



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

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

TRABAJO FIN DE MÁSTER:

**“Digestibilidad de proteínas de los hongos
comestibles, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus
eryngii* y *Sarcodon imbricatum*”**

Presentado por *Alberto Román Corrochano*

Dirigido por: D. Tomás Girbés Juan y Dña. Pilar Jiménez López

2013

D. Tomás Girbés Juan, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y Dña. Pilar Jiménez López, Profesor Contratado Doctor de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, directores de este Trabajo Fin de Máster, certifican que el trabajo realizado por D. Alberto Román Corrochano puede ser presentado como Trabajo Fin de Máster en Investigación en Ciencias de la Salud de la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 11 de Julio de 2013

Fdo.: Tomás Girbés Juan

Fdo.: Pilar Jiménez López

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo experimental no se podría haber realizado sin las directrices y correcciones del Prof. Tomás Girbés Juan (Dpto. Nutrición y Bromatología, UVA) y a la Profa. Pilar Jiménez (Dpto. Nutrición y Bromatología, UVA) a los que estoy especialmente agradecido por darme la oportunidad de poder desarrollar dicho trabajo en su Departamento. Para mi es todo un honor haber trabajado con ellos.

Además me gustaría agradecer al resto de compañeros del laboratorio, Patricia Cabrero, José-Ezequiel Basterrechea (Joseba) y Jesús Tejero, el apoyo, los consejos recibidos y por supuesto los momentos de distensión y risas.

Como he dicho, todo un placer.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Características macroscópicas de los hongos	11
1.2. Características microscópicas de los hongos	14
1.3. Descripción y clasificación científica de los hongos sometidos a estudio	16
1.3.1. <i>Agaricus bisporus</i>	17
1.3.2. <i>Pleurotus eryngii</i>	18
1.3.3. <i>Sarcodon imbricatum o imbrucatus</i>	19
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIALES	23
3.1. Equipos	24
3.2. Material fungible	25
3.3. Reactivos químicos	26
3.4. Materiales biológicos	27
4. MÉTODOS	30
4.1. Preparación de disoluciones y filtración	31
4.2. Esterilización	31
4.3. Determinación del contenido de cenizas en los hongos	32

4.4. Determinación del contenido de humedad en los hongos	34
4.5. Elaboración de los extractos de hongos	36
4.6. Método de biuret	36
4.7. Preparación de las membranas de diálisis	38
4.8. Diálisis de los extractos de hongos	39
4.9. Medida de la concentración de proteínas por el método Kalb & Bernlohr	40
4.10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	40
4.11. Digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas con pepsina	45
5. RESULTADOS	47
5.1. Determinación de las cenizas de las muestras	48
5.2. Determinación de la humedad de las muestras	49
5.3. Determinación de proteínas por el método del biuret	50
5.4. Determinación de los perfiles proteínicos de <i>Agaricus bisporus</i>, <i>Pleurotus eryngii</i> y <i>Sarcodon imbricatum</i>	51
5.4.1. Perfil proteínico de <i>Agaricus bisporus</i>	51
5.4.2. Perfil proteínico de <i>Pleurotus eryngii</i>	52
5.4.3. Perfil proteínico de <i>Sarcodon imbricatum</i>	53
5.5. Digestión con un fluido gástrico simulado del extracto acuoso del sombrero de <i>Agaricus bisporus</i>	54

5.6. Digestión con un fluido gástrico simulado del extracto acuoso del sombrero de <i>Pleurotus eryngii</i>	56
5.7. Digestión con un fluido gástrico simulado del extracto acuoso del sombrero de <i>Sarcodon imbricatum</i>	57
6. DISCUSIÓN	60
7. CONCLUSIONES	64
8. BIBLIOGRAFÍA	66

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino español estimó que la producción de hongos en España se había duplicado entre los años 1998 y 2008, alcanzando 120.000 toneladas (Venturini y cols., 2011).

El aumento del consumo de setas ha ampliado la cantidad y la variedad de especies que se encuentran en el mercado; además en España, y concretamente en Castilla y León, tradicionalmente se han consumido setas recolectadas por la población. Esta afición micológica también se ha ido incrementando con el paso de los años, por este motivo se ha elaborado una legislación y una serie de permisos específicos que regulan este campo (Gómez Urrutia, 2009).

La Federación de Asociaciones Micológicas de Castilla y León tiene el cometido de informar y concienciar al recolector para que realice un aprovechamiento micológico sostenible y evitar intoxicaciones por consumo de setas. Además pretenden cambiar el perfil del recolector de hongos, sustituir a la persona que recoge gran cantidad de setas de una misma especie en un corto periodo de tiempo por un recolector concienciado que desee diversificar las especies recolectadas, por lo que recogería menor cantidad y en un periodo de tiempo más amplio. Este propósito se resume en el esquema de la figura 1.

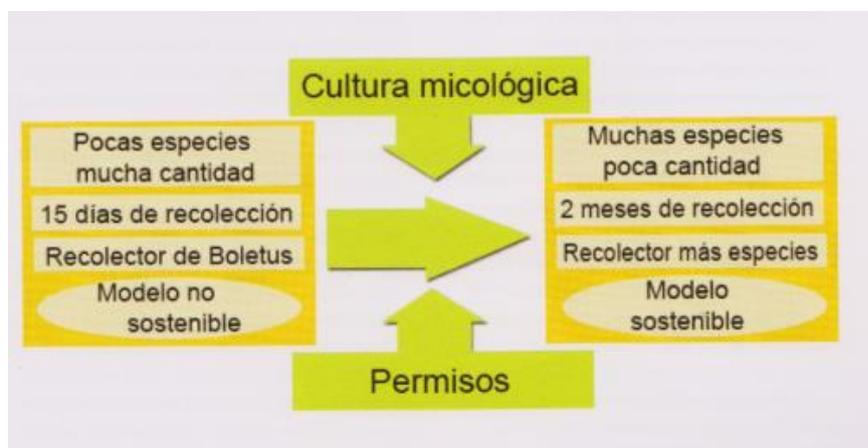


Fig. II. Esquema del modelo micológico sostenible.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos o setas se definen como organismos vivos que se reproducen por esporas y que carecen de clorofila, por lo que deben vivir a costa de otros seres, haciéndolo de forma saprofítica, simbiótica o parásita (García Blanco y Sánchez Rodríguez, 2009).

Actualmente han sido descritas unas 80.000 especies de hongos, sin embargo se estima que podrían existir aproximadamente 1.5 millones. Esta variación se debe a que existen especies denominadas “crípticas”, las cuales son muy similares morfológicamente a otras y sin embargo presentan variaciones genéticas respecto a ellas (Hawksworth, 1991, Hawksworth, 2011)

No pertenecen al reino animal ni al reino vegetal, desde 1960 forman un reino propio denominado “Reino Fungi”.

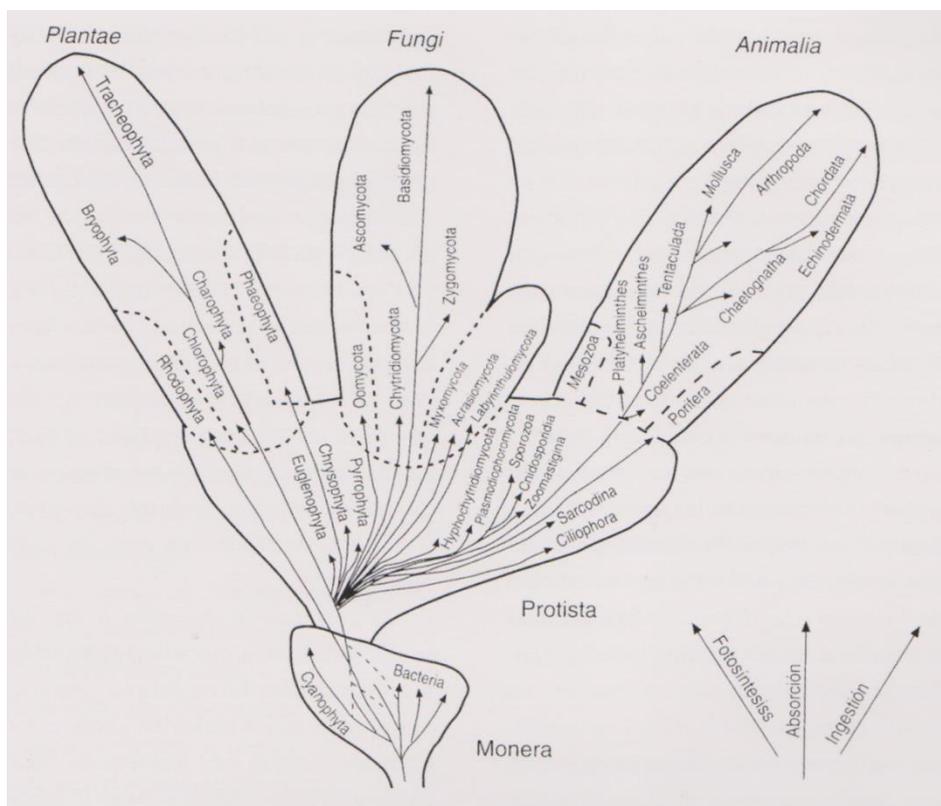


Fig. 12. Esquema clasificatorio de Whittaker en forma de árbol filogenético.

Las setas han formado parte de la dieta humana durante miles de años y progresivamente ha ido aumentando su consumo. Se consideran como un alimento saludable debido a que son bajas en calorías, grasas y ácidos grasos esenciales mientras que son ricas en proteínas, vitaminas y minerales. Además se han estudiado sus propiedades medicinales, entre otras, su efecto antitumoral e inmunomodulador, su inhibición plaquetaria, la reducción de la concentración del colesterol sanguíneo, su acción cardiosaludable, su actividad antimicrobiana y la reducción de los niveles de glucosa en sangre (Reis y cols., 2012). Por otro lado, las setas pueden ser útiles para la formación de micorrizas (simbiosis entre un hongo y las raíces de una planta) y beneficiosas para la descontaminación del suelo (Lelley, 1999).

Por todos estos motivos, el interés en investigar en profundidad este reino se ha intensificado con el paso de los años y se han ido desarrollando estudios relacionados con el valor nutricional de las setas (Kalac, 2009), su capacidad antioxidante (Barros y cols., 2009) y en menor medida, con la calidad de las proteínas que contienen (Dabbour y Takruri, 2002a) y la disponibilidad de los aminoácidos procedentes de la digestibilidad in vivo de los hongos (Dabbour y Takruri, 2002b).

1.1. Características macroscópicas de los hongos

Los hongos constan de las siguientes partes:

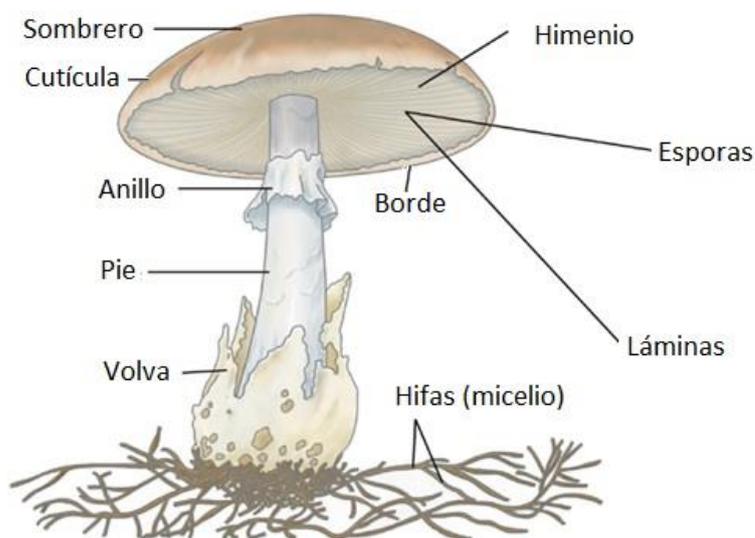


Fig. I3. Partes de un hongo. Imagen extraída de <http://setas.org/informacion-basica/partes-del-hongo-y-de-una-seta/>

Sombrero: la forma más conocida es la semejante a un paraguas con pie y sombrero, aunque puede presentar numerosas variaciones según el tipo de himenio. Igualmente puede presentar una amplia gama de formas y colores: redondo, plano, cóncavo, convexo, con mámelon, embudado, hemisférico, acampanado, etc.



