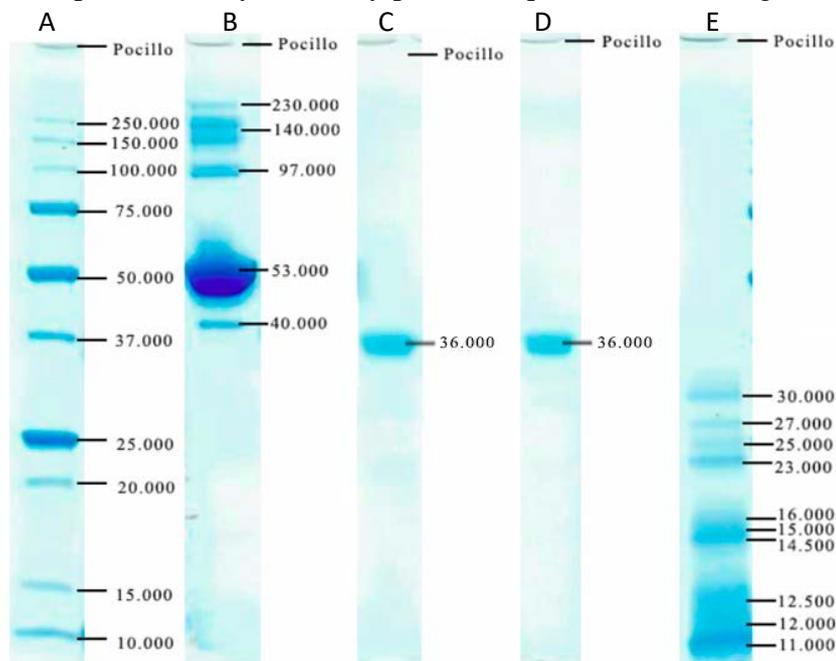


Figura 5. Electroforesis de SS-PAGE albúmina sérica bovina (BSA) como control de digestión con fluido gástrico simulado. La BSA se trató exactamente igual que los extractos. A: Patrones de peso molecular; B: BSA crudo; C: BSA sometido a digestión con fluido gástrico simulado; D: control de pepsina; E: control de pancreatina. Las condiciones de digestión son las indicadas en materiales y métodos. Los insertos a la derecha son ampliaciones de las zonas encuadradas en rojo. Los asteriscos indican proteínas mayoritarias y proteínas que resisten a la digestión.

Como se aprecia en la figura, la seta *S. imbricatus* presenta distintas proteínas en el rango 100kD - 10kD. Algunas de ellas son mayoritarias como las de 45kD, 33kD, 30 kD, 17kD, 14 kD, 12.5 kD y 11 kD.

La digestión con fluido gástrico simulado promueve la hidrólisis completa de la mayor parte de proteínas excepto las proteínas de 30 kD, 25 kD que se degradan parcialmente y la de 11 kD que parece ser afectada en mucha menor extensión.

La digestión secuencial degrada la proteína 30 kD, pero no afecta la de 25 kD y la de 11kD.

