



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

TRABAJO FIN DE GRADO:

“Perfil electroforético de las proteínas de la seta comestible *Coprinus comatus*”

Autora: Andrea González Rodríguez

Tutora: Dña. Pilar Jiménez López

Curso 2016-2017

1. RESUMEN

Este trabajo consiste en un estudio experimental del perfil proteico del hongo comestible *Coprinus comatus*, muy relevante por su alto valor económico y gastronómico, debido a sus propiedades nutricionales y medicinales. Los hongos son considerados alimentos funcionales, pues además de sus propiedades nutricionales, se han demostrado sus efectos beneficiosos para la salud que pueden ser utilizados en la prevención o tratamiento de enfermedades. Su acción terapéutica es atribuida a los compuestos bioactivos que poseen en sus cuerpos fructíferos.

Los hongos comestibles son bajos en calorías, aportando alrededor de 30 kcal por cada 100 g y tienen aproximadamente entre un 80 y 90% de agua. Aportan baja cantidad de grasa y gran cantidad de hidratos de carbono y fibra. Tienen del 19 al 35% de proteínas aprovechables en peso seco, en comparación con la mayoría de las frutas y hortalizas, que tienen entre 7,3 y 13,2%. Contienen tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), piridoxina (vitamina B6), y ácido ascórbico (vitamina C), entre otras, además de minerales como el fósforo, hierro, calcio y potasio. Entre las propiedades medicinales de los hongos se encuentra su capacidad antioxidante, inmunomoduladora, antialérgica, antiinflamatoria, antitumoral, antiobesidad y las complicaciones que esta conlleva.

C. comatus en particular, aporta poca cantidad de calorías y grasas, siendo el ácido oleico y linoleico los más importantes. Tiene altos niveles de proteínas, siendo de 11,84 g/100 g de peso seco, y en las que se encuentran todos los aminoácidos incluyendo los 9 aminoácidos esenciales. Está compuesto por gran cantidad de polisacáridos, fibra, manitol y trehalosa. Es rico en vitaminas y minerales. Los compuestos más importantes de este hongo son los ácidos orgánicos, fenoles, flavonoides, tocoferoles y β -carotenos, compuestos bioactivos que intervienen en las propiedades medicinales de este hongo, como antitumoral, hepatoprotector, mejora la diabetes, antiinflamatorio y antioxidante. Una de las características principales de *C. comatus* es la delicuescencia, un fenómeno de auto digestión y auto licuado, que le hace destruirse a las pocas horas de su recolección. Debido a la gran importancia nutricional y medicinal de este hongo, se ha estudiado el perfil proteico en tres estadios de *C. comatus*, hongo pequeño, maduro y delicuescente, para valorar si se producen cambios en la composición proteica durante su desarrollo.

Palabras clave: hongos, alimento, propiedades, nutricional, medicinal, delicuescencia.

1. ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
1. ÍNDICE	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 HONGOS COMESTIBLES Y PRODUCCIÓN MUNDIAL.....	3
3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS HONGOS.....	3
3.2.1 Ciclo y partes de los hongos	4
3.2.2 Alimentación de los hongos	6
3.3 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LOS HONGOS COMESTIBLES.....	7
3.4 PROPIEDADES MEDICINALES DE LOS HONGOS COMESTIBLES.....	11
3.5 <i>COPRINUS COMATUS</i> (O.F. Müll.) Pers.....	15
3.5.1 Composición nutricional de <i>C. comatus</i>	17
3.5.2 Propiedades medicinales de <i>C. comatus</i>	19
3.5.3 Delicuescencia de <i>C. comatus</i>	21
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5. RESULTADOS	30
7. DISCUSIÓN.....	36
8. CONCLUSIONES	37
9. BIBLIOGRAFÍA.....	38
10. ANEXOS.....	41

2. INTRODUCCIÓN

3.1 HONGOS COMESTIBLES Y PRODUCCIÓN MUNDIAL

Desde hace siglos, la recolección de hongos silvestres era una actividad generalmente destinada al consumo propio. Desde hace unos años, surge la necesidad de generar un aumento del comercio de este alimento para brindar ayuda a los países pobres.

En consecuencia, la recolección de estas especies comienza a ser una nueva fuente de ingresos para muchas poblaciones. Las especies más cultivadas son, el champiñón (*Agaricus Bisporus*), Shiitake (*Lentínula edodes*), seta ostra (*Pleurotus ostreatus*) y la seta Enokitake (*Flammulina velutipes*), las cuales representan el 75% de las cultivadas en todo el mundo.

Actualmente los hongos que más se exportan son los *matsutake*, rebozuelos (*Cantharellus cibarius*), hongos colmenilla (*Morchella cónica*), y otros hongos silvestres comestibles “exóticos”. La producción mundial de hongos cultivados ha ido en aumento, desde las 2.182.000 toneladas en 1986 a 7.500.000 en 2001. La producción en China en 1997 fue del 70%. El valor de la producción mundial de hongos silvestres comestibles cultivados en 2001 representa 23 millones de dólares. El valor de las tres especies más relevantes fue el siguiente: el champiñón registró 32 millares de millones en 1997, Shiitake 25 y el género *Pleurotus* 14 millares de millones. Estos datos indican que los hongos comestibles actualmente representan la mayor parte de las exportaciones de vegetales de muchos países, sobre todo de China, siendo una fuente importante de alimentación para países con pocos recursos. (1)

3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS HONGOS

Los hongos son seres vivos, que constituyen uno de los reinos de la naturaleza y han sobrevivido en el planeta Tierra desde hace más de 400 millones de años. Su importancia radica en su valor ecológico al realizar funciones importantes sobre la naturaleza y los seres humanos, prestando valor alimenticio, farmacológico y mico turístico.

Las setas que se encuentran en campos y bosques son únicamente una pequeña parte de lo que realmente forma el reino Fungi. Se piensa que solamente un 5% de este reino es conocido. Se calcula la existencia de un millón y medio de especies, de las cuales se han descrito cinco mil aproximadamente. Hasta mediados del siglo pasado se clasificaba a los hongos dentro del reino vegetal, denominándolos “plantas no vasculares”.

Robert Whittaker en 1969, tomó la iniciativa de dividir a los seres vivos en cinco reinos diferentes siendo uno aparte el de los hongos. La denominación de este reino fue la terminología latina de hongo, Fungi. La etnomicología hace referencia al término para referirse a los hongos, diferenciándolo del reino vegetal. Es común observar el uso indistinto del término “hongos” y “setas”.

Desde el punto de vista micológico es necesario diferenciar estos terminos. Las setas son una pequeña parte de un ser vivo más grande, el hongo. La seta o cuerpo fructífero es aquella parte del hongo que se encuentra a ras de suelo. El hongo es algo más complejo, formado por un entramado de estructuras bajo tierra, además del cuerpo fructífero. (2)

3.2.1 Ciclo y partes de los hongos

Para explicar lo que es un hongo y como se desarrolla, se describe el ciclo típico de uno, comenzando por las esporas. Las esporas son células especializadas que tienen la misma función que las semillas en las plantas.

Cuando las condiciones son favorables, es decir, adecuada humedad, temperatura, luz y nutrientes entre otras, las esporas germinan dando lugar a las hifas. Estas son estructuras filamentosas que constituyen la unidad estructural fundamental de la mayoría de los hongos. Las hifas se forman dando lugar a ramificaciones denominadas micelio primario, que es microscópico. Por regla general, el extremo del filamento obtenido de una espора, se une con el extremo de un filamento emitido por otra espора. De este punto de fusión parte un filamento resultado de los dos precedentes, el micelio secundario, que se ramifica considerablemente formando un entramado cerca de la superficie del suelo o bajo la corteza de los árboles, llamado micelio. En otoño, al levantar la capa de hojas muertas, se puede ver el micelio de este entramado, normalmente blanco. En algunos periodos, según las condiciones del medio u otras todavía desconocidas, los filamentos se aglomeran en un punto preciso. A partir de esta acumulación nace progresivamente una forma compacta y estructurada, con un aspecto totalmente diferente: el esporocarpo, todavía llamado carpóforo, al que por comodidad se llama seta o cuerpo fructífero. El cuerpo fructífero es la estructura observable visto sobre un sustrato, medio o superficie y su función es producir esporas. Estas estructuras son estacionales, apareciendo sólo en ciertas épocas del año al contrario del micelio, que permanece sobre el sustrato incluso durante cientos de años.

La parte fértil de la seta, el himenio, va a producir esporas, que se dispersan por el agua, viento, insectos u otros. Según las especies, tiene forma de laminillas, de tubos

o de agujones. En las setas que no tienen la forma clásica (pie y sombrero), el himenio está situado en el fondo de la copa de las pezizas, setas del orden pezizal o encerrado en el interior de la seta bola (*Lycoperdon perlatum*). Su forma y sus características microscópicas constituyen una de las bases de la clasificación de las setas.

Las esporas, una vez liberadas, germinarán y cerrarán el ciclo. Estas, que son individualmente invisibles a la vista, forman en masa un polvo extremadamente fino de colores diversos. La seta, tal como la vemos, no es más que el aparato reproductor de un ser vivo cuya parte vegetativa y perenne esta oculta bajo la forma de filamentos en el suelo o en otros sustratos. La seta puede también reproducirse de forma asexual. El filamento se fragmenta, como un esqueje de la planta, para que nazca otro individuo. Asimismo, las esporas también pueden formarse directamente en el micelio, sin pasar por el estado de carpóforo.

La finalidad de una seta es producir y dispersar las esporas, su forma indica los diferentes métodos utilizados para conseguirlo. En las setas pezizas con forma de copa, el himenio tapiza el interior. En las clavarias, recubre toda la superficie de las "ramas". En el hongo *Lycoperdon perlatum*, está encerrado en el interior y las esporas son expulsadas en la madurez. Finalmente, en los hongos en forma de costra que crecen sobre madera muerta como los del género *Corticium*, el himenio recubre la mayor parte de la superficie. (3)

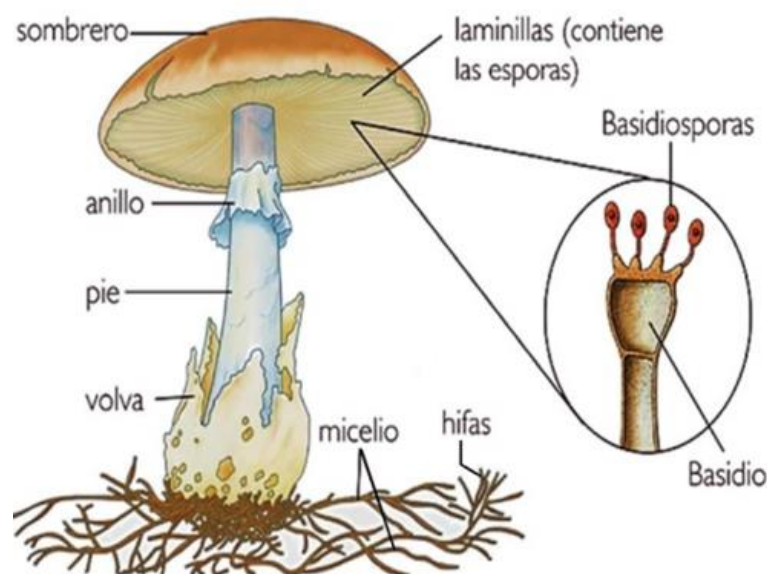


Figura 1. Esquema de las partes de un hongo.