Fig. I4. Sombrero de *Sarcodon imbricatum*. Imagen extraída de <http://mushroom.win.mofcom.gov.cn/en/plate01/product.asp?id=28013>

1. INTRODUCCIÓN

Como parte del sombrero está la **cutícula**, membrana exterior que recubre al sombrero. Tiene importancia tanto por su estructura como por su color. Puede ser viscosa o seca, lisa o escamosa, cuarteada o agrietada, fibrosa, verrugosa, tener o no placas y separarse fácil o difícilmente de la carne.

Además el **borde** del sombrero puede ser liso, ondulado, estriado, acanalado, festonado, delgado, grueso, etc.

Himenio: es la parte fértil del carpóforo, donde se localizan las esporas. Las **láminas** son unos tabiques verticales delgados que se encuentran situados en la parte inferior del sombrero. Van desde el borde del sombrero hasta el pie. Pueden ser separadas, libres, escotadas cuando tienen un entrante en la proximidad del pie, adnatas o adheridas cuando tocan el pie en una pequeña parte o decurrentes si recubren una parte del pie.



Fig. 15. Láminas de *Agaricus bisporus*.

Imagen obtenida de

http://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Agaricus_bisporus.htm

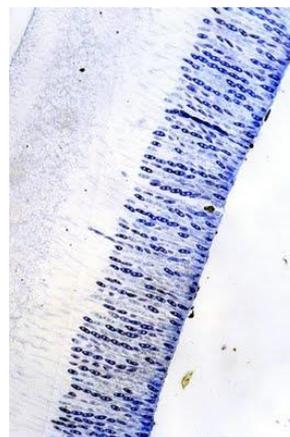


Fig. 16. Corte transversal del himenio de un hongo al microscopio. Imagen

extraída de

<http://biol2c201.blogspot.com.es/2009/09/intercambio-de-gases.html>

El **pie** es la parte de la seta que sostiene al sombrero. El color, el tamaño, la estructura fibrosa o granulosa o si es hueco o macizo, son caracteres

indispensables para la taxonomía. Puede ser central, lateral o excéntrico, delgado o grueso, curvado, sinuoso, radicante, atenuado, claviforme, bulboso, fibroso, cartilaginoso o granuloso.



Fig. 17. Pie de Pleurotus eryngii.

En ocasiones, en el pie aparece un **anillo** cuya formación se debe a la rotura total o parcial del velo himenial al crecer la seta y extenderse el sombrero, quedando parte de esta membrana rodeando el pie, como se muestra en la figura I3. La existencia de este anillo ayuda en la determinación y la clasificación de las setas, sin embargo en algunas setas puede desaparecer fácilmente.

La **volva** es un resto membranoso del velo universal que tiene forma de vaina y que a menudo se mantiene en la base del pie. Este velo universal cubre y protege a la seta totalmente al nacer y al crecer desaparece total o parcialmente.

La **carne** se caracteriza por su consistencia (fibrosa, granulosa, dura o blanda, compacta o esponjosa, viscosa, coriácea, higrófana, etc), su color

(varía dependiendo de la oxidación y el clima), su olor (a anís, a ajo, a harina fresca, a fenol, a almendras amargas, a cloro, a patatas crudas, etc) y su sabor (dulce, amargo, picante, agradable, desagradable, etc).



Fig. 18. Carne de Pleurotus eryngii.

1.2. Características microscópicas de los hongos

En la determinación y caracterización de los hongos es imprescindible la observación al microscopio de sus caracteres microscópicos como hifas, cistidios, pelos y esporas.

Las **hifas** son las unidades estructurales de la mayoría de los hongos, sobre todo de los filamentosos. Cuando presentan tabiques transversales en forma y número regular, con un poro de comunicación en el centro, se denominan hifas septadas; en los casos en los que carecen de ese tabique se conocen como hifas aseptadas. El conjunto de hifas recibe el nombre de micelio. Se puede observar al microscopio el grosor de la pared, el diámetro del filamento, la presencia o no de bucles o fíbulas, etc.

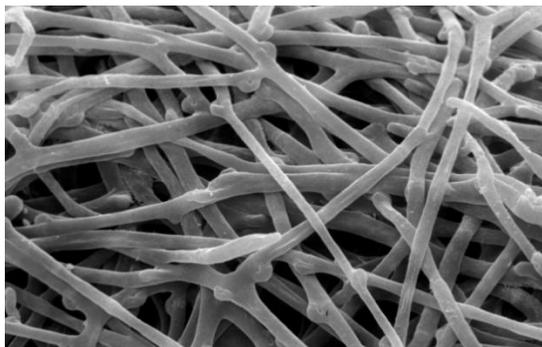


Fig. I9. *Micelio de un hongo visto al microscopio. Imagen extraída de <http://biol2c201.blogspot.com.es/2009/09/intercambio-de-gases.html>*

Las **ascas** son los sacos donde se desarrollan las esporas de los *Ascomycetes* mientras que los **basidios** son los órganos donde se desarrollan las esporas de origen sexual de los *Basidiomycetes*. Los **cistidios** son células estériles que rodean a los basidios.



Fig. I10. *Ascas. Imagen obtenida de <http://biol2c201.blogspot.com.es/2009/09/intercambio-de-gases.html>*



Fig. I11. *Basidios. Imagen obtenida de <http://www.micobotanicajaen.com/Revista/Articulos/IFrutosC/Marzuolus/Marzuolus.html>*

Los **pelos** son elementos estériles de morfología variada que aparecen tanto en la cutícula como en el himenio o en el pie.

Las **esporas** son los órganos de origen sexual encargados de perpetuar y extender la especie. Es importante el color de la esporada (conjunto de esporas que deja caer el carpóforo cuando está maduro), debido a que es significativo a la hora de identificar la especie.

Además las esporas son muy variables en cuanto a forma, ornamentación, y tamaño. Hay esporas esféricas, ovales, globosas, poligonales, estrelladas, cilíndricas, helicoidales, etc. En lo que se refiere a su superficie pueden ser lisas, rugosas, reticuladas, verrugosas, espinosas y pueden presentar tabiques tanto longitudinales como transversales.

El tamaño suele variar entre 3 y 20 micras.

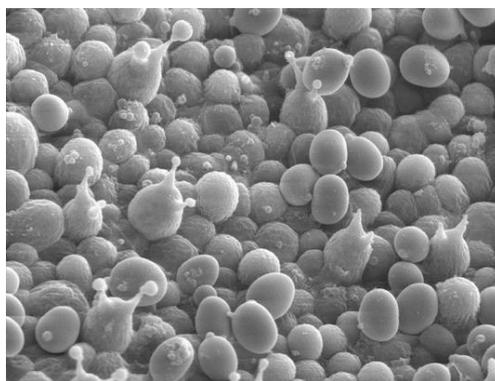


Fig. II2. Esporas de Agaricus bisporus. Imagen obtenida de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agaricus_bisporus_spores_SEM_2.jpg

1.3. Descripción y clasificación científica de los hongos sometidos a estudio

A continuación se detallan las características de los hongos que componen este trabajo: *Agaricus bisporus*, *Sarcodon imbricatum* y *Pleurotus eryngii*.

1.3.1. *Agaricus bisporus*

Sinónimo: *Agaricus hortensis*. Nombre vulgar: Champiñón o seta de campo

Clase: *Agaricomycetes* Orden: *Agaricales* Familia: *Agaricaceae*

Presenta un sombrero muy carnoso de 5 a 17 cm y puede ser tanto globoso-convexo como aplanado. La cutícula es gruesa, blanca, lisa y cubierta con escamas de color pardo. Las láminas son libres, apretadas, con lamélulas, de color rosa carne y después negruzcas.

El pie tiene de 7 a 14 cm. de alto y de 2 a 4 cm. de grosor. Se caracteriza por ser liso, blanco, macizo y por presentar una base un poco gruesa, cubierta por cordones miceliales.

El anillo es ínfero, tipo brazaletes de corte triangular, denso y blanco.

La carne es blanca y gruesa. Desprende un olor fúngico y posee un sabor agradable por ello es considerado un excelente comestible.

Aparece de primavera a otoño en terrenos abonados y en humus de *Cupressus*.



Fig. 113. Ejemplares de *Agaricus bisporus*. Imagen extraída de <http://www.amanitacesarea.com/agaricus-bisporus.html>

1.3.2. *Pleurotus eryngii*

Nombre vulgar: Seta de cardo, gatuña o chirigoleta.

Clase: *Agaricomycetes* Orden: *Tricholomatales* Familia: *Pleurotaceae*

Presenta un sombrero de 4 a 11 cm. convexo y después aplanado. La cutícula es finamente escamosa, en la madurez lisa, de color ocre a marrón oscuro o negruzco y blanquecino en los ejemplares viejos. Las láminas son decurrentes (prolongadas inferiormente por debajo del punto de inserción, adosándose en parte al eje en el que se insertan) y blanquecinas.

El pie tiene de 4 a 6 cm. de alto y de 0,7 a 1 cm. de grosor, excéntrico, rara vez central, blanquecino y liso.

La carne es blanca y tierna. Desprende un olor agradable y tiene sabor dulce.

Crece en terrenos no cultivados asociados a raíces de *Eryngium campestre*. Aparece en primavera y otoño. Es muy abundante y común. Es apreciado como un excelente comestible.



Fig. 114. Ejemplares de *Pleurotus eryngii*. Imagen extraída de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/78/Pleurotus_eryngii_%28de_Kr%C3%A4uterseitling%29_cultivated_in_Korea%2C_sold_in_Austria%2C_20100127.jpg

1.3.3. *Sarcodon imbricatum* o *imbrucatus*

Sinónimo: *Hydnum imbricatum*. Nombre vulgar: Piel de corzo

Clase: *Agaricomycetes* Orden: *Thelephorales* Familia: *Bankeraceae*

Presenta un sombrero carnosos de hasta 30 cm. de diámetro, de forma convexa con el borde enrollado y después aplanado. El color de su superficie varía entre gris pardo y pardo oscuro, además aparecen placas concéntricas características que son anchas y más oscuras.

El pie tiene de 3 a 12 cm. de alto y de 0,5 a 3 cm. de ancho. Es cilíndrico y presenta un color pardo gris o marrón que se atenúa en la base.

La carne varía de blanca a gris pardo y su consistencia es firme y tenaz. Libera un olor y un sabor a madera de cedro.

Aparece exclusivamente en bosques de coníferas, en otoño tardío. Es muy frecuente y se la considera un comestible mediocre.