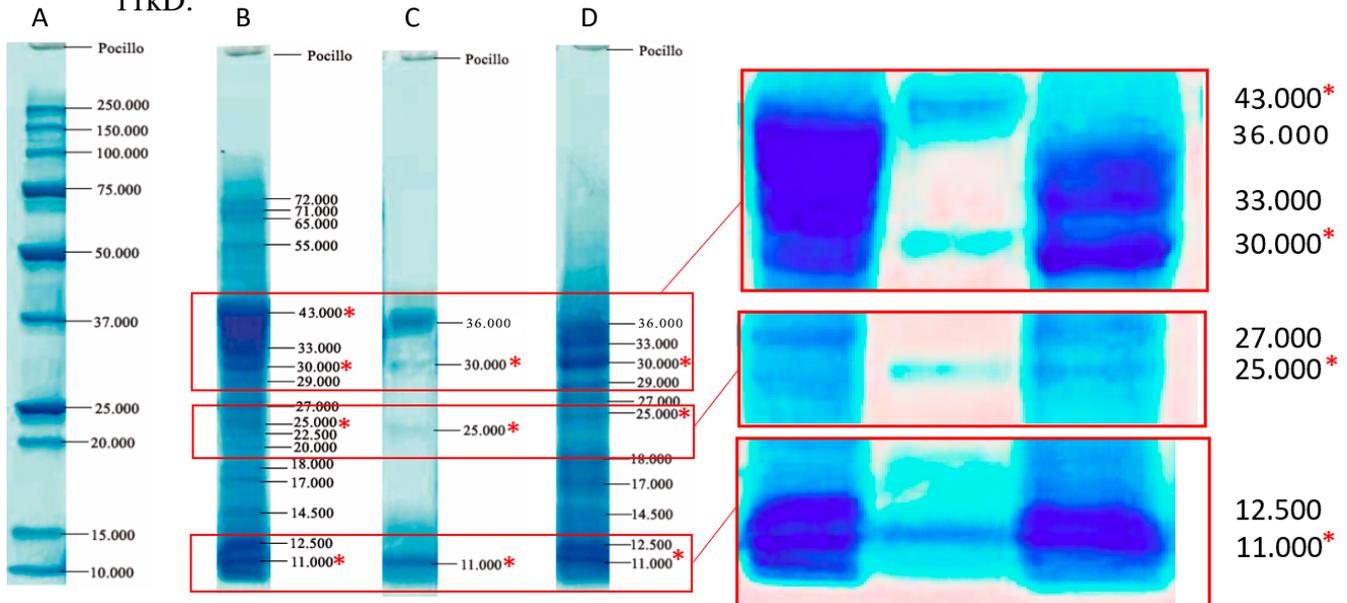


Figura 6. Electroforesis de SS-PAGE de la seta *S. imbricatus* cruda. Los extractos se obtuvieron como se indica en métodos y las proteínas se concentraron mediante ultrafiltración con filtros de corte en 3kD. A: Patrones de peso molecular; B: extracto crudo; C: Extracto sometido a digestión con fluido gástrico simulado; D: Digestión secuencial con fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado. Las condiciones de digestión son las indicadas en materiales y métodos. Los insertos a la derecha son ampliaciones de las zonas encuadradas en rojo. Los asteriscos indican proteínas mayoritarias y proteínas que resisten a la digestión.

El cocinado degrada fuertemente las proteínas de la seta, excepto algunas proteínas de bajo peso molecular entre 18 kD y 11kD, lo que indica que estas proteínas son termorresistentes en nuestras condiciones.

La digestión con fluido gástrico simulado afecta a la proteína de 43000 que se degrada rindiendo tres polipéptidos más pequeños de 33 kD, 30 kD y 25 kD.

La proteína de 11 kD de nuevo resiste la digestión con pepsina. En la digestión secuencial no se puede concluir nada a debida cuenta de que el perfil de pancreatina enmascara las bandas de la digestión.

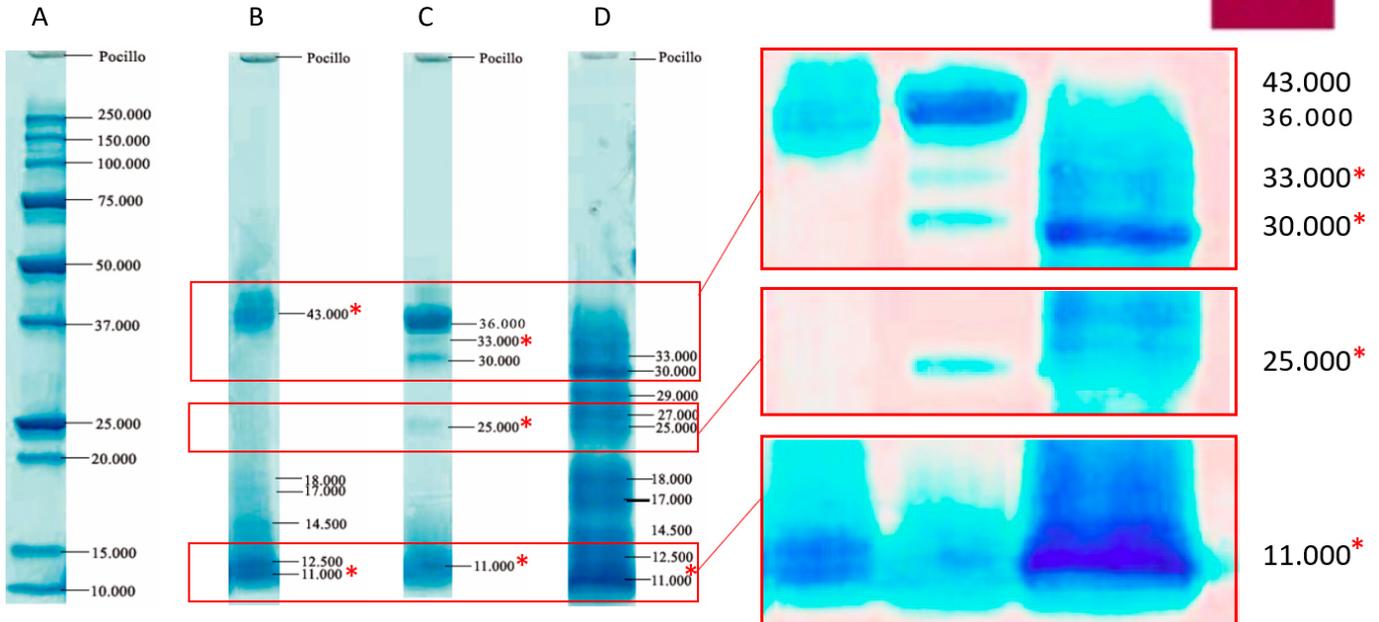


Figura 7. Electroforesis de SS-PAGE de la seta *S. imbricatus* cocinada por salteado suave. Los extractos se obtuvieron como se indica en métodos y las proteínas se concentraron mediante ultrafiltración con filtros de corte en 3kD. A: Patrones de peso molecular; B: extracto crudo; C: Extracto sometido a digestión con fluido gástrico simulado; D: Digestión secuencial con fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado. Las condiciones de digestión son las indicadas en materiales y métodos. Los insertos a la derecha son ampliaciones de las zonas encuadradas en rojo. Los asteriscos indican proteínas mayoritarias y proteínas que resisten a la digestión.