Imagen extraída de <http://tajtajr.blogspot.com.es/>

3.2.2 Alimentación de los hongos

Muchas investigaciones atribuyen a los hongos más cercanía al mundo animal que al vegetal. Esto se debe por una parte a la forma de alimentación heterótrofa de ambos y la posesión de quitina que forma las paredes celulares de los hongos y el exoesqueleto de los artrópodos. Mientras los animales se alimentan por ingestión, las plantas sintetizan sus alimentos a partir de compuestos inorgánicos y los hongos se alimentan por absorción. Estos realizan una digestión externa mediante la secreción de enzimas sobre el sustrato en el que viven para poder absorber los nutrientes que necesitan. Existen tres grupos con distintas maneras de alimentación en el reino Fungi, y se clasifican en saprófitos, simbióticos y parásitos.

Hongos saprófitos: Son un grupo de hongos, que dependen de la colonización de materia orgánica inerte, ya sea madera en estado de putrefacción o demás sustancias orgánicas encontradas en los suelos. Entre las setas cultivadas, el champiñón ocupa el 85% de la producción. En España se consumen 1,8 kg por persona al año y aporta 23 Kcal por 100 g. La seta de ostra es la más consumida después del champiñón (13.000 toneladas al año). Pertenecen a la misma familia que la seta de cardo y aporta 26 Kcal por 100 g, es rica en proteínas, fibra y minerales. Las otras variedades de setas saprófitas son las denominadas exóticas y la principal es la seta *shiitake*. Esta es la tercera en consumo y proporciona 34 Kcal por 100 g, contiene todos los aminoácidos esenciales, es rica en hierro, calcio, cinc, vitaminas del grupo B, vitamina E, provitamina D y ácidos grasos insaturados. Otras setas cultivadas son la seta de cardo (*Pleurotus eryngii*), la seta de chopo (*Agrocybe aegerita*) y la seta de pie azul (*Lepista nuda*). Su producción tiene una gran limitación y es que necesitan continuamente el aporte de materia orgánica adecuada para cada tipo.

Según el sustrato en el que se desarrollan los hongos se denominan de formas distintas. Hay cuatro tipos: hongos coprófilos, hongos pirófitos, hongos lignícolas y humícolas.

Hongos coprófilos: Crecen sobre excrementos de determinados animales, particularmente de herbívoros. Géneros característicos de estos sustratos son Coprinus, Panaeolus, Stropharia, Anellaria, etc.

Hongos pirófitos: Son los hongos encontrados sobre materia orgánica carbonizada después de un incendio forestal, soportando sustratos básicos y con pH elevado.

Hongos lignícolas: El hongo ataca la madera de forma progresiva dependiendo del grado de descomposición en el que se encuentre.

Hongos humícolas: Se desarrollan sobre el humus y los hongos más destacados en este grupo son los del género Agaricus, Calocybe gambosa Marasmius oreades y la seta de cardo.

Hongos simbióticos: Estos hongos establecen un tipo de asociación simbiótica entre un hongo (*mycos*) y las raíces de las plantas (*rhyzos*) denominada micorriza, teniendo ventajas ambos. El hongo absorbe carbohidratos de las raíces de los árboles y los hongos aportan a las plantas absorción de agua y nutrientes (nitrógeno y fósforo), producción de reguladores de crecimiento (fitoquinas) y protección contra enfermedades. Los hongos simbióticos más importantes económicamente, son los géneros *Boletus*, *Tuber* y *Cantharellus*. El níscalo es el hongo simbiote más consumido. Otro hongo muy apreciado por su sabor es la trufa. La trufa blanca es la más apreciada. Por último, la seta de calabaza (*Boletus edulis*) una de la más sabrosas de las que se consumen un millón de kilos al año.

Hongos parásitos: Los hongos parásitos, son aquellos que se desarrollan y viven sobre tejidos vivos. Pueden ser facultativos, los que crecen sobre materia muerta tanto de forma natural como artificial, considerando a estos últimos como saprófitos y los hongos parásitos obligados aquellos que no pueden desarrollarse en medios artificiales. Desde el punto de vista nutritivo, pueden ser biotróficos al obtener el sustrato de células vivas, o necrotróficos los que en primer lugar destruyen la célula y posteriormente absorben sus nutrientes. Estos hongos a menudo causan daño sobre el hospedante y se denominan patógenos. La mayoría de los hongos patógenos, pertenecen al orden de los *Aphyllophorales*, particularmente a las familias *Ganodermataceae*, *Steraceae*, y *Polyporaceae*. Existen pocos parásitos pertenecientes al orden *Agaricales*, es decir, con forma de seta común, la más representativa es el grupo de *Armillari amellea*. (4)

3.3 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LOS HONGOS COMESTIBLES

Energía y humedad: Entre las propiedades nutricionales de los hongos destaca su bajo aporte calórico, siendo entre 26 y 35 Kcal por cada 100 gramos, por lo que si son integrados en la dieta, pueden contribuir a la disminución de la prevalencia de obesidad y sobrepeso en la población.

Diferentes factores hacen que los hongos comestibles tengan una corta vida útil, como son el bajo contenido en materia seca, que es de 60 a 140 g/kg, bajo contenido en cenizas, siendo de 0,89 g/100 g, su alto contenido en agua y actividad de agua, siendo 88 g/100 g el contenido en humedad.

Proteínas y aminoácidos: La calidad proteica de los hongos, es mejor que la de la mayoría de los vegetales. Las proteínas son elementos fundamentales de los hongos, al contribuir en el sabor, valor nutricional, y propiedades antioxidantes. La concentración de proteína cruda es de 22,8 a 24,9 g por 100 g de materia seca (MS), representando aproximadamente el 24% del contenido total de MS. Dentro del

contenido proteico total, un 24% corresponde a la fracción de albuminas, el 11.5% al contenido de globulinas, 11.5% son glutelinas, 7,4% es material similar a glutelinas, 5,7% es material similar a prolaminas y el 5,3% son prolaminas. La concentración de proteínas varía dependiendo del sustrato de crecimiento, tamaño, tiempo de la cosecha y disponibilidad de fuentes de nitrógeno en el sustrato de crecimiento. El clima templado y lluvioso en verano y otoño, son las condiciones ideales para el crecimiento de hongos. También la proporción proteica varía dentro del cuerpo fructífero y durante el desarrollo del hongo. La mayor concentración de proteínas se encuentra en el sombrero, representando un 36.4%, mientras que en el pie se encuentra en un 11.8%. Muchos estudios han concluido que su contenido no varía durante el secado del hongo a 40°C ni en la congelación, pero si al someterlos a ebullición. (5)

La composición en aminoácidos de las proteínas de los hongos es comparable a la proteína animal y se considera un indicador fiable del valor nutritivo de los alimentos. Estos pueden clasificarse, entre otros, en aminoácidos esenciales, aquellos que no se pueden obtener a través de la dieta, y no esenciales, que son sintetizados por el cuerpo. La concentración de **aminoácidos libres** en los hongos es escasa siendo aproximadamente del 1%, por lo que la contribución nutricional es limitada, pero participan en el sabor de los hongos. Los más relevantes son el ácido glutámico, ornitina y alanina. Los **aminoácidos esenciales** constituyen el 37% de las proteínas totales. La recomendación de ingesta de aminoácidos esenciales para un adulto es de 83,5 mg / kg de peso al día. Estableciendo 60 kg como peso medio de la población, la ingesta de 300 g de champiñón diarios, supone el 95% de la dosis diaria recomendada por la FAO (Food and Agriculture Organization).

Los hongos tienen un sabor característico conocido como **umami**, que es debido a compuestos no volátiles de los hongos, aminoácidos libres y azúcares solubles. La concentración de los aminoácidos responsables del sabor suponen entre un 0,07 y 0,22 mg por 100 g de MS. El ácido glutámico con el sodio forma el glutamato monosódico, que es el responsable mayoritario del sabor umami, importante en la palatabilidad de los alimentos. El hongo Shiitake es representativo de este sabor umami. Los aminoácidos alanina, glicina, treonina y serina intervienen en el sabor dulce de las setas y suponen entre un 0,17 y 0,35 mg por 100 g de MS. Otros elementos proteicos encontrados en las setas son las aminas biogénicas, que intervienen en la descomposición proteica, como son la putrescina y la feniletilamina. También han sido encontradas aminas toxicológicamente perjudiciales como la histamina y tiramina. (6)

Hidratos de carbono: El contenido total de carbohidratos de los hongos, tanto digeribles como no digeribles, corresponde a 682 g/kg/MS, representando casi el 70% del total de MS. Entre los digeribles se encuentra el manitol, glucógeno y glucosa. El manitol tiene una concentración en los hongos de 28,9 g/kg/MS, y es muy importante al intervenir en el crecimiento volumétrico y la firmeza de los cuerpos fructíferos. El problema de este hidrato de carbono es su escaso porcentaje de digestibilidad en humanos, y su disminución en el proceso de ebullición, como pasa con la trehalosa, que tiene 39,2 g/kg/MS. El glucógeno es característico, ya que es el polisacárido de reserva principal de los hongos, a diferencia de las plantas, y representa del 5 al 10% de la MS.

Los carbohidratos no digeribles constituyen la mayor proporción e incluyen oligosacáridos como la trehalosa y polisacárido como la quitina, β -glucanos y mananos, que representan la mayor porción de carbohidratos de los hongos. La quitina es un polisacárido de estructura N-acetilglucosamida $\beta(1-4)$ ramificada, insoluble en agua y representa entre el 80 y 90% de la MS con una concentración de entre 7,6 y 98,6 g/kg/MS. Esta sustancia es indigerible, reduce la digestibilidad de otros componentes de los hongos, y su desacetilación produce citosina, base nitrogenada de los ácidos nucleicos. Se ha demostrado que los β -glucanos como lentinano y pleurano tienen efectos positivos para la salud, como protección contra el cáncer.