Fig. 115. Ejemplares de *Sarcodon imbricatum*. Imagen extraída de <http://www.sierradelaculebra.eu/PaginaAuxiliar~x~Sarcodon-imbricatus~IDPaginaAuxiliar~45.html>

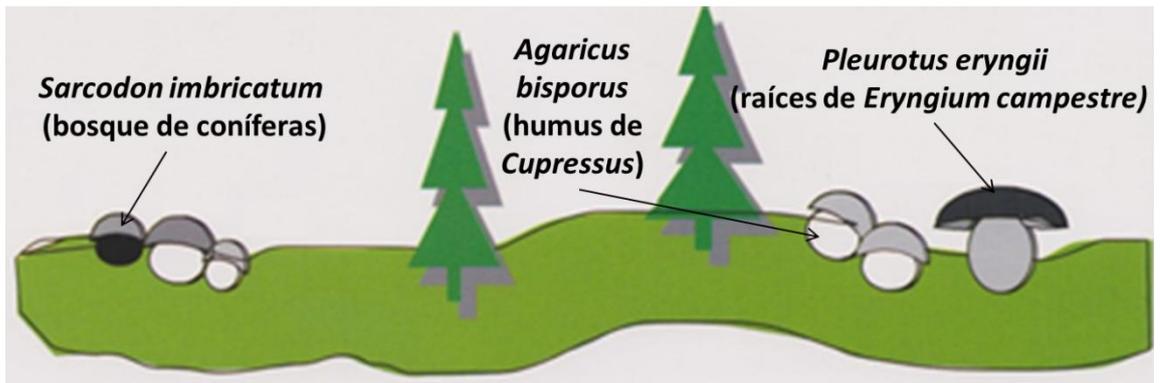


Fig. I16. Dibujo esquemático del desarrollo de los hongos en un bosque genérico.

Imagen extraída del Boletín Micológico FAMCAL n°2, 2007.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es determinar la digestibilidad de distintas setas comestibles características de Castilla y León, aunque su distribución es prácticamente universal y en algún caso se producen industrialmente. Las especies seleccionadas fueron: *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Sarcodon imbricatum*.

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Determinación de características básicas como humedad y cenizas.
- 2) Determinación del contenido proteínico de cada seta.
- 3) Determinación de los perfiles proteínicos de cada seta en extractos acuosos, tanto de pie como de sombrero.
- 4) Determinación de la digestibilidad en fluido gástrico simulado de las setas seleccionadas.

3. MATERIALES

A continuación se muestra una lista de los productos químicos utilizados, así como la casa comercial de la que provienen. Todos los productos son aptos para el uso en experimentos analíticos, siendo de una alta pureza.

3.1. Equipos

Agitador de tubos: Raypa

Agitador magnético ACS-160: J.Jimeno S.A.

Balancín: Labnet

Balanza de precisión: KERN ABS

Balanza: KERN 572

Baño de agua: Velp Scientifica (multistirrer 6)

Congelador -24°C: Fagor

Cubetas electroforéticas mini-VE Amersham Biosciences

Disgregador MICCRA D-9 /RT

Escáner CanonScan Lide 200 acoplado a un ordenador ASUS A53S

Espectrofotómetro: HELIOS α Thermo

Estufa: P.SELECTA 150 litros

Mufla CARBOLITE: J. Jimeno. S.A.

pHmetro: pH-meter basic 20 + CRISON

Pipetas automáticas: Proline Plus de Biohit

3.2. Material fungible

Botellas de vidrio de diversos volúmenes, desde 5 ml hasta 2 litros.

Cápsulas de porcelana.

Cápsulas de acero inoxidable.

Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro 104-QS Hellma 10mm.

Desecador.

Espátulas.

Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes.

Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.

Guantes de látex.

Imanes agitadores.

Microtubos de plástico de 1,5 y 2 ml.

Papel de filtro convencional (Afora).

Parafilm M.

Pinzas de acero inoxidable.

Pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 ml.

Probetas de vidrio y de plástico de diferentes volúmenes.

Puntas de pipeta automática.

Puntas especiales de pipetas para cargar geles de poliacrilamida.

Tijeras.

Tubos Falcon de 15 y 50 ml.

Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.

3.3. Reactivos químicos

Reactivo	Casa Comercial
Acetona	Panreac
Ácido acético	S. T. Baker
Ácido clorhídrico	Panreac
Acrilamida/bisacrilamida	Amresco
Albumina sérica bovina	Roche
Azida sódica	Sigma-Aldrich
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich
Azul Coomassie R-250	Panreac
2-mercaptoetanol	Merck
Butanol-1	Merck
Carbonato de sodio	Panreac
Cloruro sódico	Panreac
Dodecil sulfato sódico	Sigma-Aldrich
Gel de sílice	Panreac
Glicerol	Thermo
Hidróxido de sodio	Panreac
Metanol	Panreac

3. MATERIALES

Pepsina	Sigma-Aldrich
Persulfato amónico	Sigma-Aldrich
Reactivo de biuret	Panreac
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Fluka
Sulfato de cobre (II)	Merck
Tartrato de sodio y potasio	Panreac
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich Roche

3.4. Materiales biológicos

Los hongos utilizados en este trabajo fueron recolectados e identificados por D. Santiago de Castro Alfageme.



Fig. Ma1. Recolectores de setas en un hayedo. Imagen extraída del Boletín Micológico FAMCAL n°4, 2009.



Fig. Ma2. Muestras de *Agaricus bisporus*.

Las muestras de *Agaricus bisporus* proceden de cultivo y se obtuvieron en mayo 2013.

Las muestras de *Pleurotus eryngii* proceden de cultivo y fueron obtenidas el día 27 de noviembre de 2012.



Fig. Ma3. Muestras del pie de *Pleurotus eryngii*.



Figura Ma4. Muestra de Sarcodon imbricatum.

Las muestras de *Sarcodon imbricatum* fueron recolectadas en Soria el día 27 de octubre de 2012.

Todas las muestras fueron congeladas en un congelador marca Fagor a -24°C y descongeladas justo antes de su uso.

4. MÉTODOS.

4.1. Preparación de disoluciones y filtración

Todas las soluciones se prepararon con agua purificada por el sistema de purificación Elix 3 de Millipore, con una resistividad alrededor de 0,067 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Se filtraron todas las soluciones para evitar posibles contaminaciones de materiales inertes como pequeñas fibras textiles. El equipo de filtración consta de un matraz de filtración, un cuerpo con placa de vidrio poroso, un embudo, una pinza de aluminio, un tubo de silicona y una bomba de vacío. Antes de filtrar se coloca una membrana de la casa comercial Millipore de 4,5 cm de diámetro, que permite el paso de sustancias de hasta 0,45 μm HA. La membrana se maneja con unas pinzas de punta redonda para evitar dañarla y se humedece por ambas caras con agua Elix, colocándola posteriormente entre el cuerpo con placa de vidrio poroso y el embudo, fijando ambas partes con la pinza de aluminio. Finalmente, a través de un tubo de silicona se conecta el matraz con la bomba de vacío. Una vez montado el sistema de filtración se conecta la bomba de vacío y se vierte la solución. En el caso de que la solución lo requiera, se esteriliza a continuación siguiendo las indicaciones del apartado siguiente.

Para todos los procesos, tanto de preparación de soluciones como para la ejecución de los experimentos de este trabajo, se utilizaron guantes de látex, con cambios frecuentes, para evitar la contaminación de los diversos agentes presentes en la piel.

4.2. Esterilización

La esterilización se realiza en un autoclave a una temperatura de 120 °C y a 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

Para la esterilización de materiales se reparten en lotes en función de su naturaleza, los de plástico (vasos de precipitados, imanes, embudos, etc.) se mantienen toda la noche en una estufa a 50 °C, y los de vidrio (probetas, vasos de precipitados, botellas, etc.), metal (espátulas, tijeras, etc.) y porcelana (morteros) se mantienen en estufa a 100 °C durante toda la noche.

El resto del material de laboratorio (puntas de micropipetas, microtubos, tubos cónicos, filtros, jeringas, etc.) se adquirió en forma estéril o se esterilizó utilizando el autoclave, como se ha indicado.

4.3. Determinación del contenido de cenizas en los hongos

Las cenizas son el residuo que queda tras la incineración completa de los componentes orgánicos de un alimento en unas condiciones determinadas. Una vez eliminadas las posibles impurezas y partículas de carbono procedentes de una combustión incompleta, el residuo restante se corresponde con el contenido en minerales del alimento.

Para eliminar la humedad de las cápsulas de porcelana se introducen en la mufla a 535°C y se mantienen durante 20 minutos. Después se sacaron las cápsulas y se llevaron al desecador, donde se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente. Es necesario que se mantengan en el desecador, el cual contiene gel de sílice, mientras atemperan para evitar que capten la humedad ambiental. Este gel está formado por dióxido de silicio que debido a su porosidad se emplea como absorbente de agua para reducir la humedad, además contiene cloruro de cobalto como indicador. Si el gel está seco, el cloruro de cobalto es de color azul mientras que si se encuentra húmedo torna a rosa.

4. MÉTODOS

Posteriormente se pesaron las cápsulas y cuando su peso fue constante, se pesaron y trituraron 10 gramos de cada seta (separando sombrero y pie) y se colocaron en las cápsulas de porcelana sin comprimirlos. Se introdujeron en la mufla a 535 °C durante 14 horas hasta que se produjo la calcinación total de la muestra. La incineración es completa si el resultado es un residuo blanco o grisáceo. En los casos en los que después de transcurrir las 14 horas no se consiguió este residuo sino un residuo negro, se añadió 1 ml. de agua destilada y se volvieron a meter en la mufla hasta que se obtuvo el residuo blanco. Una vez conseguido este residuo, se sacaron las cápsulas y se colocaron en el desecador (con el mismo propósito explicado anteriormente) hasta que se enfriaron. Finalmente se pesaron.

El porcentaje de cenizas sobre sustancia fresca se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas (SF)} = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \times 100$$

Mientras que el contenido de cenizas sobre sustancia seca se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ Cenizas (SF)} = \frac{\% \text{ Cenizas (SF)}}{100 - \text{Humedad}} \times 100$$

En la que P_0 es la masa en gramos de la cápsula de porcelana vacía, P_1 es la masa en gramos de la cápsula con la muestra antes de la incineración y P_2 es la masa en gramos de la cápsula con la muestra después de la incineración.



Fig. Me1. Muestra de Sombrero de Sarcodon imbricatum antes y después de la incineración.

4.4. Determinación del contenido de humedad en los hongos

La humedad, o el contenido de agua, de un alimento se define como la pérdida de masa que experimenta dicho alimento después de someterlo a un proceso de desecación. Esta desecación se puede realizar en una estufa termorregulada a una determinada temperatura hasta la obtención de una masa constante. La humedad viene expresada en porcentaje.

Antes de determinar la humedad, se prepararon las cápsulas de acero inoxidable. En primer lugar se metieron las cápsulas necesarias en la estufa a 130 °C y se mantuvieron durante 1 hora a fin de eliminar su humedad. Transcurrido este tiempo, se sacaron las cápsulas y se transfirieron al desecador (para evitar que capten humedad ambiental), donde se dejaron enfriar hasta que alcanzaron temperatura ambiente. Posteriormente, se pesaron y se anotó el peso de cada una. Este procedimiento se repitió hasta que el peso de las cápsulas fue constante.