Los controles de digestión BSA son muy parecidos a la seta no cocinada

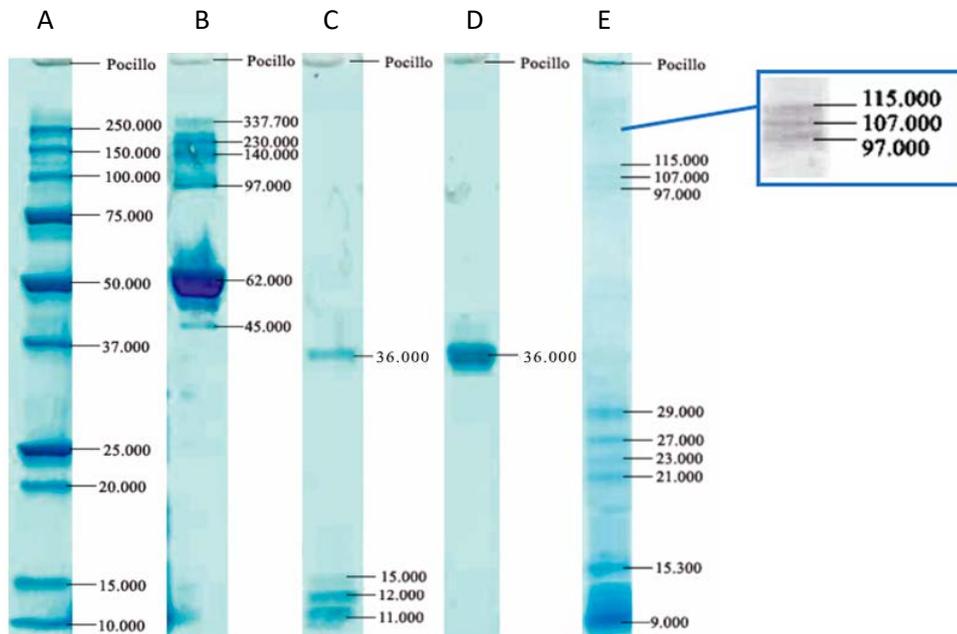


Figura 8. Electroforesis de SS-PAGE albúmina sérica bovina (BSA) como control de digestión con fluido gástrico simulado. La BSA se trató exactamente igual que los extractos. A: Patrones de peso molecular; B: BSA crudo; C: BSA sometido a digestión con fluido gástrico simulado; D: control de pepsina; E: control de pancreatina. Las condiciones de digestión son las indicadas en materiales y métodos. Los insertos a la derecha son ampliaciones de las zonas encuadradas en rojo. Los asteriscos indican proteínas mayoritarias y proteínas que resisten a la digestión.

6. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta la bibliografía disponible, el presente trabajo describe por primera vez el perfil proteico de la seta *S. imbricatus* así como los efectos del cocinado y de las digestiones gástrica e intestinal *in vitro*.

Ferreira y cols. (2007) estudiaron el efecto del salteado sobre la cantidad total de proteína cruda de esta seta y encontraron una reducción del 50% en el contenido. Dado que la proteína estudiada por el grupo de Ferreira (Barros y cols, 2007) fue estimada mediante el procedimiento de Kjeldahl, que mide el nitrógeno total, es muy probable que la cantidad de proteínas sea menor a debida cuenta de que el factor de conversión utilizado es mayor que el aceptado en estudios con gran número de setas. (Bauer, 2001)

Nuestros resultados indican la presencia en la seta de unas proteínas mayoritarias de peso molecular intermedio de 43kD - 30 kD, 25 kD, 12kD y 11kD.

Los trabajos que existen sobre la composición en proteínas particulares de los hongos se han realizado por lo general utilizando micelios de los hongos. Solamente hemos encontrado un trabajo que contenga perfiles proteínicos de setas y ello a efectos comparativos. (Jeurink y cols, 2008)

Existen trabajos sobre proteómica de setas en donde se estudia en profundidad el procedimiento de asilamiento y concentración de proteínas mediante precipitación de TCA que obtienen resultados muy similares a los nuestros, esto es que el procedimiento que utiliza TCA no elimina adecuadamente los polisacáridos, incluso los precipita en forma de complejos glucoprotéicos de alto peso molecular (por ejemplo, la banda de 500 kD). (Figura 3)

En el presente trabajo se ha utilizado el procedimiento de precipitación de proteínas con TCA y se ha comparado con un procedimiento de ultrafiltración con membrana de punto de corte en 3kD. Con este procedimiento conseguimos eliminar mucho material que precipita con TCA y nos permite obtener unas calles de electroforesis más limpias y con menos fondo.

Una desventaja que tiene este procedimiento es que las proteínas en el entorno de 3kD y las proteínas más pequeñas no quedan retenidas. Nuestros resultados incluyen un estudio comparado de los dos procedimientos.

El cocinado aplicado en nuestro caso es un salteado de muestras de seta de tamaño similar al utilizado en la práctica culinaria, de manera que las condiciones fuesen las más genéricas. En nuestras condiciones gran parte de proteínas se degradan y desaparecen del gel de electroforesis. Solo permanecen algunas proteínas termoestables. En este sentido nuestros resultados confirman los resultados del grupo de Ferreira analizando proteína cruda.

Se ha descrito en numerosos trabajos que no todas las proteínas presentan la misma sensibilidad a los enzimas proteolíticos de las fases gástrica e intestinal de la digestión. Es más, se acepta que las proteínas resistentes a pepsina pueden tener efectos alérgicos (Astwood y cols, 2007)

Nosotros abordamos la digestibilidad de las proteínas de *S. imbricatus* mediante la digestión in vitro utilizando fluidos simulados, tanto gástrico como intestinal.

Nuestros resultados indican que, si bien la digestión gástrica tanto en seta cruda como en seta cocinada elimina gran parte de proteínas, afecta parcialmente a otras y deja intactas proteínas de bajo peso molecular en rango 10kD – 12 kD.