El contenido de carbohidratos incluye a la fibra, siendo su contenido dietético tanto soluble e insoluble de 4.2 a 9.2% y 22,4 a 31,2% de MS en los hongos. La mayor parte es fibra insoluble, siendo una ventaja nutricional, al poseer un efecto hipolipidémico al reducir significativamente los niveles totales de colesterol. Un estudio realizado en Reino Unido concluyó que el consumo de 100 g de setas frescas aporta entre 5% y 25% de la ingesta recomendada diaria de fibra, que es de 18 g de fibra al día. El contenido en hidratos de carbono complejos y fibra hace 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. (7)

Lípidos: Los hongos son en general, alimentos muy característicos por su bajo aporte de energía y cantidad de grasa. Algunos estudios han concluido que la concentración de esta es de aproximadamente entre 20 y 30 g por kilo de MS, componiéndose de esteroides, esfingolípidos y grasas. Los ácidos linolénico (C18:2c n-6) y oleico (C18:1c n-9) representan las 2/3 partes del total de ácidos grasos, siguiéndole el ácido palmítico (C16:00), formando parte de los ácidos grasos esenciales, los cuales son necesarios ingerir en la dieta, ya que el organismo no los sintetiza. Dentro de los

fosfolípidos, la fosfatidil colina es el más representativo. El contenido de ácidos grasos de cadena impar, ramificada e hidroxilada es insignificantes. Un estudio demostró, que los hongos cultivados a 17°C, tenían mayor proporción de ácidos grasos insaturados que los cultivados a temperaturas mayores. Además, estos son precursores de los demás omega 6 y 3, y de compuestos volátiles que repercuten en el flavor y de mediadores inflamatorios como el ácido araquidónico y prostaglandinas. El ergosterol es un componente de las membranas celulares de los hongos y es un precursor de la vitamina D. Otra de las actividades de los esteroides de los hongos, es la función antiproliferativa de líneas celulares de cáncer e hipolipemiente (8)

Minerales: El contenido en cenizas de los hongos es de 60 a 120 g por kilo de MS. De los microelementos, destacan cobre, selenio, hierro y cinc, siendo el más abundante el selenio y el sodio el más deficitario, importante en dietas hiposódicas. El potasio se encuentra en altas concentraciones, aportando de 20 a 40 g/kg/MS y junto al fosforo forman los minerales con niveles más altos y comparables con los vegetales. El selenio se encuentra en concentraciones medias en los hongos, siendo de 0,46 a 5,63 ppm en el champiñón, cantidad que representa el 15% de la ingesta recomendada diaria en EEUU, siendo esta de 30 a 80 µg y sus beneficios son muy importantes.

Vitaminas: Los hongos son una buena fuente de vitaminas. Las que se encuentran en mayor concentración son las vitaminas del grupo B; la riboflavina (B2) se encuentra en una concentración de 2,6 a 9 g/kg/MS, la niacina (B3) 63,8 a 83,7 g/kg/MS, tiamina (B1) 1,7 a 6,3 g/kg/MS y la piridoxina (B6) 1,4 a 5,6 g/kg/MS. El contenido en riboflavina en algunas variedades *Agaricus bisporus*, es tan alto como el que presentan huevos y quesos. El contenido en vitamina B12 en los hongos es mayor que en los vegetales. También es importante la concentración de ácido ascórbico o vitamina C y el tocoferol, representando cantidades de 150 a 300 mg/kg de materia fresca y 0,5 a 3 mg/kg/MS. Este último se encuentra en la forma predominante γ -tocoferol, en alta proporción en el *Boletus reticulatus*, siendo mayor en los hongos silvestres que en los cultivados. Los hongos contienen otra vitamina muy importante, siendo el único alimento no animal que la contiene, se trata de la vitamina D2, denominada ergocalciferol, y que interviene en la absorción y como regulador de niveles del calcio. La ingesta de esta vitamina, puede ser significativa en individuos con baja ingesta de colecalciferol o vitamina D3, como vegetarianos y veganos. Los hongos comestibles tienen otros elementos beneficiosos para la salud como son el ergosterol con cantidades de entre 640 y 1770 mg/kg/MS, potente antioxidante, y fitoesteroides con 480 a 1830 mg/kg/MS, con actividad reductora del colesterol. (9)

3.4 PROPIEDADES MEDICINALES DE LOS HONGOS COMESTIBLES

Actividad antioxidante: El organismo produce de forma natural especies reactivas del oxígeno (ROS) los conocidos como “radicales libres”, los cuales intervienen en procesos de señalización y regulación importantes. Cuando la función detoxificante no es capaz de eliminarlos, se produce el estrés oxidativo, el cual provoca daños en el ADN, lípidos y proteínas, además de causar enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes Mellitus y cáncer. Los hongos comestibles están compuestos por grandes cantidades de antioxidantes, que eliminan los radicales libres, inhibiendo reacciones de oxidación. Existen varios tipos de antioxidantes: preventivos, secuestrantes y reparadores.

Los antioxidantes preventivos, inhiben la formación de ROS y entre ellos se encuentran diferentes enzimas como la Catalasa, antioxidante que actúa reduciendo la incidencia de oxidación. Los ácidos hidroxicinámicos inhiben el estrés oxidativo al estimular la producción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). La enzima SOD, es una metaloenzima, que cataliza la dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrogeno, un compuesto menos activo, protegiendo a las células de la oxidación. La actuación de esta enzima junto con la catalasa y la glutatión peroxidasa, hace que los radicales libres, con la ayuda del glutatión reducido, se transformen de oxígeno en agua, además se ha demostrado la reducción de la apoptosis celular en el infarto de miocardio.

El selenio se trata de un antioxidante con función tanto secuestrante de radicales libres como reparador del daño. Este mineral forma parte de la enzima glutatión peroxidasa importante en los mecanismos de reparación del ADN y en la síntesis de selenoproteínas y selenoenzimas que protegen a las células de los radicales libres, aumentando la síntesis de fenoles, que protegen y disminuyen la potencia férrica y quelante de iones ferrosos. Los polisacáridos son otro tipo de antioxidante secuestrante, ya que estimulan la producción de enzimas antioxidantes y reducen la peroxidación lipídica, entre ellos los β -glucanos que mejoran el nivel antioxidante y estimulan la producción de SOD. También el Ácido Elágico, polifenol que actúa reduciendo la capacidad quelante de los metales. El azúcar ramnosa como componente de los polisacáridos intracelulares antioxidantes que eliminan hidroxilos y radicales DPPH. Otros componentes de los hongos comestibles con función antioxidante secuestrante son el ergosterol, tocoferol, ácido ascórbico, entre otras. (7)

Actividad inmunomoduladora, antialérgica y antiinflamatoria: Los hongos comestibles tienen una alta concentración de sustancias inmunomoduladoras, las cuales modifican la capacidad del sistema inmune para ejecutar ciertas funciones. Este efecto modulador, se considera un factor crítico para la protección de muchas enfermedades. Entre las sustancias inmunomoduladoras se encuentran los polisacáridos, que aumentan la actividad de linfocitos del bazo, el metabolismo de macrófagos, la proliferación de linfocitos, anticuerpos, óxido nítrico y citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), activado por el polisacárido grifolano que es producido por el hongo *Grifola frondosa*. Este polisacárido activa in vitro los macrófagos para producir el factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleuquinas IL-1, IL-6, IL-12. También se han encontrado proteínas con efecto sobre el sistema inmune. Entre las más relevantes se encuentra la proteína inmunomoduladora fúngica fve (FIP-fve), esta proteína es aislada del hongo *Flammulina velutipes* que tiene actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, y aumenta la expresión de citoquinas IL-2, IL-4, IL-2R y TNF- α . Además, induce la respuesta de th1 específica de alérgenos en los síntomas de anafilaxia, actuando como inmunoprolifáctico en la prevención de alergias alimentarias. Esta proteína tiene efecto inhibitorio de la apoptosis de eosinófilos en presencia de la citoquina IL-6, proceso causante de la inflamación en enfermedades alérgicas, por lo que sirve como tratamiento contra la inflamación de las vías respiratorias, al reducir la hipersensibilidad de estas.

Los polisacáridos también intervienen en procesos inflamatorios. Estos promueven la actividad anticplemento en el tratamiento de enfermedades como la artritis y el reuma, ya que la actividad excesiva del sistema del complemento puede causar efectos que contribuyen a las enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Estas sustancias son de alto interés farmacéutico, al tener un perfil con menor riesgo que los medicamentos químicos actuales. Se ha demostrado también, que actúan como preventivos de efectos adversos de otros medicamentos, como los utilizados en el tratamiento del cáncer. Estos protegen el hueso al reducir las vacuolas vacías en medula ósea, protegen la mucosa intestinal y evitan la reducción de glóbulos blancos al inducir la interleuquina IL-20. (10)

Actividad antitumoral: El cáncer es la segunda causa de muerte de los países desarrollados, convirtiéndose en los últimos años en una epidemia mundial. A pesar de ello, el 30% de ellos son prevenibles, si se modifican diferentes factores de riesgo, entre ellos la dieta. Los hongos contienen potentes sustancias antitumorales, y está demostrado que la ingesta habitual de hongos, reduce el riesgo de padecer ciertos cánceres.

Diferentes hongos han sido estudiados por sus efectos preventivos e inhibitorios sobre el cáncer. El género *Cordyceps* tiene efectos inhibitorios de la división y proliferación de células cancerígenas, y el champiñón blanco tiene actividad moduladora de la enzima aromatasa, reduciendo así la producción de estrógenos en mujeres postmenopausicas, actuando como agente quimiopreventivo en el cáncer de mama. Las sustancias encargadas de estos efectos son en su mayoría polisacáridos. El champiñón tiene polisacáridos que evitan la oncogénesis y previenen la metástasis, además de aumentar su actividad al ser utilizado junto a la quimioterapia, como ocurre con el β -glucano lentinano, aislado de *Lentinula edodes*, que mejora la calidad de vida de estos pacientes. Otro β -glucano relevante es el esquizofilano, del hongo *Schizophyllum commune*, que muestra beneficios en el cáncer gástrico inoperable y recurrente, e inhibe la segunda etapa del cáncer cervical.

También los síntomas del cáncer pueden ser mejorados con el polisacárido Ganopoly extraído de *Ganoderma lucidum*. El cáncer de mama es beneficiado por polisacáridos como β -glucano carboximetilado y ergosterol, componente de las membranas celulares de los hongos, que inhiben la proliferación de las células cancerígenas de mama MCF-7, al detener el ciclo celular en la fase G1 y la apoptosis de inducción. El género *Trametes* inhibe la proliferación celular del carcinoma hepatocelular y suprime el crecimiento del tumor, y en concreto el hongo cola de pavo (*Trametes versicolor*) que contiene una glicoproteína llamada PSK que mejora los efectos tóxicos de la terapia, aumenta la supervivencia, e induce apoptosis y otras formas de muerte de las células cancerosas. (11)

Antiobesidad y sus complicaciones: La obesidad es una enfermedad crónica, considerada un factor de riesgo importante en el desarrollo de enfermedad coronaria, hipertensión, insuficiencia renal, diabetes, dislipemia, entre otros. La obesidad se define como el aumento de grasa corporal debido al aumento del número o tamaño de los adipocitos, los cuales se componen de triglicéridos.