A continuación, se pesaron entre 5 y 7 gramos de cada hongo y se trituraron lo más posible con ayuda de unas tijeras. Una vez triturados se puso cada muestra en su correspondiente cápsula y se introdujeron en la

4. MÉTODOS

estufa a 100 °C durante 90 minutos. Pasado este tiempo, se sacaron las cápsulas y se dispusieron en el desecador (con el objetivo citado anteriormente) donde se dejaron enfriar hasta que adquirieron temperatura ambiente.

Para finalizar, se pesaron las cápsulas con la muestra desecada. Se repitieron los pasos anteriores hasta que el peso fue constante, separando cada pesada con una permanencia en la estufa de media hora.

Se calculó la humedad de las muestras utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_0} \times 100$$

En la que P_0 es la masa en gramos de la cápsula vacía, P_1 es la masa en gramos de la cápsula con la muestra antes de la desecación y P_2 es la masa en gramos de la cápsula con la muestra después de la desecación.



Fig. Me2. Muestras de sombrero y pie de Agaricus bisporus después de la desecación.

4.5. Elaboración de los extractos de hongos

Para la elaboración de los extractos se pesan 10 de gramos de muestra y se añaden 20 ml. de tampón de extracción (Tris 0,1 M, EDTA 10 mM, pH 7,4). Posteriormente se trituran con un disgregador MICCRA D-9 /RT.

La pasta resultante se centrifuga en tubos eppendorf durante un minuto a 10.000 r.p.m., se recoge el sobrenadante, se divide en alícuotas y se almacenan a -24 °C hasta su uso.



Fig. Me3. Extracto de pie de Sarcodon imbricatum

4.6. Método de 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 péptidos y las proteínas reaccionan con el reactivo de biuret mientras que el ion cúprico forma un complejo de coordinación con los pares de electrones no compartidos del nitrógeno presente en los aminoácidos de las proteínas; este complejo presenta un máximo de absorción a 540 nm (Guarnizo Franco y Martínez Yepes, 2009).

4. MÉTODOS

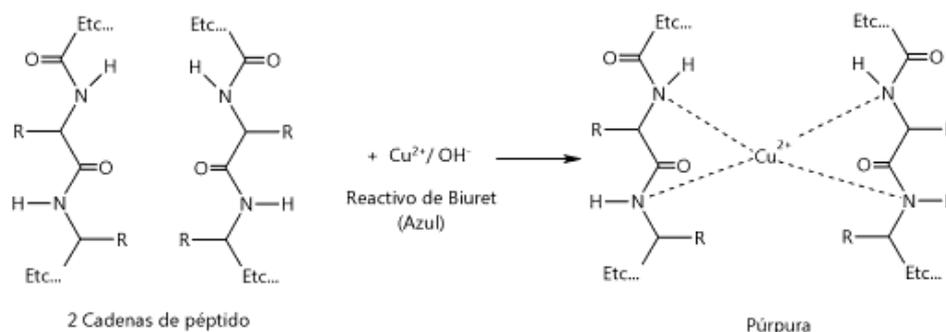


Fig. Me4. Complejo de cobre formado en la reacción de biuret

Para llevar a cabo el método, se preparó una solución de cloruro sódico al 0,9% y una disolución de BSA 10 mg/ml que nos sirvió para realizar la recta de calibrado.

En primer lugar, se añadió la cantidad adecuada de la solución de cloruro sódico 0,9% para obtener un volumen final de 3ml. a cada uno de los tubos Falcon. Posteriormente se incorporó el BSA o la muestra de seta correspondiente y finalmente 1,5 ml. de reactivo de biuret. Se incubó durante 10 minutos a una temperatura de 55 °C y por último se midió la absorbancia de cada tubo a una longitud de onda de 540nm.

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

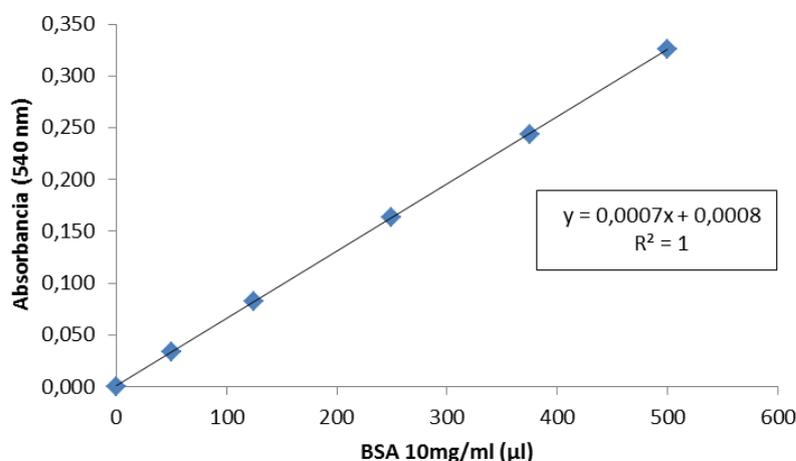


Fig. Me.5 Recta de calibrado. Método de biuret.

4.7. Preparación de las membranas de diálisis

Se cortaron 6 tiras de las membranas de diálisis con una longitud de aproximadamente 50 cm. y un diámetro de 14,3 mm. Se escogió este diámetro teniendo en cuenta el volumen de extracto que se quería dializar.

Se hirvieron las membranas de diálisis durante 10 minutos en 500 ml. de una solución de bicarbonato de sodio al 2 % y EDTA 1 mM, agitándolas de forma continua.

A continuación, se enjuagaron con agua Elix y se volvieron a hervir nuevamente en bicarbonato de sodio al 2 % y EDTA 1 mM, en esta ocasión en un litro de esta solución y durante 15 minutos y removiéndolas continuamente. Esta operación se realizó dos veces. Posteriormente, se lavaron y se enjuagaron las membranas de diálisis (aproximadamente tres veces) con agua Elix. Después se hirvieron 10 minutos en agua Elix. Se repitió este último paso, y para finalizar, se almacenaron en 1 litro de agua Elix y azida sódica 0,1 g a 4 °C, hasta su uso.

Se debe tener en cuenta que antes de utilizar estas membranas es necesario lavarlas perfectamente tanto por dentro como por fuera con agua Elix.

El manejo de las membranas de diálisis debe realizarse con guantes.



Fig. Me6. Membranas de diálisis antes de su tratamiento

4.8. Diálisis de los extractos de hongos

Se toman las membranas de diálisis preparadas en tiras de 50 cm. en agua Elix con azida sódica y se cortan de acuerdo con el volumen de extracto a dializar.

Antes de utilizar las membranas, se lavó el interior y el exterior de las membranas con agua Elix. Una vez estuvieron completamente lavadas, se fueron incorporando los extractos de setas a las membranas para, finalmente, anudarlas dejando una pequeña cámara de aire e introducir las en dos litros de agua Elix con agitación constante y una temperatura de 4 °C.

Para llevar a cabo la diálisis se realizaron 4 cambios del agua Elix con un intervalo de 4 horas como mínimo entre cada cambio de agua.

Una vez realizados los 4 cambios, se sacaron las bolsas de diálisis y se secaron cuidadosamente con papel absorbente

Para extraer el contenido, se cortaron las bolsas por uno de sus extremos y se fueron vaciando con una pipeta automática. Los extractos dializados fueron alicuotados en tubos eppendorf de 1,5 ml y guardados a -24°C hasta su uso.



Fig. Me7. Muestras dializándose.

4.9. Medida de la concentración de proteínas por el método Kalb & Bernlohr

La concentración de proteínas en los extractos de hongos se determinó con la fórmula descrita en 1977 por Kalb y Bernlohr.

$$[\text{Proteína}] = 183 (A_{230} - A_{320}) - 75,8 (A_{260} - A_{320}) = \mu\text{g/ml}$$

La fórmula está basada en la medición espectrofotométrica a diferentes longitudes de onda de las muestras.

En este caso, A_{230} , A_{260} y A_{320} corresponden con las medidas de la absorbancia de la muestra en una solución de PBS a las longitudes de onda 230, 260 y 320 nm respectivamente.

Para la medida de las absorbancias se utiliza un espectrofotómetro HELIOS α Termo y una cubeta de cuarzo Hellma con un paso de luz de 10 mm.

El espectrofotómetro se ajusta a absorbancia cero para las longitudes de onda 230, 260 y 320 nm con la solución de PBS debido a que es lo que tomamos como blanco. Una vez realizado, se diluye la muestra correspondiente añadiendo 5 μl de extracto a 600 μl de PBS.

4.10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

La electroforesis es definida como el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. La movilidad de las partículas está determinada de forma proporcional al voltaje aplicado y la carga neta de la molécula y de

4. MÉTODOS

forma inversamente proporcional a la fricción de la molécula (dependiente de la forma y tamaño de dicha molécula).

En este trabajo se aplica el método descrito por Laemmli en 1970 en el que se emplean geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).

El gel de poliacrilamida está compuesto por acrilamida/bisacrilamida, tampón que en este caso es Tris-HCl, persulfato amónico como agente iniciador, TEMED (N, N, N, N'- tetrametil-etileno diamina) como catalizador y SDS 10% como detergente aniónico. Además se necesita una fuente de alimentación, una cubeta y el tampón tanto de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1 % (p/v)) como el de la muestra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2 % (p/v), glicerol 10 % (v/v) y 0,025 % (p/v) de azul de bromofenol en una proporción 3:1). Se utilizó un sistema de Amersham Biosciences.

Antes de comenzar la electroforesis se deben limpiar tanto los cristales como el peine y los separadores que vayamos a utilizar con acetona a fin de eliminar cualquier resto de suciedad, o de poliacrilamida de un gel anterior, que pudiera obstaculizar el avance de las proteínas a lo largo del gel.

Una vez hemos limpiado el material, se montan los cristales con los separadores en el soporte y se prepara el gel de poliacrilamida. Este gel está formado por una primera fase inferior denominada gel de resolución o separador cuya composición varía en función del tamaño de las proteínas con las que vayamos a trabajar, en este caso elegimos un gel con un porcentaje de poliacrilamida del 15%. La segunda fase superior se denomina gel compactador o gel de *stacking* formado con un 4% de poliacrilamida.

4. MÉTODOS

Para el gel separador se prepara una mezcla de un 15% (p/v) de acrilamida/bisacrilamida (37, 5:1), Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,1 % (p/v) y TEMED 0,07 % (v/v). Una vez finalizada, se va echando con ayuda de una pipeta entre los dos cristales dejando una distancia de unos dos centímetros del borde del cristal. Se adicionan 200 μ l de butanol para que el frente quede recto. Se deja transcurrir un tiempo para que gelifique el gel y se lava varias veces con agua Elix para eliminar posibles restos de butanol.

A continuación, se prepara el gel compactador, en este caso la composición es 4 % (p/v) de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,08 % (p/v) y TEMED 0,08 % (v/v). Una vez se ha añadido esta mezcla entre los dos cristales, se coloca el peine, cuyo tamaño variará en función del número de muestras con las que vayamos a trabajar.



Fig. Me8. Gelificación del gel compactador.

4. MÉTODOS

Después de que haya polimerizado el gel, se retira el peine y se lavan los pocillos con agua Elix para eliminar los restos de poliacrilamida que hayan quedado.

Previamente a cargar las muestras, éstas se incuban durante 3 minutos a 100 °C. En los casos en los que se precisa reducir las proteínas, se añade 2-mercaptoetanol. Posteriormente se centrifugan y se cargan las muestras en los pocillos.