Los datos de digestión secuencial, primero digestión gástrica y después digestión intestinal, dan indicios de que algunas proteínas resisten a la digestión (11 kD); los resultados no son concluyentes debido a la utilización de pancreatina para la digestión intestinal.

La pancreatina es un extracto pancreático crudo, de cerdo, que contiene una gran cantidad de pretilinas, muchas de ellas con actividad enzimática (proteasas, lipasas, fosfolipasas, DNAsas, RNAsas, glucosidasas, etc.)

Algunas de estas proteínas se encuentran en alta concentración y coinciden en peso molecular con algunas de las proteínas de la seta, en particular algunas proteínas que resisten la digestión.

Para poder determinar si los enzimas proteolíticos pancreáticos (fundamentalmente tripsina y quimotripsina) actúan sobre las proteínas termorresistentes habría que utilizar en el estudio enzimas purificados, lo que encarece notablemente el proceso.

Es conocido desde hace tiempo que los seres humanos presentan sensibilidades distintas a las setas consideradas como comestibles. La sensibilidad varía desde intolerancia parcial o total con afección gastrointestinal, hasta alergias de tipo alimentario.

Setas perfectamente comestibles pueden llegar a ocasionar efectos graves en personas sensibilizadas. Por ello es muy importante determinar la presencia de alérgenos en las setas que resistan los procesos culinarios habituales.

Las proteínas que resisten el proceso de digestión gástrica pueden ser proteínas alergénicas. En nuestro caso hay varias proteínas candidatas a ser alérgeno. No obstante, para poder determinar la alergenicidad no basta solo con analizar la digestibilidad, sino que hay que realizar estudios de tipo inmunológico.

Las proteínas termoestables y gastrorresistentes encontradas en este trabajo son de bajo peso molecular (11kD-15kD) estos pesos moleculares se encuentran dentro del rango FIPs (Fungal Immunomodulatory Proteins) (Hao Chi y cols, 1997).

Estas proteínas se caracterizan por una actividad mitogénica frente a células del bazo de ratón y linfocitos humanos de sangre periférica.

La proteína de 11 kD, termoestable y gastrorresistente encontrada en este trabajo podría ser una FIP. Para demostrarlo habría que secuenciar parte o toda la proteína y comparar con las secuencias de algunas FIPs secuenciadas. Afortunadamente las FIPs secuenciadas presentan una elevada homología secuencial en sus aminoácidos. (Hao Chi y cols, 1997)

7. CONCLUSIONES

1. *S. imbricatus* contiene proteínas que van desde 90kD hasta algo menos de 10kD con varias proteínas muy mayoritarias (43 kD,33 kD,12 kD,11 kD)
2. El calor aplicado durante un salteado suave destruye gran parte de las proteínas y deja inalteradas excepto las proteínas de 43 kD y 11kD.
3. La digestión gástrica promueve la degradación de la mayor parte de proteínas, dejando inalteradas las dos proteínas termoestables más importantes (43kD y 11kD)
4. La digestión con pancreatina no permite obtener resultados concluyentes al solaparse las bandas del preparado pancreático con las proteínas termoestables y gastrorresistentes.
5. La concentración de proteínas mediante el procedimiento de precipitación con TCA y ultrafiltración de membrana de 3kD ofrecen resultados similares, y si bien la precipitación con TCA permite recuperar proteínas de peso molecular inferior a 3kD, da lugar a bandas electroforéticas de peor calidad que en el caso de la ultrafiltración. Por el contrario, la ultrafiltración no permite detectar proteínas en con pesos moleculares de 3kD e inferiores.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Agerer R. Ectomycorrhizae of *Sarcodon imbricatus* on Norway spruce and their chlamydospores. *Mycorrhiza*. 1991;1(1):21-30.
2. Alves MJ, Ferreira ICFR, Martins A, Pintado M. Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. *J Appl Microbiol*. 2012;113(2):466-75.
3. Barros L, Baptista P, Correia DM, Casal S, Oliveira B, Ferreira ICFR. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. Vol. 105, *Food Chemistry*. 2007. p. 140-5.
4. Barros L, Baptista P, Correia DM, Morais JS, Ferreira ICFR. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of portuguese wild edible mushrooms. *J Agric Food Chem*. 2007;55(12):4781-8.
5. Barros L, Calhella RC, Vaz JA, Ferreira ICFR, Baptista P, Estevinho LM. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur Food Res Technol* [Internet]. 2007;225(2):151-Disponibile en: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-006-0394-x>
6. Barros L, Ferreira MJ, Queirós B, Ferreira ICFR, Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem*. 2007;103(2):413-9.
7. Biljana Bauer Petrovska. Protein Fraction in Edible Macedonian Mushrooms. *European Food Research and Technology*. European Food Research and Technology
8. Bobovčák M, Kuniaková R, Gabriž J, Majtán J. Effect of Pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) supplementation on cellular immune response after intensive exercise in elite athletes. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2010 Dec;35(6):755-62. doi: 10.1139/H10-070.
9. CHANG ST. *Volvariella volvacea*. *Biol Cultiv Edible Mushrooms* [Internet]. 1978;565:573-603.
Disponibile en:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780121680503500335>
10. Chen J, Seviour R. (2007) Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological Research*, 3: 635-652