En los últimos años, diferentes estudios han demostrado los efectos beneficiosos de ciertas especies de hongos en la prevención de la obesidad y sus alteraciones. Se ha demostrado que los hongos *Agaricus bisporus* y el género *Pleurotus* reducen el nivel de triglicéridos y glucosa en sangre, inducen la lipólisis, reduciendo así el tamaño de adipocitos y el peso corporal, inhiben la diferenciación de adipocitos previniendo el aumento de peso y reducen los niveles de leptina que son elevados en la obesidad. Este efecto se debe a los polisacáridos, como el β - glucano de la seta "Shiitake" y el polisacárido PNPS-1 de la seta *Pholiota nameko*, que reduce el 55% del colesterol y triglicéridos en plasma, además de reducir el peso, la grasa en hígado y el índice

aterogénico. El ergosterol del género *Pleurotus* se comporta como un regulador del metabolismo del colesterol, al sintetizar levostatina, una estatina que inhibe la enzima HMG-CoA reductasa y aumenta la actividad de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Otra alteración de la obesidad, aparte de los niveles de lípidos en sangre, es la resistencia a la insulina. Esto se debe a cambios producidos en el metabolismo de las grasas, que inhibe la captación de insulina y también a la distribución central de la grasa, que produce un aumento de la concentración de insulina aumentando la incidencia de Diabetes Mellitus 2. De esta manera, se han estudiado los efectos de hongos como *Agaricus blazei* y *Agaricus sylvaticus*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus eryngii*, los cuales reducen la glucosa y la hemoglobina glicosilada en sangre, mejoran la función del páncreas al aumentar el número de células Langerhans y repararlas, aumentan la captación de glucosa por la liberación de glicerol y aumentan el glucógeno hepático y la concentración de insulina.

La hipertensión es una de las alteraciones con más incidencia y que provoca 9,4 millones de muertes al año al producir una serie de alteraciones como el aumento de la actividad adrenérgica y altas concentraciones de aldosterona, retención de sodio y de agua. Los hongos tienen efectos antihipertensivos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), inhibiendo el sistema renina angiotensina aldosterona. Entre los hongos destacados por esta función se encuentra la seta *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus cornucopiae*. El ácido γ -aminobutírico (GABA) también se encuentra en estas setas, y se demostró que inhibe la liberación de noradrenalina, mejorando la tensión arterial.

Muchas investigaciones se han centrado en el estudio de los hongos, debido a su importante contenido proteico, su baja cantidad de grasa y perfil lipídico excelente, el suministro de hidratos de carbono con potentes beneficios medicinales, así como vitaminas y minerales importantes. Los hongos comestibles tienen del 19 al 35% de proteínas aprovechables en peso seco, en comparación con la mayoría de las frutas y hortalizas, que tienen entre el 7.3 al 13.2%.

Por lo tanto, los hongos se pueden considerar una fuente nutritiva excelente pudiéndoles denominar alimentos funcionales. Los hongos deberían ser un alimento imprescindible en cualquier dieta, por ser un alimento de alta calidad y por el contenido en elementos bioactivos que benefician y previenen ciertas enfermedades como cáncer, diabetes, obesidad y enfermedades inflamatorias y del sistema inmune. (9)

3.5 COPRINUS COMATUS (O.F. Müll.) Pers

Coprinus comatus, hongo conocido en España como “barbuda” o “chipirón de monte”, el nombre japonés es “Sasakure Hitoyotake”, en china se denomina “Ji Tui Mo” y en inglés “Shaggy Ink cap”, nombres que se refieren a la “tinta” que desprende su sombrero.

Se trata de una especie de hongo comestible, comúnmente encontrado en todo el mundo. Es nitrófilo, ya que aparece en suelos muy ricos en nitrógeno, tales como alrededores de establos, caminos transitados por el ganado, bosques y campos. Su crecimiento es abundante en la época de primavera hasta finales de otoño.

En relación a la taxonomía micológica, se ha cuestionado mucho sobre las características morfológicas y el análisis de ADN de este género. El nombre *Coprinus comatus* apareció por primera vez en 1797, momento donde el género *Coprinus* se clasificaba en la familia *Coprinaceae*, la cual contenía más de 100 especies. Sin embargo, en los años noventa las pruebas de ADN concluyeron que el género *Coprinus* no estaba relacionado con esa especie, por lo que se formó la familia *Psathyrellaceae*, la cual contenía tres géneros: *Coprinopsis*, *Coprinellus*, y *Parasola*. De esta forma, *Coprinus comatus* se convirtió en la especie tipo para el género *Coprinus*. Posteriores análisis de ADN relacionaron de nuevo a este hongo con la familia *Agaricaceae*. Finalmente, *Coprinaceae* dejó de denominarse como familia propia, y se convirtió en sinónimo de *Agaricaceae*, y *Coprinus* se redujo a tres miembros: *C. comatus*, *C. sterquilinus* y *C. spadiceosporus*.

Este ejemplar es de difícil confusión, únicamente es posible confundirlo con *Coprinus atramentarius*, que es toxica si se consume junto a bebidas alcohólicas. El sombrero de *C. comatus*, de joven es de forma cilíndrica ovoide y evoluciona posteriormente a campanulado, con un tamaño de 3 a 8 cm de diámetro y de 5 a 20 cm de alto. Su cutícula es de color blanco, en un principio lisa y con el tiempo fibrosa al formarse grandes escamas repartidas por toda la superficie. En el ápice del sombrero, las escamas son marrones, el margen es liso y oscurecido, característica denominada delicuescencia. Esta característica, se extiende por todo el sombrero y deshace todo el cuerpo fructífero a medida que se desarrolla, convirtiéndose finalmente en tinta. Tiene numerosas láminas, anchas, muy apretadas, al principio de color blanco, pero que van cambiando a color rosa con el tiempo, y por último se ennegrecen. El pie es cilíndrico, con un tamaño de 12 a 20 cm de altura por 1 a 1,5 cm de radio, hueco, liso, frágil y blanquecino. Es característico que el pie siempre se mantiene intacto de color blanco, incluso cuando el sombrero se encuentra delicuescente. Su carne es delgada, frágil, de color blanco en su juventud, pero negra cuando crece. Su sabor y olor es ligero,

suave y agradable. Las esporas de esta especie son elipsoidales, lisas, de color negro, con un tamaño de 10 a 14 μm con poros germinativos situados en la zona apical y central.

En una entrevista el célebre restaurador del restaurante de alta cocina "Troisgros", Michel Troisgros, en Roanne (Francia), respondió que sus setas preferidas eran el rebozuelo, la barbuda y la oronja. La selección de este emérito chef alentó el cultivo de esta seta, pero el cultivo industrial se enfrenta al problema que plantea la conservación de este hongo. Numerosos ensayos, realizados en Francia especialmente, mediante frío o esterilización, permiten albergar esperanzas de que *C. comatus* pueda encontrarse en todas las buenas mesas dentro de algunos años.

Se trata de una especie no solamente comestible, sino de exquisito prestigio por su sabor, textura, calidad nutricional y propiedades medicinales. Esta seta en su estadio joven, tiene un sabor excelente, con textura tierna y delicada. En época de temporada, crecen rápidamente después de la lluvia y es de fácil cultivo, pero la delicuescencia surge en menos de 24 horas. Se debe cocinar y consumir rápidamente a las pocas horas de recolectar, ya que sus propiedades organolépticas se pierden tras el fenómeno de delicuescencia. (12)



Figura 2. Hongo *Coprinus comatus*. Foto original cedida por el prof. Tomas Girbés

3.5.1 Composición nutricional de *C. comatus*

Existen pocos estudios de la especie *C. comatus*, estos han tratado de investigar la composición química de esta seta, con el intento de clasificarla como una buena opción dietética. Se ha investigado su valor nutricional y los diferentes componentes bioactivos que tiene y que producen potentes beneficios a la salud. Este hongo es utilizado en China desde hace siglos por sus propiedades medicinales como el efecto hipoglucemiante, antitumoral y antioxidante entre otros.

Un estudio realizado en la Universidad de Belgrado (Serbia), realizó la caracterización química de *C. comatus* mediante la evaluación de nutrientes, como el valor energético, azúcares libres, ácidos grasos y tocoferoles, y no nutrientes, como ácidos orgánicos y fenólicos, además de diferenciar entre especies cultivadas y silvestres. El hongo fresco tiene un contenido de 8 a 13% de materia seca (MS) y un bajo aporte calórico, siendo de 52,5 kcal por cada 100 g de materia fresca.

El contenido de **grasa** es de 1,98 g por cada 100 g de peso seco, representando entre 1 a 5% de MS, siendo más alto en las especies cultivadas que en las silvestres. Los ácidos grasos cuantificados en mayores cantidades en *C. comatus* son el ácido palmítico (C16: 0), ácido esteárico (C18: 0), ácido oleico (C18: 1n9) y ácido linoleico (C18: 2n6), siendo los ácidos grasos saturados, ácido palmítico y esteárico, los que presentan cantidades más bajas de entre 2,09 a 12,88%. El ácido oleico (ácido graso monoinsaturado-MUFA) se encuentra en mayores porcentajes en la muestra cultivada, representando un 36,38%. El ácido linoleico (ácido graso poliinsaturado-PUFA) es el ácido graso principal presente en ambas muestras con valores de 50,49 a 64,08%. (5)

Tiene altos niveles de **proteínas**, siendo de 11,84 g /100 g de peso seco, y en este caso las especies cultivadas tienen mayor proporción. Se han encontrado los 20 aminoácidos en este hongo, incluyendo los 9 aminoácidos esenciales. En relación al porcentaje de las distintas fracciones de proteínas, un artículo de Bijana Bauer Petrovska, publicó valores de albuminas de un 14,75%, globulinas un prolaminas 5,48%, material similar a prolaminas un 5,27%, glutelinas un 6.97% y material similar a glutelinas un 4,48%. (13)

La mayor proporción de macronutrientes es de **hidratos de carbono**, mostrando unos niveles de 75,57 g/100 g de peso seco. La concentración de **polisacáridos**, elementos encargados de la mayoría de beneficios medicinales, es de 32,44 a 74,60%. Dentro de los hidratos de carbono, la **fructosa** solo se encuentra en las especies cultivadas, en una proporción de 0,11 g/100 g de peso seco. La ausencia de este monosacárido en las especies silvestres es normal al ser un hongo saprófito, ya que el cultivado obtiene este monosacárido del material en el que se cultiva. Dentro de los hidratos de carbono

se encuentra la **fibra**, con un contenido entre el 13 y 49% de MS. El **manitol y la trehalosa**, componentes muy comunes de los hongos, se detectaron en ambas especies, en una proporción de 1,41 a 8,75 g/100 g de peso seco y 5,41 a 8,75 g /100 g de peso seco respectivamente, siendo más altos los niveles de manitol en las especies silvestres y la trehalosa en las cultivadas. La proporción de azúcares libres es mayor en las especies cultivadas con un valor de 10,27 g de peso seco.