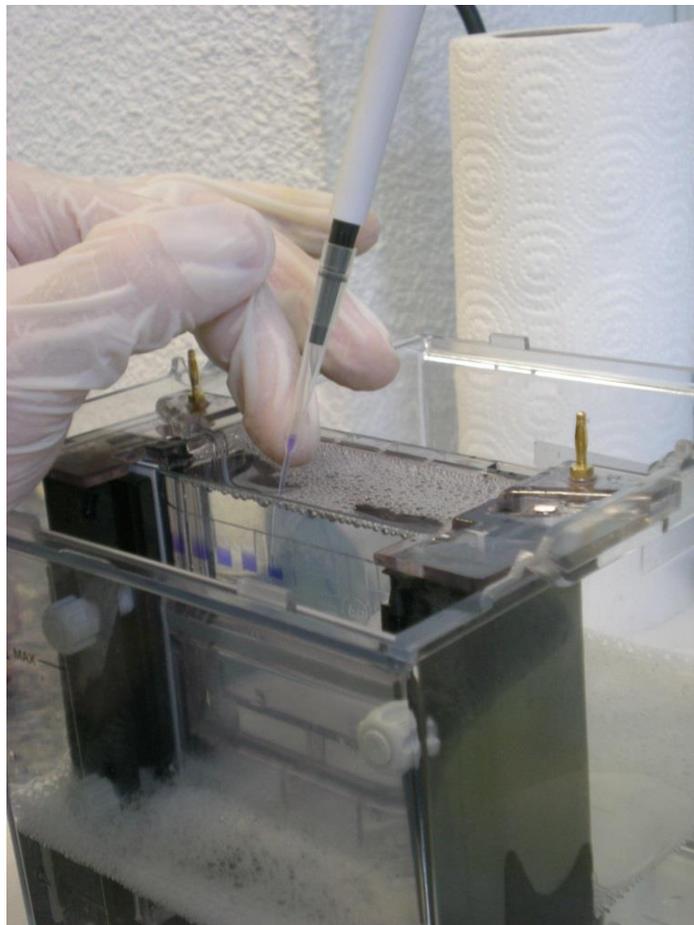


Fig. Me9. Carga de las muestras en los pocillos

La electroforesis se realiza en condiciones de temperatura ambiente (unos 20 °C), una diferencia de potencial entre electrodos de 120 V, una

4. MÉTODOS

intensidad de corriente de 25mA por gel y en tampón de electroforesis. Se termina la electroforesis cuando el frente, visible por el azul de bromofenol, se acerca al final del gel (borde inferior).



Fig. Me10. Comienzo de la electroforesis.



Fig. Me11. Final de la electroforesis

Para la detección de las proteínas, el gel se tiñe con una solución formada por 1% del colorante azul de Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% de metanol y 10% de ácido acético filtrada previamente con dos capas de papel de filtro. La tinción se lleva a cabo en un agitador basculante Rocker 25 (Labnet) que produce movimiento de forma continua de 40 r.p.m. durante aproximadamente 14 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se destiñe el gel con una solución de 7% de ácido acético y 5% de metanol, colocado en el mismo agitador. Se deben realizar cambios periódicos de esta solución hasta que se haya producido una decoloración del gel que nos permita visualizar perfectamente las distintas bandas de las proteínas teñidas.

Para digitalizar los geles se escanearon utilizando un escáner convencional, modelo CanonScan Lide 200, acoplado a un ordenador ASUS A53S.

4.11. Digestibilidad *in vitro* de las proteínas con pepsina

La digestión de las proteínas de las setas se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Koppelman y cols. (2010) con algunas modificaciones.

La digestión enzimática con pepsina se llevó a cabo simulando las condiciones del interior gástrico. Para este fin, se incubaron las muestras a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30 y 60 minutos) a una temperatura de 37 °C en una solución de pepsina 20 mg/ml en SGF (*Simulated Gastric Fluid*). El SGF está compuesto por HCl 0,063N y NaCl 30mM ajustado a un pH 1,2. La pepsina se disuelve inmediatamente antes de realizar la incubación a fin de evitar la pérdida de actividad por autodigestión de la pepsina.

La reacción se detuvo añadiendo 27 µl de Na₂CO₃ 200mM y 2 µl de agua Elix y agitando inmediatamente.

4. MÉTODOS

Una vez transcurrida la digestión, se tomaron 18 μ l de cada muestra y se mezclaron con 6 μ l de tampón de electroforesis, se hirvieron las muestras durante 2 minutos para desnaturalizar las proteínas y se cogieron 15 μ l de estas muestras para realizar un análisis electroforético en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (tal y como se ha explicado en el apartado 4.11). Tras el teñido y el desteñido del correspondiente gel electroforético se pudo observar la degradación de la proteína. Como control positivo de la degradación se incluyó BSA al 1% incubado durante 30 minutos.

Además como marcador se empleó una mezcla de las siguientes proteínas:

- SELfd 4,45 mg/ml.
- Ebulina f 2,38 mg/ml.
- Albúmina 10 mg/ml.
- Nigrina b 2,73 mg/ml.
- SNA IV 4,9 mg/ml.
- Lactoalbúmina 5 mg/ml.
- Inhibidor de tripsina 5 mg/ml.

5. RESULTADOS

5.1. Determinación de las cenizas de las muestras

La determinación del contenido de cenizas en los hongos se realizó conforme al procedimiento explicado en el apartado 4.3.

En la tabla 1 se detalla el porcentaje de cenizas de las muestras de sombrero y pie de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Sarcodon imbricatum*, referidas tanto al peso fresco como al peso seco de las setas.

Tabla 1. Cenizas de las muestras de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Sarcodon imbricatum* expresadas en porcentaje \pm desviación estándar.

Seta	Sombrero		Pie	
	Peso fresco	Peso Seco	Peso fresco	Peso Seco
<i>Agaricus bisporus</i>	0,82 \pm 0,11	10,77 \pm 1,51	0,52 \pm 0,18	7,24 \pm 2,54
<i>Pleurotus eryngii</i>	1,31 \pm 0,47	11,50 \pm 4,12	0,88 \pm 0,10	8,84 \pm 1,00
<i>Sarcodon imbricatum</i>	1,53 \pm 0,31	13,09 \pm 2,63	0,36 \pm 0,05	3,06 \pm 0,44

Las cenizas resultantes de la incineración de las muestras corresponden esencialmente al contenido en minerales de las setas. En vista de los resultados se puede determinar que el sombrero de las tres setas contiene más minerales que el pie, siendo especialmente notable esta diferencia en *Sarcodon imbricatum* y en *Pleurotus eryngii*.

5.2. Determinación de la humedad de las muestras

El contenido de humedad de las muestras de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Sarcodon imbricatum* se cuantificó siguiendo las indicaciones mencionadas en el apartado 4.4.

Los resultados de la humedad de las muestras, separadas en sombrero y pie, se representan en la tabla 2.

Tabla 2. Humedad de las muestras de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Sarcodon imbricatum* expresadas en porcentaje \pm desviación estándar.

Seta	Sombrero	Pie
<i>Agaricus bisporus</i>	92,43 \pm 0,53	92,86 \pm 0,08
<i>Pleurotus eryngii</i>	88,63 \pm 0,98	90,03 \pm 2,32
<i>Sarcodon imbricatum</i>	88,33 \pm 1,36	88,23 \pm 0,27

Se observa que el pie tiene ligeramente menor porcentaje de humedad que el sombrero. En la determinación de la humedad se debe tener en cuenta que los resultados son variables debido a que las características de las setas son susceptibles a cambios en la superficie del suelo, a las condiciones pluviométricas y a las variaciones de temperatura del terreno donde crecen. Otro factor es el estadio de crecimiento y la antigüedad del ejemplar.

5.3. Determinación de proteínas por el método del biuret

El procedimiento empleado en este trabajo para determinar el contenido de proteínas de las muestras de setas fue el método de biuret, descrito en el apartado 4.6.

En primer lugar se realizó la curva de calibrado con una disolución de BSA 10mg/ml y posteriormente se efectuó el ensayo con las muestras, obteniendo los resultados presentados en la tabla 3.

Tabla 3. Contenido en proteínas de las muestras de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Sarcodon imbricatum* expresadas en porcentaje.

Seta	Sombrero	Pie
<i>Agaricus bisporus</i>	1,52	1,05
<i>Pleurotus eryngii</i>	1,52	1,23
<i>Sarcodon imbricatum</i>	2,27	2,90

Agaricus bisporus y *Pleurotus eryngii* presentan un contenido proteínico similar (*A.bisporus* 1,52% en sombrero, 1,05% en pie; *P.eryngii* 1,52% en sombrero y 1,23% en pie) mientras que *Sarcodon imbricatum* tiene mayor valor proteínico (2,27% en sombrero y 2,90% en pie). Cabe destacar que en las dos primeras muestras el contenido en proteínas es mayor en la parte del sombrero que en el pie, sin embargo el pie de *S.imbricatum* presenta mayor porcentaje proteínico que su sombrero.

5.4. Determinación de los perfiles proteínicos de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Sarcodon imbricatum*

Para la determinación del perfil proteínico de las muestras se realizaron análisis electroforéticos en gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS, tal y como se explica en el apartado 4.10. Además se calculó la masa molecular las proteínas más relevantes (numeradas del 1 en adelante), de acuerdo a las masas relativas de los marcadores utilizados en las electroforesis.

5.4.1. Perfil proteínico de *Agaricus bisporus*

Las proteínas fueron numeradas del 1 al 13. En la figura R1 se aprecia que las proteínas que contiene el pie de *A.bisporus* aparecen también en sombrero, en menor concentración que en el pie. Además en el sombrero se muestran proteínas que no se distinguen en el pie, algunas de ellas muy marcadas, como las proteínas Ab4, Ab5 y especialmente Ab7.

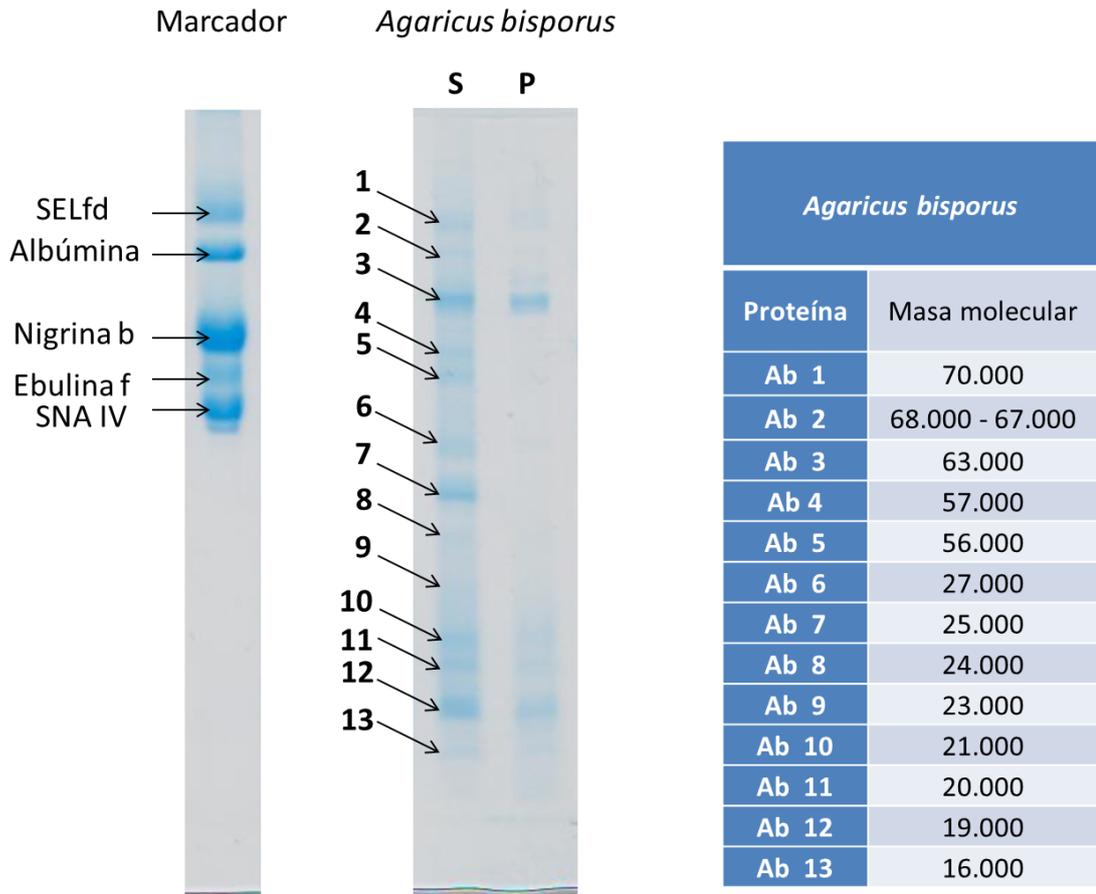


Fig. R1. Perfil proteínico del sombrero (S) y del pie (P) de *Agaricus bisporus*. Marcador: SELfd (68.000), albúmina (67.000), nigrina b (58.000), ebulina f (56.000) y SNA IV (30.000).