11. El-Fakharany E.M., Haroun B.M., Ng T.B., Redwan E.R. (2010) Oyster mushroom laccase inhibits hepatitis C virus entry into peripheral blood cells and hepatoma cells. *Protein and Peptide Letters*, 17: 1031–1039. Park Y.S., Lee H.S., Won M.H., Lee J.H., Lee S.Y., Lee H.Y. (2002) Effect of an exo-polysaccharide from the culture broth of *Hericium erinaceus* on enhancement of growth and differentiation of rat adrenal nerve cells. *Cytotechnology*, 39: 155–162.
12. El-Mekkawy S., Meselhy M.R., Nakamura N., Tezuka Y., Hattori M., Kakiuchi N., Shimotohno K., Kawahata T., Otake T. (1998) Anti- HIV-1 and HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 49: 1651–1657.
13. Ha do T., Oh J., Khoi N.M., Dao T.T., Dung le V., Do T.N., Lee S.M., Jang T.S., Jeong G.S., Na M. (2013) In vitro and in vivo hepatoprotective effect of ganodermanontriol against t-BHP-induced oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3): 875-885.
14. Handayani D., Meyer B.J., Chen J., Brown S.H.J., Mitchell T.W., Huang X-F. (2014) A high-dose shiitake mushroom increases hepatic accumulation of triacylglycerol in rats fed a high-fat diet: underlying mechanism. *Nutrients*, 6(2): 650-662.
15. Hirasawa M., Shouji N., Neta T., Fukushima K., Takada K. (1999) Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11: 151-157.
16. Irene Roncero Ramos. Propiedades nutricionales y saludables de los hongos. Centro tecnológico de investigación del Rioja. Enero 2015
17. Jeong S.C., Yang B.K., Islam R., Koyyalamudi S.R., Pang G., Cho K.Y., Song C.H. (2010) White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research*, 30(1): 49-56.
18. K G, Me D, Kivrak I, Turkoglu A, Mercan N, Turkoglu H, et al. Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey. *African J Biotechnol* [Internet]. 2006;5(20):1924-8. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/AJB>
19. Kanagasabapathy G., Malek S.N., Mahmood A.A., Chua K.H., Vikineswary S., Kuppusamy U.R. (2013) Beta-glucan-rich extract from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) singer prevents obesity and oxidative stress in C57BL/6J mice fed on a high-fat diet. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: 1-10.
20. Lemus I, García R, Delvillar E, Knop G. Hypoglycaemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. *Phyther Res*. 1999;13(2):91-4.

21. Lillian Barros, Paula Baptista, Daniela M. Correia, Jorge Sá Morais, and Isabel C. F. R. Ferreira. Effects of Conservation Treatment and Cooking on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Portuguese Wild Edible Mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55 (12), pp 4781–4788
22. Mascaro M.B., França C.M., Esquerdo K.F., Lara M.A., Wadt N.S., Bach E.E. (2014) Effects of dietary supplementation with *Agaricus sylvaticus* Schaeffer on glycemia and colesterol after streptozotocin-induced diabetes in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014: 107629.
23. Mori K., Inatomi S., Ouchi K., Azumi Y., Tuchida T. (2009) Improving effects of the mushroom Yamabushitake (*Hericium erinaceus*) on mild cognitive impairment: a double-blind placebocontrolled clinical trial. *Phytotherapy Research*, 23: 367–372.
24. Schneider I., Kressel G., Meyer A., Krings U., Berger R., Hahn A. (2011) Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *Journal of Functional Foods*, 3: 17-24.
25. Sudheesh N.P., Ajith T.A., Mathew J., Nima N., Janardhanan K.K. (2012) *Ganoderma lucidum*. protects liver mitochondrial oxidative stress and improves the activity of electron transport chain in carbon tetrachloride intoxicated rats. *Hepatology Research*, 42: 181-191.
26. Sudheesh N.P., Ajith T.A., Mathew J., Nima N., Janardhanan K.K. (2012) *Ganoderma lucidum* protects liver mitochondrial oxidative stress and improves the activity of electron transport chain in carbon tetrachloride intoxicated rats. *Hepatology Research*, 42: 181-191.
27. Wang X, Chu Q, Jiang X, Yu Y, Wang L, Cui Y, et al. *Sarcodon imbricatus* polysaccharides improve mouse hematopoietic function after cyclophosphamide-induced damage via G-CSF mediated JAK2 / STAT3 pathway. *Cell Death Dis* [Internet]. 2018; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0634-6>
28. Wasser S.P. (2011) Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 1323–1332
29. Wong K.H., Cheung P.C.K. (1998) Nutritional assessment of three Chinese indigenous legumes in growing rats. *Nutrition Research*, 18: 1573–1580.
30. Yan H., Chang H. (2012) Antioxidant and antitumor activities of selenium and zinc-enriched oyster mushroom in mice. *Biological Trace Elements Research*, 150: 236–241.

9. ANEXOS

ANEXO I: Materiales

Equipos:

- Balanza de precisión. Marca GRAM FV-120
- Balanza. KERM 572
- Baño de ultrasonidos. Selecta Ultrasons.
- Agitador magnético. J. Jimeno S.A
- Máquina de hielo
- Triturador de hielo
- Microcentrifuga "SPECTRAFUGE24D". Marca LABNET
- Vortex. Marca Raypa
- Centrifugador "KINETIC ENERGY". Marca LABNET (Pulso)
- Pellet Pestle. Marca Sigma.
- Electroforesis MINI-PROTEAN TETRA SYSTEM. Marca BIORAD
- Células electrolíticas.
- Baño MAGNETIC STIRRER. Marca VELD
- Balanceador "ROCKER 25". Marca LABNET
- Para digestión. BAÑO CON AGITACIÓN. Marca BT-21 SBS.
- Destilador 341. Marca POBERI.
- Estufa plástico DRYING OVEN. Marca RAYPA.
- Campana extractora de gases. Marca KOTTERMANN.