C. comatus tiene en 100 g de materia seca los siguientes **minerales y micronutrientes**: 930 mg de potasio, 7 mg de sodio, 74 mg de magnesio, 2 mg de hierro, 27 mg de calcio, 1 mg de manganeso, 1 mg de cobre y 3 mg de zinc.

Entre las **vitaminas** que contiene se encuentran 74 mg de vitamina C, 39 mg de niacina, 3 mg de vitamina B12 (riboflavina) y 1 mg de vitamina B1 (tiamina). (14)

La isoforma **α -tocoferol** sólo se encuentra en las muestras salvajes, con una concentración de 13,24 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso seco. Por otro lado, el β y γ -tocoferol sólo se encuentran en las especies cultivadas siendo de 375,99 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ y 165,57 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso seco respectivamente. El δ -tocoferol es la única isoforma que se encuentra en ambas especies con valores de 31,76 a 46,67 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso seco. El perfil de **ácidos orgánicos** de *C. comatus* encontrado hasta ahora son los ácidos oxálico, quínico, málico, cítrico y fumárico. Los ácidos orgánicos totales se encuentran tanto en la especie cultivada como en la silvestre, encontrándose en mayor cantidad en la especie silvestre siendo de 20,63 g/100 g de peso seco.

Esta seta tiene también **ácidos fenólicos** como gálico, p-hidroxibenzoico, p-cumárico y ácido cinámico. El ácido gálico sólo se encuentra en la especie cultivada con 0,10 mg/100 g de peso seco, y el ácido p-cumárico sólo se encuentra en la especie silvestre con 0,15 mg/100 g de peso seco. El ácido p-hidroxibenzoico se encuentra en mayor concentración en la muestra salvaje, 0,09 mg/100 g de peso seco, mientras que el ácido cinámico se encuentra en mayor proporción en el hongo cultivado, 0,10 mg/100 g de peso seco. Por lo que la especie silvestre tiene más ácidos fenólicos. También se encuentran **flavonoides** en su composición, con una proporción de 0,19 a 3,52 mg/g de MS. Otros compuestos bioactivos son el **Licopeno**, con una concentración de 0,09 mg/g/biomasa. También el **β -Caroteno** en una proporción de 0,13 mg/g/biomasa. (15)

3.5.2 Propiedades medicinales de *C. comatus*

C. comatus es un delicioso hongo comestible en su etapa joven. Este hongo es poco conocido en la actualidad, pero estudios recientes han comprobado que tiene ciertos compuestos farmacológicamente activos que interviene en la mejora de varias enfermedades. La composición nutricional de *C. comatus* lo convierten en un alimento de alto valor, debiendo ser incluido en diferentes tipos de dietas. Es bajo en glucosa para la prevención de la diabetes, bajo en purinas para prevenir la gota, bajo en grasas para evitar problemas cardiovasculares, bajo en sodio para prevenir la presión arterial alta, rico en fibra para evitar el estreñimiento y bajo en calorías para disminuir la obesidad. El consumo habitual de este hongo mejora y previene diferentes enfermedades, debido a la presencia de metabolitos secundarios de importancia farmacológica.

Antitumoral: Diferentes ensayos con animales, han demostrado la prevención de ciertos tipos de tumores malignos con una tasa de éxito del 90 al 100%. Las investigaciones han estudiado la función de los polisacáridos de *C. comatus*, los cuales han demostrado poseer actividades inmunomoduladoras mediada por polisacáridos, antiandrogénicas e inhibitorias de la proliferación de células cancerosas. Entre los tipos de cáncer en los que interviene *C. comatus*, los más estudiados son el de próstata dependiente de andrógenos donde actúa a través de múltiples mecanismos, incluyendo la inhibición de la actividad de los receptores de andrógenos, reducción de los niveles de antígeno específico de próstata (PSA), inhibición de la fosforilación del receptor de andrógenos y la unión de este a la región potenciadora del antígeno PSA. (16)

Otro tipo de cáncer donde interviene *C. comatus* es en el cáncer de mama, donde se ha demostrado que actúa disminuyendo la proliferación tumoral a través de mecanismos distintos como son la estimulación de la apoptosis y la inducción a la fase de reposo del ciclo de reproducción celular, inhibiendo así la línea celular MCF 7 con valores de 4,95 μM IC50. También inhibe las líneas celulares del cáncer hepatocelular HepG2 con una tasa de 3,46 μM IC50 y del VIH-1 con 5,85 μM IC50. (17)

Hepatoprotector: Se ha demostrado en estudios con animales que *C. comatus* posee efecto hepatoprotector y capacidad de reducción del daño hepático producido por el alcohol. La lesión hepática inducida por alcohol se caracteriza por la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y citoquinas inflamatorias, las cuales acaban produciendo esteatosis hepática, lesiones, necrosis y muerte celular. Esto se debe a que el estrés oxidativo induce la permeabilidad mitocondrial y activa la caspasa-3 que inicia la apoptosis. (18)

Se ha demostrado que con una dosis de 50 mg/kg de extracto de polisacáridos de este hongo comestible, se consigue una reducción significativa en los efectos negativos del alcohol sobre la estructura y función hepática al reducir los ROS, además de la reducción de la actividad de caspasa-3, inhibiendo la apoptosis celular. (19)

Antidiabético: Varios estudios han examinado la acción hipoglucemiante que tiene *C. comatus*. Los estudios concluyen que el consumo de este hongo reduce significativamente la glucosa en sangre de forma duradera, incluso durante 21 días, reduce la hemoglobina glicosilada, aumenta el glucógeno hepático y mejora la tolerancia de la glucosa en la diabetes tipo 2. Entre los elementos que realizan esta función, se encuentran ciertos oligoelementos como cromo, magnesio y zinc, responsables de la secreción de insulina de las células de Langerhans y la participación en la acción de ella. (20)

En cuanto a la diabetes tipo 1, se ha relacionado a *C. comatus* con la actividad inmunológica, debido a la destrucción de células β mediada por linfocitos e interleuquina 1. De manera que se estudió la intervención de *C. comatus* en el sistema inmune, el cual mejora este sistema al aumentar la activación de macrófagos peritoneales y la actividad de la lisozima sérica. Otra vía hipoglucemiante que produce este hongo, es la inhibición de la actividad de la proteína Tirosina fosfatasa 1B (PTP 1B), que afecta a la señalización de la insulina. El efecto que produce al aumentar la actividad proliferativa de linfocitos del bazo, también se relacionó con el efecto hipoglucemiante. (21)

Antiinflamatorio: Un estudio en el que se simuló la inflamación aguda en ratones, los cuales fueron tratados con triglicéridos de *C. comatus*, determinó la reducción del componente inflamatorio. Con una dosis de 30 mg/kg de triglicéridos de este hongo comestible, se redujo significativamente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en un 58,3%, el de Interleuquina 1 β en un 27%, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEG F- α) en un 46,5% y la interleuquina 17 en un 8,2%. Por lo que puede utilizarse en el tratamiento de la inflamación aguda como consecuencia de muchas enfermedades. También tiene efecto sobre la reducción de edemas por daño de tejidos, teniendo efecto antinociceptivo periférico, al no atravesar la barrera hematoencefálica. Además, se ha descubierto el efecto antihiperalgésico al reducir el dolor neurológico. (22)

Antioxidante: los triglicéridos de este hongo han sido estudiados en varias ocasiones, los cuales demuestran el efecto reductor del estrés oxidativo que se produce a causa de la formación de oxígeno por los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, debido a la actividad enzimática de NADH y xantina oxidada en sitios inflamados.

Los elementos encargados de la actividad antioxidante son los fenoles, flavonoides, tocoferoles, β -carotenos, licopeno, ácido ascórbico y ácido gálico, los cuales se encuentran en grandes cantidades en este hongo, citados anteriormente. Además de estos, *C. comatus* contiene ergotioneina, aminoácido derivado de la histidina con propiedad antioxidante y polisacáridos con selenio que reducen el malondialdehído y aumenta la actividad antioxidante de enzimas y niveles de antioxidantes en hígado y riñón. La actividad antioxidante de *C. comatus* ha sido investigada en varias ocasiones mostrando valores de 80,6% con una concentración de 1mg/ml, la capacidad de barrido es de 57,9%, la capacidad de eliminación de radicales superóxido es del 47% y la actividad de quelación de metales ferrosos de 0,84 mg/ml IC50. (23)

3.5.3 Delicuescencia de *C. comatus*

Actualmente son mínimas las investigaciones que hay sobre la característica principal de *C. comatus*, la delicuescencia o auto digestión. Existen varias teorías sobre la causa y el proceso de este fenómeno. Una de ellas, es que la misma humedad que permite el crecimiento de este hongo, hace que inicie el proceso al promover la activación de las enzimas hidrolíticas, pequeñas máquinas biológicas que utilizan el agua para descomponer moléculas. Este proceso se inicia cuando se observa que las laminillas que se encontraban estrechamente unidas, comienzan a separarse y se curvan hacia arriba, permitiendo la liberación de las esporas hacia el aire. Las enzimas hidrolíticas son las responsables de romper la capsula de las laminillas, ya que digieren moléculas orgánicas complejas. Entre las enzimas hidrolíticas se encuentran las quitinasas, enzimas que descomponen la quitina, que es un azúcar complejo que forma las paredes celulares de los hongos y les hace resistentes. Entre las enzimas hidrolíticas hay también glucosidasas, fenoloxidasas, etc. En esta teoría, la liberación de las esporas es un elemento desencadenante de la acción de las enzimas hidrolíticas, las cuales no se encuentran en la seta hasta que no se produce la meiosis de las esporas, convirtiéndose en la última etapa de la vida de este hongo.



Figura 3. Hongo *C. comatus* estado delicuescente. Foto original cedida por el prof. Tomás Girbés.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Actualmente los hongos representan uno de los alimentos que se encuentra en el punto de mira de muchas investigaciones, ya que este alimento además de poseer una composición nutricional excelente y ser de alta calidad, su consumo se está relacionado con la mejora de ciertas enfermedades crónicas y prevalentes en la sociedad actual. También tiene una gran relevancia económica, ya que el negocio de la recolección de hongos comestibles brinda oportunidad de supervivencia y también de alimento a la población de países pobres. Su papel a nivel ecológico es también importante, al promover la supervivencia y desarrollo de muchos bosques con déficit de sustratos nutritivos.