5.4.2. Perfil proteínico de *Pleurotus eryngii*

Las proteínas se numeraron del 1 al 18. En este caso el perfil proteínico del sombrero y del pie es muy similar, ambos poseen las mismas proteínas, sin embargo en algunos casos varía la intensidad de su banda, siendo más intensas en el caso del sombrero.

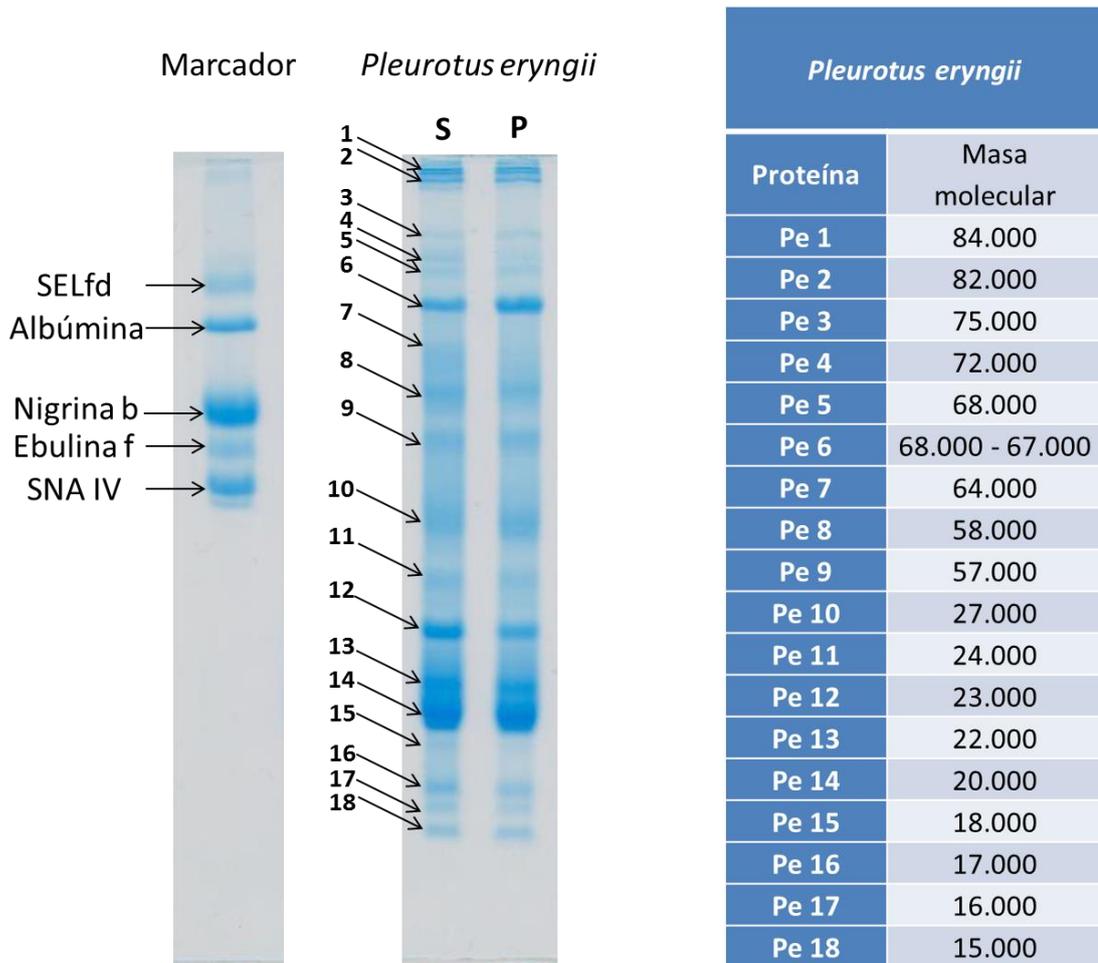


Fig. R2. Perfil proteínico del sombrero (S) y del pie (P) de *Pleurotus eryngii*. Marcador: SELfd (68.000), albúmina (67.000), nigrina b (58.000), ebulina f (56.000) y SNA IV (30.000).

5.4.3. Perfil proteínico de *Sarcodon imbricatum*

Las proteínas se numeraron del 1 al 17. Como refleja la figura R3, el sombrero de *S.imbricatum* posee un grupo de proteínas que no aparecen en el pie (Si9, Si10, Si11, Si13) además de otras proteínas que aparecen con mayor intensidad (Si2, Si3, Si7, Si14, Si15, Si16 y Si17).

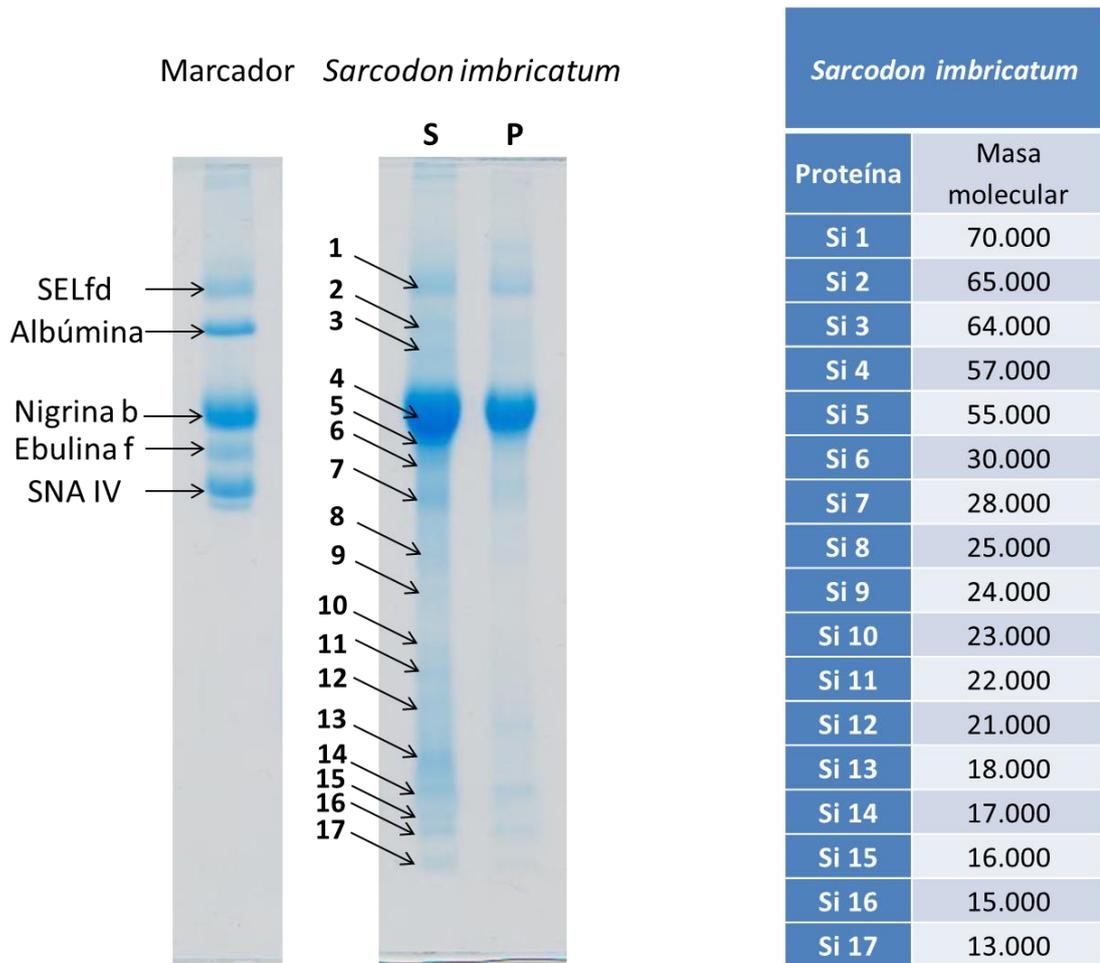


Fig. R3. Perfil proteínico del sombrero (S) y del pie (P) de *Sarcodon imbricatum*. Marcador: SELfd (68.000), albúmina (67.000), nigrina b (58.000), ebulina f (56.000) y SNA IV (30.000).

5.5. Digestión con un fluido gástrico simulado del extracto acuoso del sombrero de *Agaricus bisporus*

Una vez establecido el perfil proteínico de *Agaricus bisporus* se procedió al estudio de la estabilidad del extracto acuoso de su sombrero frente a un fluido gástrico simulado constituido por pepsina en medio salino-ácido-clorhídrico. Después se revelaron los resultados mediante la realización de un análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS en condiciones no reductoras, figura R4.