Material fungible:

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ Botellas. SIMAX <ul style="list-style-type: none"> ○ 250 ml ○ 500 ml ○ 1L ➤ Celofán geles electroforesis ➤ Cubetas de cuarzo espectrofotómetro 104-QS Hellma 10ml. ➤ Frascos Erlenmeyer de vidrio de diferentes volúmenes. ➤ Geles 12% (Bio-Rad®) ➤ Gradillas para tubos Falcon ➤ Guantes de látex ➤ Imanes agitadores ➤ Marcos geles electroforesis ➤ Microtubo de plástico de 1,5 ml ➤ Mortero de porcelana ➤ Microtubos. (1,5-2 ml). Marca DELTALAB SL. | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Pipeta. <ul style="list-style-type: none"> ○ 200-1000 µL (Labsystems) ○ 20-200 µL (Biohit) ○ 2-20 µL (Biohit) ➤ Parafilm. Vemix ➤ Probetas. NORMAX <ul style="list-style-type: none"> ○ 250 ml ○ 500 ml ○ 1L ➤ Papel de filtro convencional Afora ➤ Pipetas de plástico estériles ➤ Puntas de pipeta automática ➤ Tijeras ➤ Tubos Falcón ➤ Vasos de precipitados. NORMAX <ul style="list-style-type: none"> ○ 600 ml |
|---|--|

Reactivos:

- 2-mercaptoetanol (Merck)
- Acetona (Panreac)
- Ácido acético (J.T.Baker®)
- Ácido bórico (Panreac)
- Ácido clorhídrico (Panreac)
- Ácido etilen diamino tetracértico- EDTA (Panreac)
- Ácido tricloroacético (Panreac)
- Acido Tricloroacético. (Panreac)
- Agua Elix®-Millipore
- Albumina sérica bovina (Roche)
- Bicarbonato de Sodio (Aibasa)
- Carbonato de sodio (Panreac)
- Cloruro sódico (Panreac)
- Coloidal Comassiestain (Bio-Rad®)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich®)
- Etanol (Baker)
- Glicerol (Thermo)
- Hidróxido de sodio (Panreac)
- Isopropanol (J.T.Baker®)
- Laemmil Sample Buffer (Bio-Rad®)
- Precision Plus Protein™ Standards
- QC Colloidal Coomassie Stain (Bio-Rad®)
- Reactivo biuret (Panreac)
- Reactivo Folin (Sigma-Aldrich®)
- Sulfato de cobre (Panreac)
- Tartrato sódico potásico (Panreac)
- Tris-Glycine-SDS Running buffer (Bio-Rad®)
- Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters (Amicon®)

ANEXO II: Preparación de soluciones

Solución de Cloruro sódico (NaCl 0,5M): Preparamos medio litro de una solución de cloruro sódico 0,5 M aplicando la siguiente fórmula: $M = \frac{g/PM}{L}$, donde M es la molaridad, en este caso 0,5 molar, g son los gramos, que es lo que se quiere calcular, PM es el peso molecular que es de 58,44 y L que son los litros. Se pesaron 14,61g de NaCl y se disolvieron en 400ml de agua Elix, una vez disuelto enrasamos en una probeta hasta una cantidad de 500 ml y lo guardamos a 4°C.

Solución de 100ml de NaCl al 0.9% = 0.9g de NaCl en 100ml de agua destilada.

Solución de 10 ml de BSA (10mg/ml) = 100mg de BSA en 10 ml de agua Elix.

Biuret: viene preparado comercialmente.

Solución 1L de EDTA (2nM): 0,58g + solución 1L de NaHCO₃ (2% p/v): 20g:

Se realizan las soluciones por separado (0,58g de EDTA en 1L de Elix y 20g de NaHCO₃ en 1 L de Elix) y luego se vierte la solución de bicarbonato en la de EDTA (el EDTA no se disuelve en agua si no se neutraliza); al instante de juntarlo todo queda disuelto. Etiquetamos una botella de 2L (EDTA 2nM + NaHCO₃ 2% p/v) con la fecha y la metimos a refrigerar a -4°C. Comprobamos los pH del EDTA con tiras reactivas, antes y después de verter el tampón.

Solución de TCA 50%: 50g de TCA por cada 100ml de agua ELIX.

KH₂PO₄ 0.5M: fosfato monopotásico 0.5M, 200 ml. Añadimos 13.61g de KH₂PO₄ hallados en la siguiente fórmula:

$$M * L * Pm = g; \quad 0.5M * 0.2L * 136.08g/mol = \underline{13.61g \text{ de } KH_2PO_4}$$

Solución NaOH 1M: hidróxido de sodio 1M, 100 ml. Añadimos 3.99g de NaOH hallados en la siguiente fórmula:

$$M * L * Pm = g; \quad 1M * 0.1L * 39.9g/mol = \underline{3.99g \text{ de } NaOH}$$

Solución NaOH 0,03M: hidróxido de sodio 0.03M, 100 ml. Añadimos 0.11g de NaOH hallados en la siguiente fórmula:

$$M * L * Pm = g; \quad 0.03M * 0.1L * 39.9g/mol = \underline{0.11g \text{ de } NaOH}$$

Solución de NaCl 2M, llevado a pH 1,2: Cloruro de sodio 2M, 500ml. Añadimos 58.4g de NaCl hallados en la siguiente fórmula:

$$M * L * Pm = g; \quad 2M * 0.5L * 58.4g/mol = \underline{58.4g \text{ de NaCl}}$$

Posteriormente se añade HCl 6M hasta llevar el pH a 1,2 (añadimos 4ml)

Solución HCl 6M: Ácido clorhídrico, 6M, 100ml. Añadimos 21.87g de HCl hallados en la siguiente fórmula:

$$M * L * Pm = g; \quad 6M * 0.1ml * 36.46 \text{ g/mol} = \underline{21.87g \text{ de HCl}}$$

Pepsina 3,8mg/ml: Se añaden 76mg en 20ml de agua, es un producto caro.