Los hongos deben 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. Pero además de ello, los hongos disponen de una serie de elementos bioactivos, los cuales producen beneficios en muchas enfermedades por sus propiedades antioxidantes, inmunomoduladores, antitumorales, antihipertensivas, hipoglucemiante y antiinflamatoria.

En concreto, este trabajo se ha centrado en un tipo de hongo comestible de alta calidad gastronómica y nutritiva, denominado *Coprinus comatus*. Debido a las múltiples propiedades medicinales que contiene este hongo está siendo investigado por empresas farmacéuticas, entre otras, ya que puede ser considerado como alimento funcional. Los alimentos funcionales son una nueva área emergente en la ciencia de los alimentos, ya que mejoran la salud y aportan un excelente valor nutricional. *C. comatus* puede ser el alimento del que poder extraer un nuevo nutraceutico, es decir, suplementos de fitoquímicos concentrados derivados de este hongo, con propiedades antioxidantes, antitumorales y antimicrobianas. A parte de ser útil en el sector farmacéutico, puede ser un buen recurso alimentario para introducir en el consumo diario. El consumo regular de este hongo comestible, en una dosis de 100 a 200 g de *C. comatus* fresco, serviría para producir los beneficios que posee. Este hongo puede ser consumido en sopas, al vapor, enlatado o en salteados.

Existen muchas investigaciones sobre hongos, pero de este en concreto son escasas, y puede deberse a su difícil utilización por el proceso de deliquesencia o autodigestión que se produce en el a las pocas horas de recolectar. Debido a sus beneficios es necesario estudiar a fondo su composición, y por ello en este estudio se ha tratado de aclarar el perfil proteico de este hongo, ya que son proteínas de alta calidad y algunas de ellas interaccionan en beneficio de ciertas enfermedades.

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 *Coprinus comatus*.
- ✓ Comprobar la diferencia del contenido proteico entre el pie y el sombrero del hongo *Coprinus comatus*.
- ✓ Analizar la diferencia del contenido proteico en los diferentes estadios del hongo comestible *Coprinus comatus*: seta pequeña, seta madura y seta delicuescente.

Para la obtención de la información pertinente para realizar este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica, utilizando la base de datos PubMed, mediante una serie de palabras clave. La búsqueda se ha realizado desde lo más general, las setas y sus características, hasta lo más particular, la especie *Coprinus comatus*, tanto sus características como su composición nutricional y propiedades medicinales. Los pasos seguidos se muestran en la tabla 1.

PALABRAS DE BUSQUEDA	REVIEW			TRABAJO EXPERIMENTAL			
	Años	10	5	Total	10	5	Total
Mushrooms		339	223	571	65	27	94
Mushrooms chemical composition		192	127	279	37	16	44
Mushrooms medicinal		96	61	119	13	5	14
<i>Coprinus comatus</i>		0	0	1	70	34	121
<i>Coprinus comatus</i> medicinal		0	0	0	12	8	22
<i>Coprinus comatus</i> proteins		0	0	0	24	11	56

Tabla 1. Búsquedas PubMed

4. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES:

A continuación, se muestran los equipos, reactivos químicos, y materiales biológicos utilizados para la realización de esta investigación, así como la marca y casa comercial de la que provienen.

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 (VelpScientifica)
- Congelador -24°C (Fagor)
- Cubetas electroforéticas mini-VE (Amersham Biosciences)
- Centrifuga Digiten-R (ORTO ALRESA)
- Micro centrifuga (spectrafuge 24D)
- Cubeta electroforesis (Bio-Rad®)
- Disgregador (MICCRA D-9 /RT)
- Espectrofotómetro (HELIOS αThermo)
- PHmetro (pH-meter basic 20 + CRISON)
- Pipetas automáticas (20µl, 200 µl y 1000 µl) (Proline Plus de Biohit)
- Escáner (Bio-Rad®)
- Microjeringa (Hamilton)

Material fungible:

- Botellas de vidrio (5 ml-2 litros)
- Cubetas de cuarzo espectrofotómetro 104-QS Hellma 10ml.
- Celofán geles electroforesis
- Espátulas
- Frascos Erlenmeyer de vidrio de diferentes volúmenes.
- Gradillas para tubos Falcon
- Guantes de látex
- Imanes agitadores
- Marcos geles electroforesis
- Microtubo de plástico de 1,5 ml
- Mortero de porcelana
- Papel de filtro convencional Afora
- Parafilm®
- Pipetas de plástico estériles
- Probetas de vidrio y de plástico
- Puntas de pipeta automática
- Tijeras
- Tubos Falcón
- Vasos de precipitados de vidrio y plástico
- Geles 4-20% (Bio-Rad®)

Reactivos químicos:

- Agua Elix®-Millipore
- Acetona (Panreac)
- Ácido acético (J.T.Baker®)
- Ácido bórico (Panreac)
- Ácido clorhídrico (Panreac)
- Albumina sérica bovina (Roche)
- Ácido tricloroacético (Panreac)
- 2-mercaptoetanol (Merck)
- Carbonato de sodio (Panreac)
- Coloidal Comassiestain (Bio-Rad®)
- Cloruro sódico (Panreac)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich®)
- Glicerol (Thermo)
- Hidróxido de sodio (Panreac)
- Isopropanol (J.T.Baker®)
- Precision Plus Protein™ Standards
- Reactivo biuret (Panreac)
- Reactivo Folin (Sigma-Aldrich®)
- Sulfato de cobre (Panreac)
- Tartrato sódico potásico (Panreac)
- Tris-Glycine-SDS Running buffer (Bio-Rad®)
- LaemmliSample Buffer (Bio-Rad®)

Materiales biológicos:

Los hongos *Coprinus comatus* en los diferentes estadios utilizados en este trabajo fueron recolectados e identificados por Tomas Girbés en una pradera local.

Las muestras de *C. comatus* en las distintas fases de maduración, fueron recolectadas en el mes de septiembre del 2016 y congeladas a -24°C .



Figura 4. Muestras de *Coprinus comatus*. Fotos originales realizadas en el laboratorio.

MÉTODOS:

En esta investigación se han estudiado los estadios de la seta *Coprinus comatus*, que son seta pequeña, seta madura y seta delicuescente. Con el fin de evaluar la calidad de este hongo, es conveniente separar sus proteínas y estudiar las fracciones individuales, así como la proporción relativa de cada fracción en los hongos, ya que afecta fuertemente a la calidad nutricional del total de las proteínas del hongo.

En cada uno de los estadios, se han extraído cuatro tipos de fracciones proteicas: albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Las distintas fracciones de proteínas tienen distinta solubilidad, por lo tanto, se utiliza un medio distinto para la extracción de cada una de ellas. La extracción de albuminas se realizó con agua Elix como disolvente, las globulinas se extrajeron con cloruro sódico, las prolaminas con isopropanol y mercaptoetanol y las glutelinas con ácido bórico.

Para ello, se prepararon las soluciones correspondientes y se guardaron a 4°C hasta su utilización. La preparación de estas se muestra en el anexo I.



Figura 5. Seta pequeña, seta madura y seta delicuescente

Preparación de extractos y extracción de proteínas

Para la elaboración de los extractos, se pesaron 10 g del pie y 20 g del sombrero de la seta *Coprinus comatus*. Se trituraron en un mortero a 4°C para evitar un posible ennegrecimiento de la seta. Una vez triturado, se inició la extracción de albuminas, mediante la incorporación de 4ml de agua Elix por gramo de muestra. Una vez mezclado se repartió la mezcla en tubos. Este procedimiento se realizó de la misma forma para el pie de la seta.

Una vez los tubos preparados y en hielo a 4°C, se agitaron cada 5 minutos durante un tiempo de treinta minutos. Posteriormente se centrifugaron los tubos previamente equilibrados en centrifuga Digiten-R a 3500 rpm durante treinta minutos a 4°C.

Tras la centrifugación, la mezcla se separa en una fase líquida llamada sobrenadante y otra fase sólida llamada pellet. Se recogieron alícuotas de 1 ml del sobrenadante de cada tubo y se almacenaron a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Se repitió el mismo proceso para la extracción de globulinas, prolaminas y glutelinas, teniendo en cuenta únicamente el tipo de disolvente utilizado en cada fracción proteica, anteriormente citado. Una vez extraídas las cuatro fracciones de proteínas de la seta en fase pequeña, se pasó a realizar el mismo procedimiento en la fase delicuescente y madura.

Método del Biuret

El objetivo de este estudio fue la determinación del perfil proteico de la seta *Coprinus comatus*, pero antes de eso, es importante conocer la cantidad de proteínas de cada muestra, de manera que se realizó un método de cuantificación de proteínas totales en una solución, denominado Método del Biuret.

En este proceso, el reactivo de Biuret es el encargado de detectar la presencia de proteínas. Está compuesto por hidróxido potásico (KOH), sulfato cúprico (CuSO_4) y tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo por la unión de los iones Cu^{+2} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos. 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.

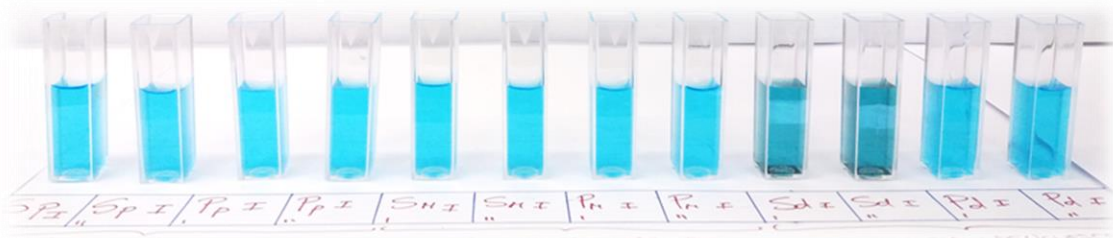


Figura 6. Muestras de *Coprinus comatus* tras el Método del Biuret.

Sp1 y Sp2: sombrero seta pequeña. **Pp1 y Pp2:** pie seta pequeña. **Sm1 y Sm2:** sombrero seta madura. **Pm1 y Pm2:** pie seta madura. **Sd1 y Sd2:** sombrero seta delicuescente. **Pd1 y Pd2:** pie seta delicuescente.

Método Lowry

El método de Lowry es otro método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas, pero más específico que el método del Biuret, ya que este es útil para concentraciones elevadas de proteínas como la leche, y el Lowry para proteínas diluidas, siendo más sensible. En este método, el reactivo usado es el reactivo de Folin, que también forma un complejo azulado con las proteínas.