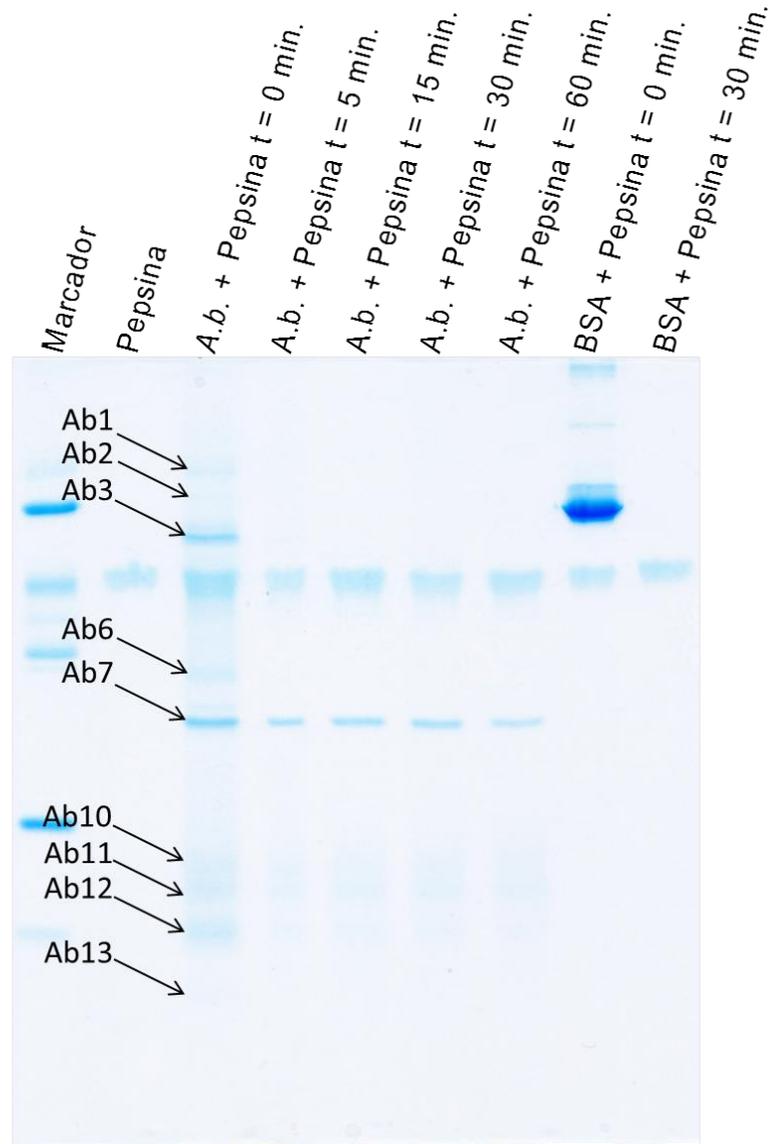


Fig. R4. Digestibilidad de las proteínas de *Agaricus bisporus*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS y en condiciones no reductoras. Muestras incubadas durante 1 hora a 37 °C con pepsina. En la calle 1 se encuentran los marcadores moleculares: SELfd (68.000), albúmina (67.000), nigrina b (58.000), ebulina f (56.000), SNA IV (30.000), inhibidor de tripsina (20.000) y lactoalbúmina (14.000). La cantidad de proteína colocada en cada pocillo fue de: 300 µg de pepsina, 17,30 µg de proteína de *A. bisporus* y 50 µg de BSA.

5.6. Digestión con un fluido gástrico simulado del extracto acuoso del sombrero de *Pleurotus eryngii*

Se determinó la digestibilidad con pepsina ácida de las proteínas del sombrero de *Pleurotus eryngii* a tiempos 0, 5, 15, 30, 60 minutos. Posteriormente se revelaron los resultados mediante la realización de un análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS en condiciones no reductoras, figura R5.

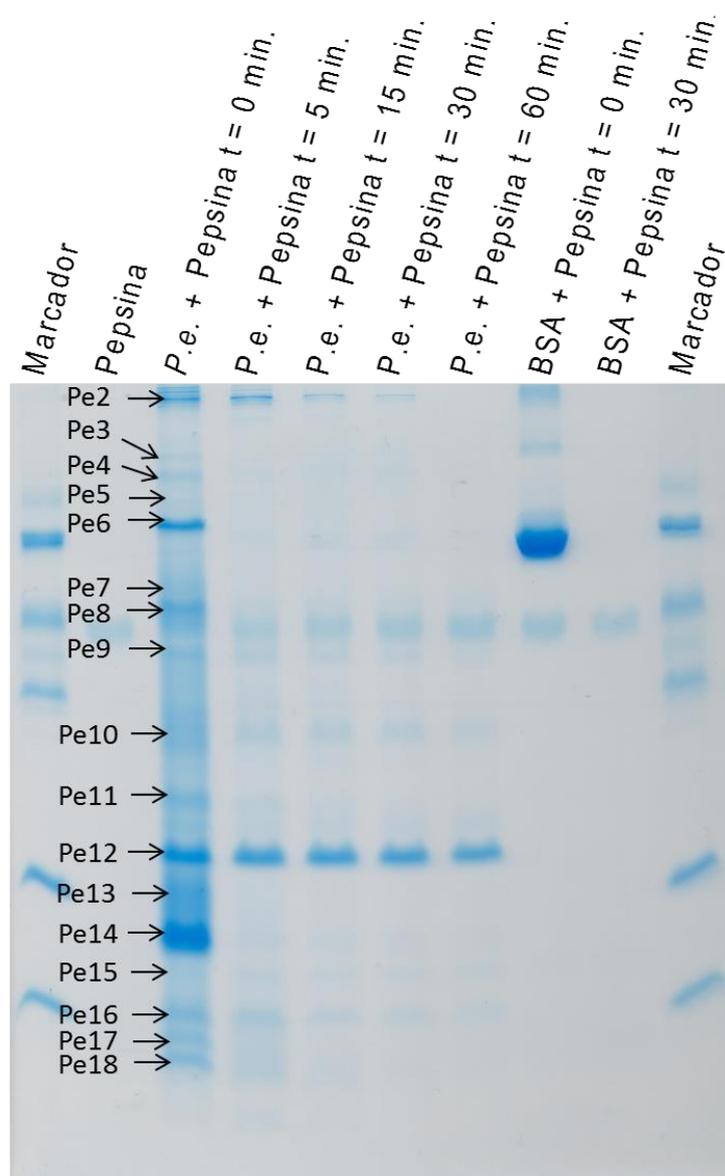


Fig. R5. Digestibilidad de las proteínas de *Pleurotus eryngii*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS y en condiciones no reductoras.

Muestras incubadas durante 1 hora a 37 °C con pepsina. En las calles 1 y 10 se encuentran los marcadores moleculares: SELfd, albúmina, nigrina b, ebulina f, SNA IV, inhibidor de tripsina y lactoalbúmina. La cantidad de proteína colocada en cada pocillo fue de: 300 µg de pepsina, 40,50 µg de proteína de *P. eryngii* y 50 µg de BSA.

Se observó degradación total en la mayoría de las bandas, ya a los 5 minutos de la incubación con el enzima, a excepción de las bandas: Pe10, Pe12 y Pe16. La resistencia más notable fue la de Pe12.

5.7. Digestión con un fluido gástrico simulado del extracto acuoso del sombrero de *Sarcodon imbricatum*

Se realizó la digestión de las proteínas del sombrero de *Sarcodon imbricatum* en un fluido gástrico simulado a tiempos 0, 5, 15, 30, 60 minutos. Después se revelaron los resultados mediante la realización de un análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS en condiciones no reductoras, figura R6. Además se realizó otro análisis electroforético en condiciones reductoras en presencia de 2-mercaptoetanol, figura R7.

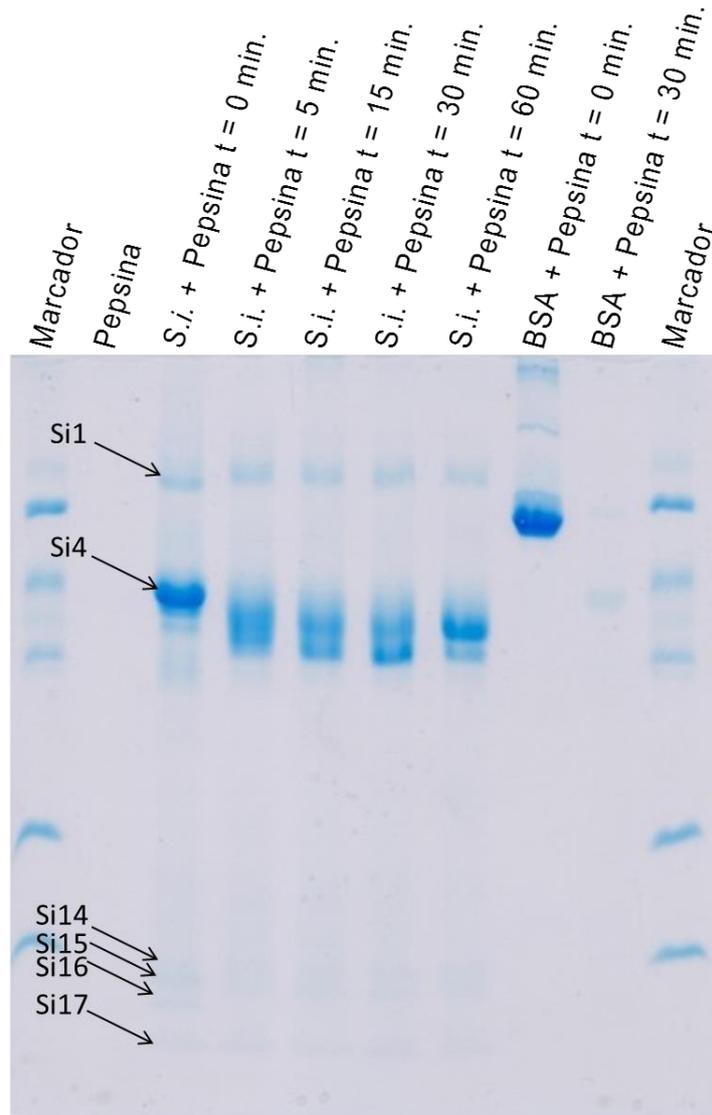


Fig. R6. Digestibilidad de las proteínas de *Sarcodon imbricatum*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS y en condiciones no reductoras. Muestras incubadas durante 1 hora a 37 °C con pepsina. En las calles 1 y 10 se encuentran los marcadores moleculares: SELfd, albúmina, nigrina b, ebulina f, SNA IV, inhibidor de tripsina y lactoalbúmina. La cantidad de proteína colocada en cada pocillo fue de: 300 µg de pepsina, 12,28 µg de proteína de *S.imbricatum* y 50 µg de BSA.

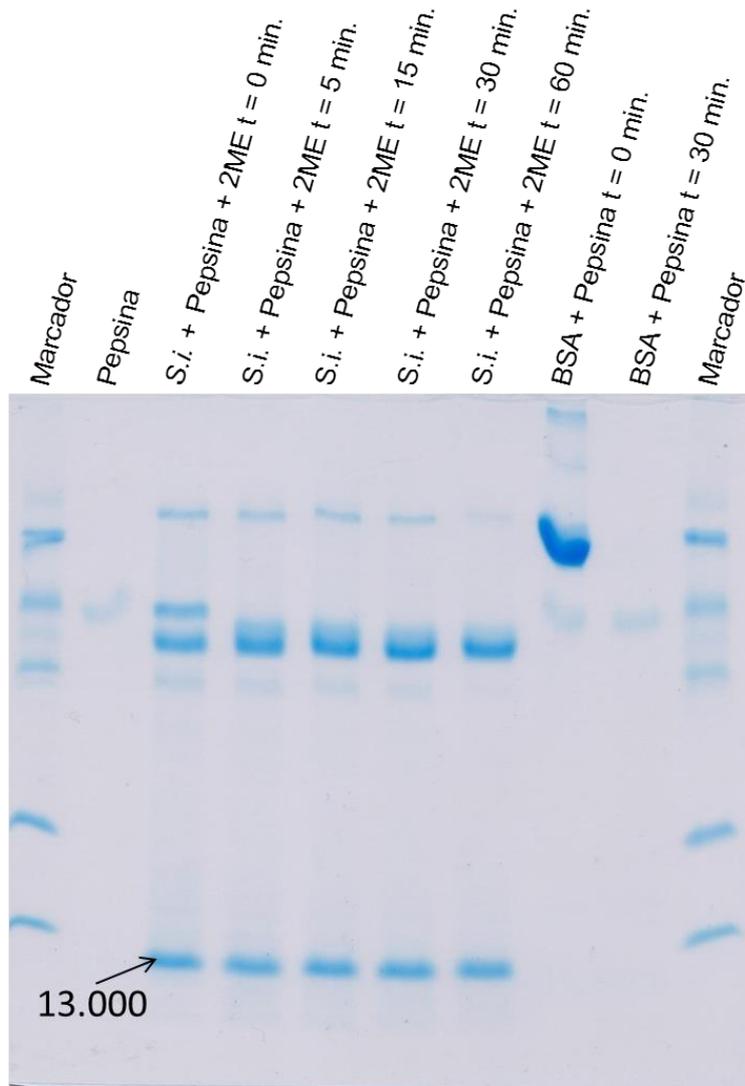


Fig. R7. Digestibilidad de las proteínas de *Sarcodon imbricatum*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS y en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol. Muestras incubadas durante 1 hora a 37 °C con pepsina. En las calles 1 y 10 se encuentran los marcadores moleculares: SELfd, albúmina, nigrina b, ebulina f, SNA IV, inhibidor de tripsina y lactoalbúmina. La cantidad de proteína colocada en cada pocillo fue de: 300 µg de pepsina, 12,28 µg de proteína de *S.imbricatum* y 50 µg de BSA.