Pancreatina 13mg/ml: Se añaden 260mg en 20ml de agua, es un producto caro.

ANEXO III: Preparación de las membranas de diálisis

Se hierven las membranas de diálisis durante 10 minutos en 500 ml de una solución de bicarbonato de sodio al 2% y EDTA 1mM, agitándolas de forma continua. A continuación se enjuaga con agua y Elix y se vuelven a hervir en bicarbonato de sodio y EDTA en esta ocasión durante 15 minutos en 1L, removiéndolas continuamente.

Se vuelve a repetir este último paso tras hervirlas durante 10 minutos. Se almacenan en un litro de agua Elix a 4° hasta su uso. Antes de utilizarla se enjuaga por dentro y por fuera con agua Elix abundante. Las membranas se manipulan con guantes.

ANEXO IV: Método del biuret

En la siguiente tabla están colocadas las cantidades utilizadas para realizar el patrón y muestras del biuret:

	B	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅
NaCl 0.9%	1500µl	1487,5µl	1475µl	1450µl	1375µl	1250µl
BSA (10mg/ml)	0µl	12.5µl	25µl	50µl	125µl	250µl
Extracto <i>Sarcodon Imbricatus</i>	--	--	--	--	--	--
Biuret	1500µl	1500µl	1500µl	1500µl	1500µl	1500µl
10 min 55° 15 min 20°						
Absorbancia	0	0.003	0.006	0.012	0.031	0.062

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈
NaCl 0.9%	1300µl	1200µl	1100µl	1000µl	1200µl	1100µl	1000µl	900µl
BSA (10mg/ml)								
Extracto <i>Sarcodon Imbricatus</i>	200µl	300µl	400µl	500µl	300µl	400µl	500µl	600µl
Biuret	1500µl							
10 min 55° 15 min 20°								
Absorbancia	0.074	0.022	0.023	0.085	0.113	0.028	0.030	0.061

Tabla 4:

<p>M1: SI natural M2: SI dializado M3: SI digestión gástrica M4: SI digestión intestinal</p>	<p>M5: SI cocinado M6: SI cocinado dializado M7: SI cocinado + digestión gástrica M8: SI cocinado + digestión intestinal</p>
---	---

ANEXO V: Preparación de soluciones y proceso de electroforesis

Tampón TRIS (Running Buffer): 1800ml de agua destilada en una probeta de 2L + 200ml de tampón concentrado (100ml x 2). 10 x TGS -Tris/Glycine/SDS buffer- (hidroximetil-glicina-dodecilsulfato sódico). Almacenaje a temperatura ambiente.

Solución de Fixino: (40% etanol + 10% ácido acético). Se añaden 400ml de etanol y 100 ml de ácido acético por cada L de agua Elix. Permite que se fije el colorante añadido al gel una vez finalizada la electroforesis, para que las bandas de las proteínas sean visibles.

Proceso de electroforesis:

Los pasos para realizar la electroforesis son los siguientes:

- En primer lugar, abrimos un gel del 20%, con 12 pocillos. Es importante retirar una tira de pegatina situada en la parte inferior que aparece de forma protectora en el gel.
- Una vez abierto el gel lo colocamos en un soporte el cual está formado por dos pestañas que sujetan la carcasa del gel de forma hermética. Es importante colocarla en la posición correcta. Este soporte funciona con mínimo dos carcasas. Junto con el equipo viene una carcasa sin gel por si queremos hacer electroforesis impares (1-3). Introducimos el soporte dentro de la cubeta dónde realizamos la electroforesis.
- Una vez el soporte con el gel dentro de la cubeta, retiramos del gel otra pestaña protectora situada en la parte superior que protege los pocillos, con cuidado de no estropear la forma de estos.
- Añadimos running buffer en el interior del soporte que cierra herméticamente al gel hasta enrasar los pocillos.
- Añadimos running buffer en la cubeta hasta la marca deseada (2 geles o 4 geles).
- Colocamos en el interior de los pocillos las muestras de electroforesis que hemos preparado.

- En el pocillo 1 y en el pocillo 12 colocamos una muestra patrón.
En los pocillos del 2 al 8 incluido colocamos las muestras de *Sarcodon imbricatus*.
En los pocillos 8, 9, 10 y 11 colocamos BSA, BSA digerido, pepsina y pancreatina, respectivamente.
- Colocamos la carcasa superior que esta conecta con los electrodos de los soportes y recibe corriente de una fuente de alimentación, que colocamos a 200V. Observamos la transmisión de corriente por el movimiento de burbujas en el gel, y la electroforesis comienza a avanzar.
- La electroforesis finaliza cuando las bandas del gel llegan al borde inferior del mismo. Una vez finalizada la electroforesis se extrae el gel de la carcasa y se coloca en un recipiente con agua durante 5 minutos. Pasado el tiempo, se retira el agua y se añade la solución fijadora Fixino bajo una campana ya que es una sustancia muy volátil, y se coloca el recipiente sobre el balanceador durante 15 minutos. Posteriormente, se retira el fijador y se añade la solución de tinte (QC Coloidal comassie stain) que se mantiene en balanceo durante una noche.
- Pasada la noche, se retira el tinte, y se añade agua Elix y se balancea durante una hora. Se realiza un cambio de agua cada hora durante un día.
- Pasado un día, se observaron las proteínas en el gel.