La intensidad de color indica la concentración de proteínas según la ley de Lambert-Beer a través de la medición de absorbancia de cada tubo a una longitud de onda de 50nm. Este método consta de dos partes, en primer lugar los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos como en el método anterior, esto provoca el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, por lo que los residuos fenólicos se exponen y reducen el reactivo de Folin-Ciocalteu, que es de color amarillo y pasa a azul intenso.

Precipitación con Ácido tricloroacético (TCA)

Las proteínas forman soluciones estables según la carga eléctrica de estas, si la carga es neta estas tienden a ser solubles, pero si se mezclan proteínas cargadas positiva y negativamente, la atracción electrostática hace que tiendan a asociarse unas con otras. Esto es posible con el ácido tricloroacético, los tres cloros quelan los electrones, dejando así al protón del grupo ácido aún más ácido, la fuerza que toma ese ácido es más pronunciada y aumenta su grado de disociación.

Este efecto es beneficioso a la hora de concentrar proteínas, y es útil cuando no se tiene mucha cantidad de estas o es muy posible la pérdida de parte de ellas en el proceso. Por lo cual, antes de realizar tanto los métodos del Biuret y Lowry, como la determinación del perfil de proteínas, se concentró la cantidad de estas.

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) 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, se pone en uno de los pocillos una solución con marcadores de peso molecular conocido que sirven de referencia.

En primer lugar, se realizaron las soluciones de Tampón TRIS (Running buffer) y solución fijadora de tinte. A continuación, se colocó el gel preformado en la cubeta y se añadieron los tampones y las muestras en los pocillos. Posteriormente se procedió 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, después 15 minutos en la solución fijadora, y se concluye con la tinción durante una noche.

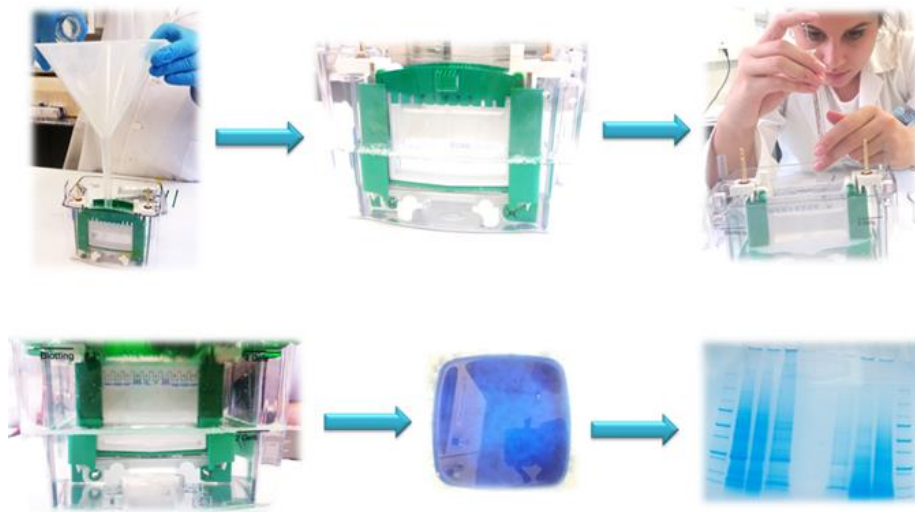


Figura 7. Proceso electroforético

Determinación del peso molecular de proteínas

Para la determinación del peso molecular de proteínas, se midió la distancia desde el pocillo del gel hasta la mancha que indica una proteína. En un papel semilogarítmico, se representó en el eje de abscisas los pesos moleculares y en el eje de ordenadas los centímetros que indican la distancia. Se colocaron en primer lugar las distancias de los marcadores con su correspondiente peso molecular, formando una recta patrón. Sobre esta recta patrón, se extrapolaron las distancias de las muestras, obteniendo así el peso molecular de esta

5. RESULTADOS

Determinación de proteínas de *C. comatus* 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 del Biuret, descrito en anexo II.

Una vez que se obtuvieron los valores de absorbancia de cada muestra y patrones, se representaron en una gráfica las absorbancias de los patrones respecto a la cantidad de BSA de cada una, obteniendo una curva de calibrado de BSA 10mg/ml. Posteriormente, se representaron las absorbancias de las muestras sobre la curva de calibrado, de la cual se extrapolaron las cantidades de proteínas.

ALBUMINAS	SOMBRERO	PIE
SETA PEQUEÑA	2,5 mg	-
SETA MADURA	1,4 mg	1,4 mg
SETA DELICUESCENTE	2,5 mg	2,7 mg

Tabla 2. Contenido en proteínas de las muestras de *C. comatus* de sombrero y pie en cada etapa mediante el método del Biuret expresadas en mg por gramo de seta.

Determinación de proteínas de *C. comatus* por el método Lowry

El procedimiento empleado después de obtener los valores de absorbancia de cada patrón y muestra es el mismo que en el método del Biuret, obteniéndose las siguientes cantidades de proteínas.

ALBUMINAS	SOMBRERO	PIE
SETA PEQUEÑA	2,6 mg	1,3 mg
SETA MADURA	2,1 mg	1,8 mg
SETA DELICUESCENTE	2,4 mg	1,5 mg

Tabla 3. Contenido en proteínas de las muestras de *C. comatus* de sombrero y pie en cada etapa mediante el método Lowry, expresadas en mg por gramo de seta.

Determinación del perfil proteico de *C. comatus* por electroforesis

En este trabajo se ha establecido el perfil proteico de sombrero y pie de *C. comatus* en tres estadios de desarrollo, seta pequeña (5 cm), seta madura (15 cm) y seta delicuescente (15 cm). Se han obtenido cuatro fracciones proteicas indicadas en trabajos previos (Biljana Bauer Petrovska), albuminas (extracción con agua), globulinas (extracción con NaCl 0,5), prolaminas (extracción con Isopropanol 55% y 0,6% de 2-mercaptoetanol) y glutelinas (extracción con Ácido Bórico 25mM, 0,6% de 2-mercaptoetanol y 0,5% de dodecilsulfato sódico).

Es importante indicar que este sistema de fraccionamiento no permite una separación completa de cada tipo de proteína. Además, se calculó la masa molecular de las proteínas más relevantes de acuerdo a las masas relativas de los marcadores utilizados en las electroforesis.

En general, el sombrero contiene mayor número de proteínas y más concentradas que en el pie y algunas no aparecen en pie, las cuales se han indicado con un asterisco. Se han identificado gran cantidad de proteínas, tanto en la fracción de albuminas como globulinas, observándose menos cantidad en prolaminas y gluteínas.

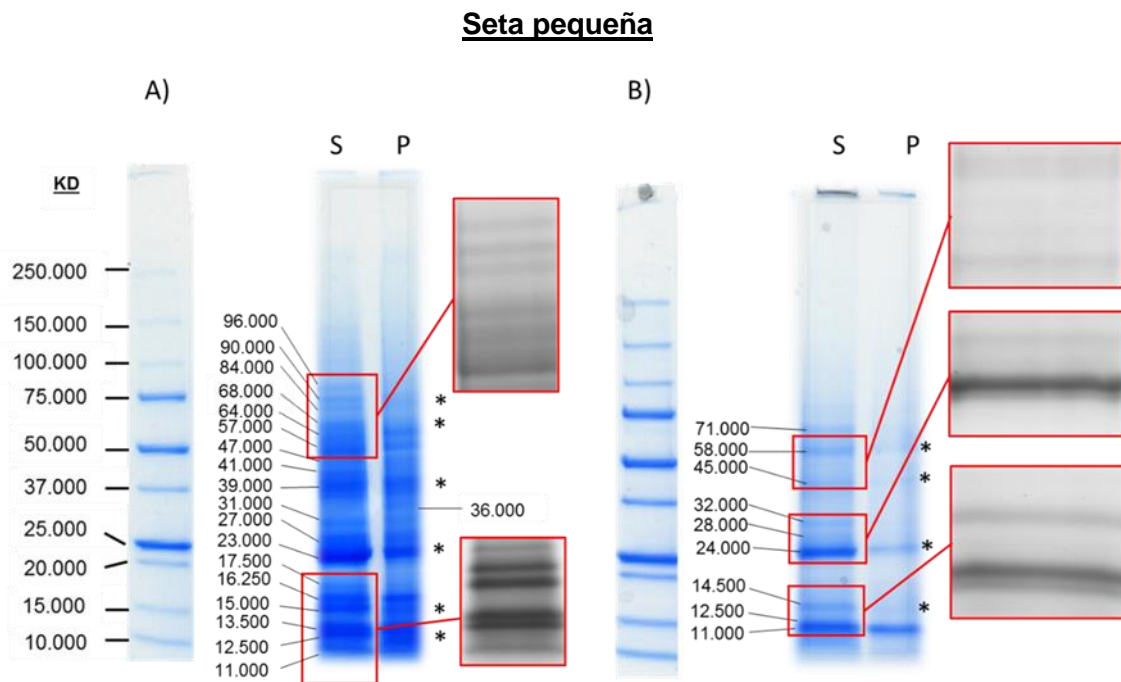


Figura 8. Perfil proteico del sombrero (S) y pie (P) de la seta pequeña *C. comatus*.

A) Albuminas B) Globulinas

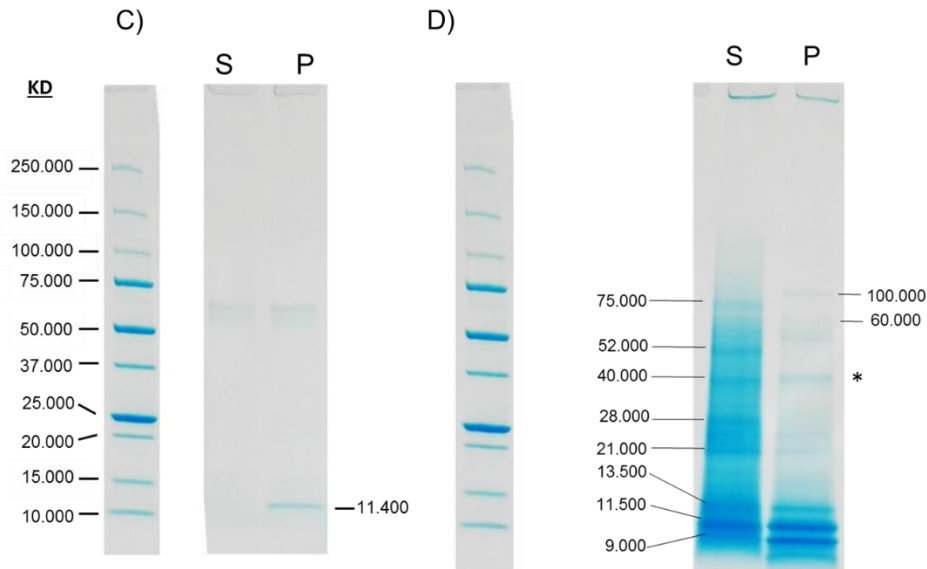


Figura 9. Perfil proteico del sombrero (S) y pie (P) de la seta pequeña *C. comatus*.