Se observó resistencia en las proteínas: Si1, Si15, Si16 y Si17. En ausencia de 2-mercaptoetanol se observó que la hidrólisis rindió una banda ligeramente por debajo de la banda Si5 que posteriormente desaparece en

5. RESULTADOS

presencia de 2-mercaptoetanol. En presencia de 2-mercaptoetanol aparece además una banda de Mr 13.000, además resistente a la acción de la pepsina.

6. DISCUSIÓN

Es la primera vez que se obtienen perfiles proteínicos de las especies *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* y *Sarcodon imbricatum*.

Este trabajo es una forma de iniciar el estudio proteínico de hongos para identificar y caracterizar las distintas proteínas y su sensibilidad a los enzimas proteolíticas y su carácter potencialmente alergénico y tóxico.

El análisis electroforético de los extractos de las setas ha permitido revelar las proteínas que contienen estos hongos. Analizando las figuras R1, R2 y R3 se determina que existen proteínas predominantes de varias masas moleculares; en el caso de *A.bisporus*, Ab3 (63.000) en sombrero y pie, Ab7 (25.000) únicamente en sombrero y Ab12 (19.000) mayoritaria en sombrero. *P.eryngii* tiene un perfil proteínico muy heterogéneo, destacan proteínas de elevado peso molecular como Pe6 (68.000-67.000), Pe8 (58.000) y Pe9 (57.000), proteínas de peso molecular medio como Pe12 (23.000) y de bajo peso molecular, Pe14 (20.000), Pe16 (17.000) y Pe18 (15.000), todas ellas aparecen tanto en el sombrero como en el pie. Por otro lado, en el perfil proteínico de *S.imbricatum* prevalecen proteínas de elevado peso molecular como Si1 (70.000), Si4 (57.000) y Si5 (55.000), las tres en sombrero y pie y de bajo peso molecular como Si13 (18.000) en sombrero y Si14 (17.000) en sombrero y pie.

Trabajos de Astwood y cols. (1996) demostraron que en general las proteínas poco sensibles a la digestión por pepsina presentaban un carácter alergénico.

Posteriormente se ha visto que hay alérgenos con una sensibilidad relativa a pepsina (por ejemplo Vieths y cols., 2002). Los factores que determinan la sensibilidad a pepsina pueden ser muy diversos pero en general están relacionados con la estructura espacial del alérgeno y su entorno, así como con la matriz que lo contiene. Dentro de una misma planta se han

encontrado distintos alérgenos estructuralmente relacionados que presentan una sensibilidad diferente a la digestión por pepsina como por ejemplo los alérgenos del cacahuete (*Arachis hypogaea*) Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 y Ara h 6 (Koppelman y cols., 2010), frutos de *Sambucus ebulus* (Jiménez y cols., 2013) y frutos de *Sambucus nigra* (Förster-Waldl y cols., 2003).

Existen pocos estudios sobre digestibilidad de proteínas de setas. Los únicos estudios disponibles tratan sobre la calidad de las proteínas de algunas setas (Dabbour y Takruri, 2002a) y la disponibilidad de los aminoácidos procedentes de la digestibilidad *in vivo* de las mismas setas (Dabbour y Takruri, 2002b).

En el presente trabajo experimental se realizaron ensayos de digestibilidad *in vitro* con un fluido gástrico simulado de los extractos acuosos de las setas a tiempo variables y posteriormente se realizaron análisis electroforéticos para identificar los productos de la digestión.

Las proteínas Ab1, Ab2, Ab3, Ab6, Ab10, Ab11, Ab12 y Ab13 de *A.bisporus* se degradan por completo a los 5 minutos de su tratamiento con pepsina, sin embargo la banda Ab7 resiste el ataque enzimático hasta los 60 minutos.

Las proteínas de *P.eryngii* Pe2, Pe3, Pe4, Pe5, Pe6, Pe7, Pe8, Pe11, Pe13, Pe17 y Pe18 son sensibles a la pepsina y acaban por degradarse completamente a los 60 minutos. Por otro lado, las bandas Pe9, Pe10, Pe15 y Pe16 si bien son afectadas por la pepsina, no llegan a desaparecer totalmente a los 60 minutos; sin embargo la Pe12 presenta resistencia total a la acción de la pepsina.

En el caso de *S.imbricatum* la Si1 se degrada parcialmente al igual que Si6, Si14, Si15, Si16 y Si17. La proteína Si4 es muy probablemente una proteína alérgica cuyas subunidades se mantienen por puentes disulfuro,

ya que en presencia de mercaptoetanol da la banda Si5 y una banda de un peso molecular de 13.000. La degradación parcial de Si4 genera una especie molecular de masa relativa inferior que al aumentar el tiempo de incubación aumenta otra vez su masa molecular.

La explicación es consistente con que la degradación parcial de Si4 genera una proteína con un puente disulfuro intramolecular que hace que dicha proteína avance más rápidamente en el gel. En una incubación larga (60 minutos) probablemente desaparece una pequeña parte de la cadena polipeptídica que soporta la formación del puente disulfuro y provoca que se rompa éste. La consecuencia es la apertura de la cadena polipeptídica y una menor penetración en el gel, que provoca un incremento virtual de la masa relativa. Esta explicación es consistente con el hecho de que en presencia de mercaptoetanol no se forme la banda compacta.

Por otro lado en presencia de reductor se genera una proteína de Mr 13.000 que es resistente a pepsina que muy probablemente representa una subunidad de una proteína oligomérica, ya que está en la mezcla de proteínas no atacada por pepsina que en ausencia de reductor se encuentra en la zona de Mr 50.000-57.000.

Por tanto las proteínas que no se degradan por acción de la pepsina son candidatas a interactuar con la mucosa intestinal (Astwood y cols., 1996), y estimular el sistema inmune gastrointestinal de manera que muy probablemente dichas proteínas podrían presentar características alergénicas.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Las tres setas estudiadas en el presente trabajo poseen perfiles proteínicos distintos y característicos de cada una de ellas, lo que probablemente sea de gran utilidad para la identificación precisa de las setas.
2. *Agaricus bisporus* presenta mayor concentración de proteínas en el sombrero que en el pie y además algunas proteínas presentes en el sombrero están ausentes en el pie.
3. *Pleurotus eryngii* presenta las mismas proteínas en sombrero y pie y en una proporción prácticamente idéntica. Destacan por su concentración en esta seta las proteínas que hemos denominado Pe6, Pe12, Pe13 y Pe14.
4. *Sarcodon imbricatum* posee una o varias proteínas con un peso molecular muy parecido en la zona de masa relativa 55.000-57.000 que son mayoritarias y se encuentran tanto en sombrero como en pie.
5. Las proteínas mayoritarias de *Agaricus bisporus*, a excepción de Ab7, son extremadamente sensibles a la digestión en fluido gástrico simulado.
6. La digestión de *Pleurotus eryngii* en fluido gástrico simulado elimina varias proteínas mayoritarias excepto la Pe12.
7. Las proteínas de *Sarcodon imbricatum* son muy resistentes a la digestión por el fluido gástrico simulado. La proteína o proteínas mayoritarias poseen puentes disulfuro intramoleculares que determinan su despliegue tridimensional y por tanto afectan a su movilidad electroforética.
8. La resistencia a la digestión *in vitro* de proteínas de las tres setas apunta a su posible carácter alergénico *in vivo*.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Astwood J.D., Leach J.N., and Fuchs R.L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology*. 14: 1269-1273.

Barros L., Dueñas M., Ferreira I., Baptista P., Santos-Buelga C. (2009) Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms specie. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 1076-1079.

Dabbour I.R. and Takruri H.R. (2002a). Protein quality of four types of edible mushrooms found in Jordan. *Plant Foods for Human Nutrition*. 57: 1-11.

Dabbour I.R. and Takruri H.R.. (2002b). Protein Digestibility using Corrected Amino Acid Score method (PDCAAS) of four types of mushrooms grown in Jordan. *Plant Foods for Human Nutrition*. 57: 13-24.

Förster-Waldl E., Marchetti M., Schöll I., Focke M., Radauer C., Kinaciyan T., Nentwich I., Jäger S., Schmid E. R., Boltz-Nitulescu G., Scheiner O., and Jensen-Jarolim E. (2003). Type I allergy to elderberry (*Sambucus nigra*) is elicited by a 33.2 kDa allergen with significant homology to ribosomal inactivating proteins. *Clinical and Experimental Allergy*. 33: 1703-1710.

García Blanco A. y Sánchez Rodríguez J.A. (2009). *Setas de la Península Ibérica y de Europa*. Ed. Everest.

Gómez Urrutia J. (2009). *Boletín Micológico FAMCAL N°4*. Federación de Asociaciones Micológicas de Castilla y León.

Guarnizo Franco A., Martínez Yepes P.N. (2009). *Experimentos de Química Orgánica*. Ed. Elizcom.

8. BIBLIOGRAFÍA

Hawksworth, D.L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*. 95: 641-655.

Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 109: 1422-1432.

Jimenez P., Tejero J., Cabrero P., Cordoba-Diaz D., Girbes T. (2013). Differential sensitivity of D-galactose-binding lectins from fruits of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) to a simulated gastric fluid. *Food Chemistry*. 136: 794-802.

Kalac P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*. 113: 9-16.

Kalb V.F. Jr. and Bernlohr R.W. (1977). A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Analytical Biochemistry*. 82: 362-371.

Koppelman S.J., Hefle S.L., Taylor S.L. y de Jong A.H. (2010) Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 and Ara h 6: A comparative in vitro study and partial characterization of digestion-resistant peptides. *Mol. Nutr. Food Res*. 54: 1-11.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Lelley J.I. (1999). From edible to useful mushrooms--an attempt for the new economical assessment of large fungi. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 46(2-3): 205-13.

Reis F.S., Martins A., Barros L., Ferreira I. (2012). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms:

8. BIBLIOGRAFÍA

A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 1201-1207.

Venturini M.E., Reyes J.E., Rivera C.S., Oria R., Blanco D. (2011). Microbiological quality and safety of fresh cultivated and wild mushrooms commercialized in Spain. *Food Microbiology*. 28: 1492-1498.

Vieths S., Scheurer S., and Ballmer-Weber B.K. (2002). Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 964: 47-68.