En la figura 9 se pueden ver imágenes de los diferentes pasos.

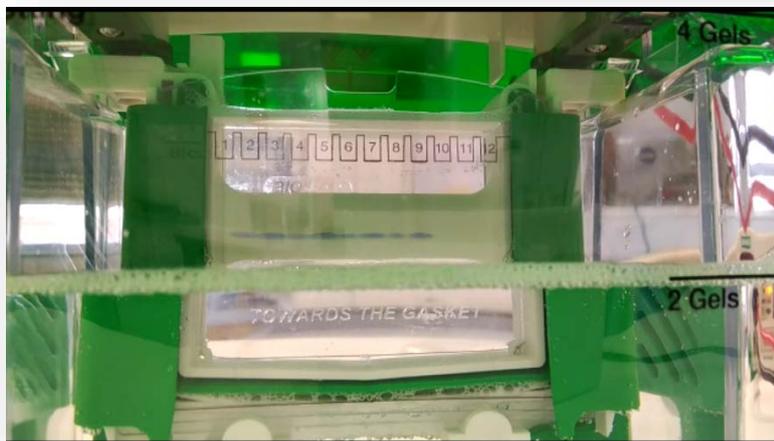
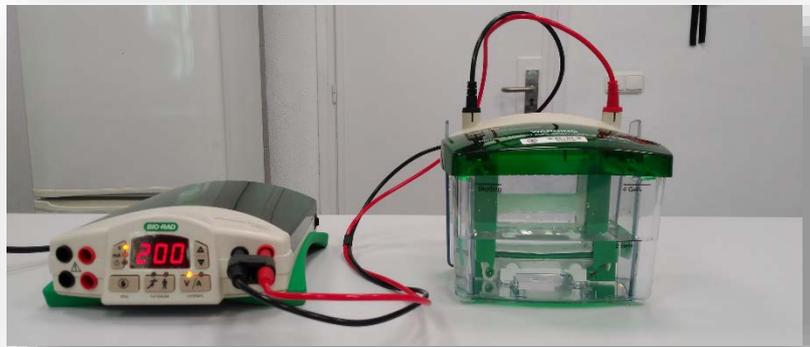
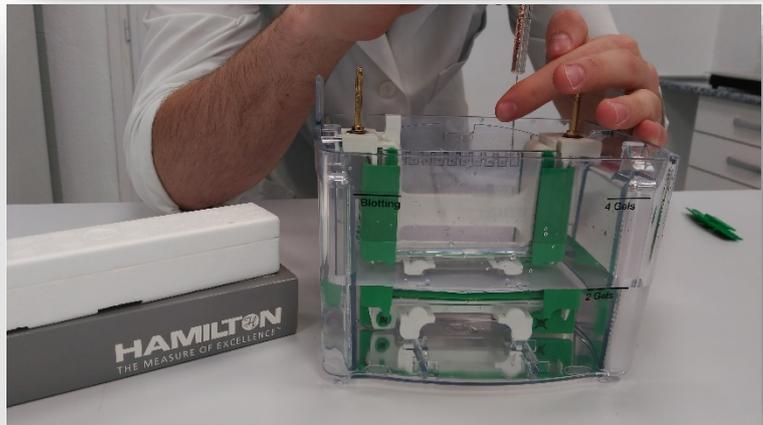
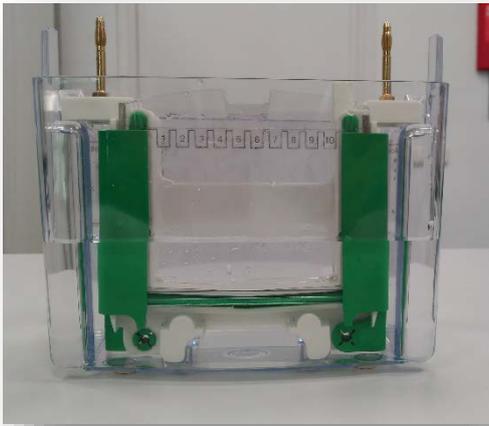
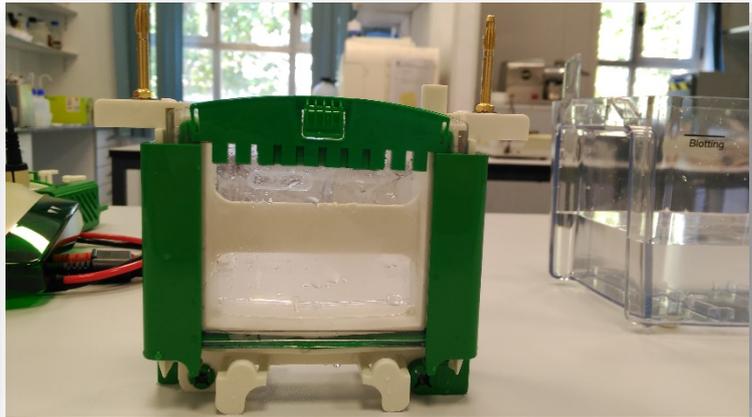


Figura 9. Proceso y pasos de electroforesis en el laboratorio