C) Prolaminas D) Glutelinas

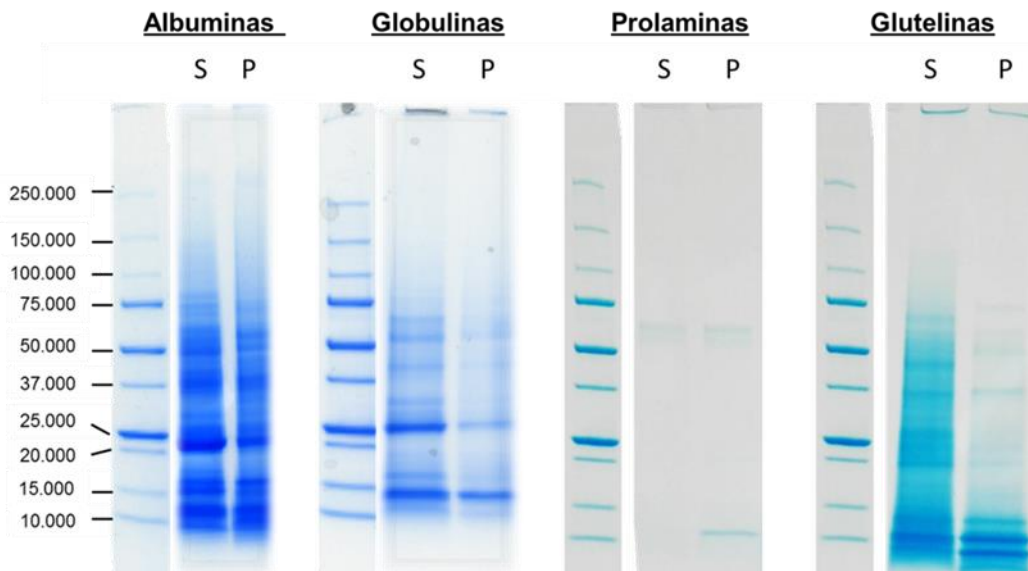


Figura 10. Perfil proteico del sombrero (S) y pie (P) de la seta pequeña *C. comatus* agrupación de las cuatro fracciones proteicas.

La fracción de **albuminas** es la que más concentración de proteínas presenta, apareciendo generalmente las mismas proteínas en sombrero que en pie, con alguna excepción como ocurre con la proteína de peso molecular 36.000 que solo aparece en el pie como se muestra en la figura 8, y otras como la 68.000 y 96.000 que solo aparece en sombrero. Algunas proteínas del sombrero aparecen con mucha más intensidad que en el pie como son la 12.500, 15.000, 23.000 y 39.000. En relación a las **globulinas**, en el sombrero hay proteínas con mucha más intensidad que en el pie, teniendo pesos moleculares de 24.000, 12.500, 45.000 y 58.000. La proteína con peso molecular 32.000 aparece en sombrero y en pie no. (Figura 8)

Como se indica en la figura 9, en este fraccionamiento no se aprecian **prolaminas** en el sombrero, y solo una de bajo peso molecular en el pie, 11.400. En el caso de las **glutelinas** ocurre al contrario, apareciendo tres proteínas con bajo peso molecular y mucha más intensidad en pie que en sombrero, son la 9.000,11.500 y 13.500. Hay una proteína con menos intensidad en el pie que en sombrero que es la 40.000 y aparecen dos proteínas en el pie ,100.000 y 60.000, que en el sombrero no aparecen.

Seta madura

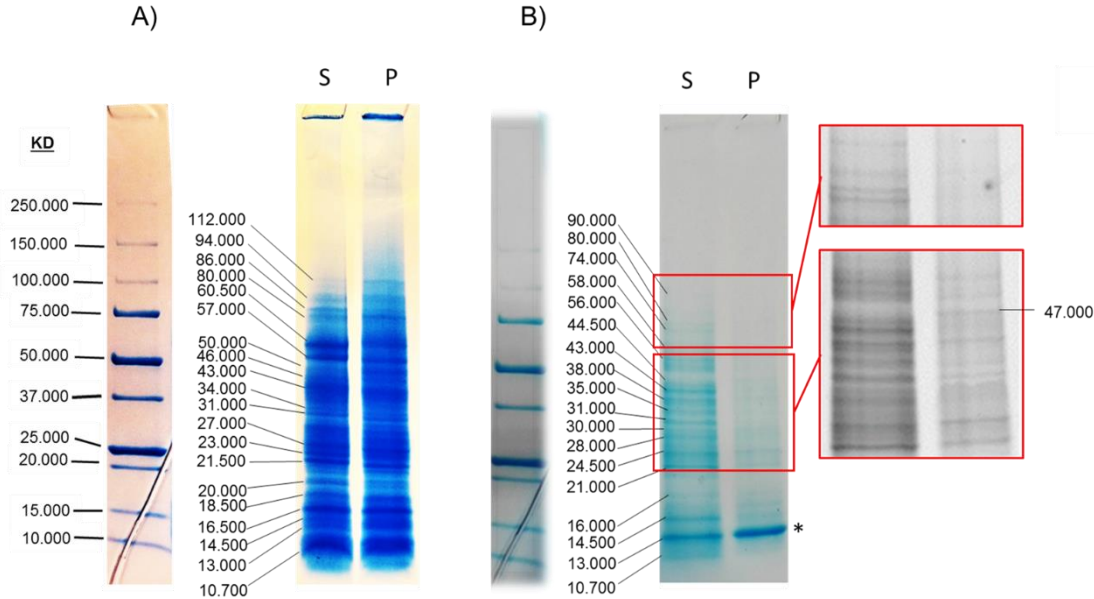


Figura 11. Perfil proteico del sombrero (S) y pie (P) de la seta madura *C. comatus*.

A) Albuminas B) Globulinas

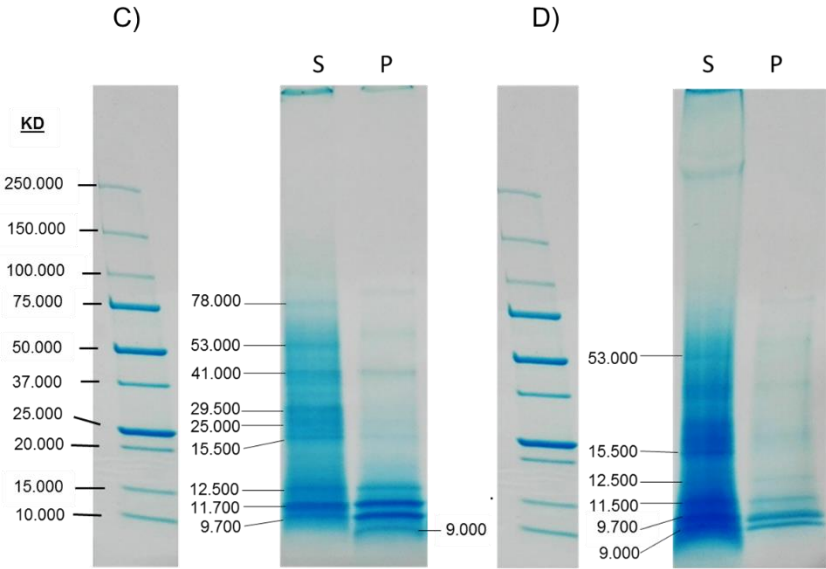


Figura 12. Perfil proteico del sombrero (S) y pie (P) de la seta madura *C. comatus*.

C) Prolaminas D) Glutelinas

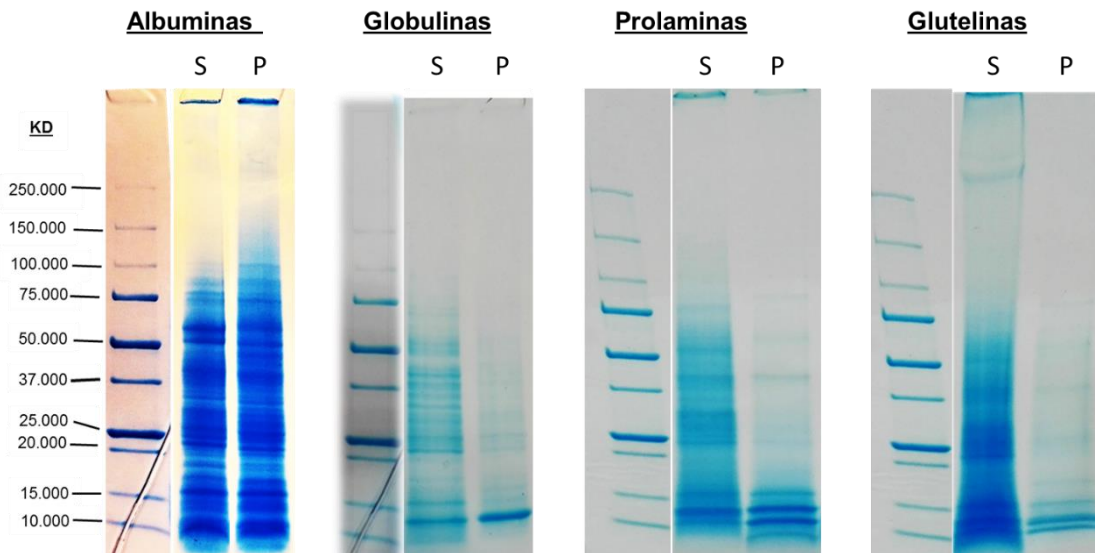


Figura 13. Perfil proteico del sombrero (S) y pie (P) de la seta madura *C. comatus* agrupación de las cuatro fracciones proteicas.

Como en todos los estadios, la fracción de **albuminas** es la que más concentración de proteínas presenta. En el caso de la seta madura el sombrero y el pie presentan las mismas proteínas y en similares intensidades. Como vemos en la figura 11, en el caso de las **globulinas** la proteína con peso molecular 13.000 se presenta con mucha más intensidad en el pie que en el sombrero y además existe una en pie de 47.000 que en sombrero no aparece. En el caso de las **prolaminas** (Figura 12) en este estadio hay mucha más concentración proteica que en seta pequeña. Dos proteínas de bajo peso molecular, 9.700 y 11.700, aparecen con mayor intensidad en el pie que en el sombrero, además de no existir una de ellas en sombrero, la 9.000. Por último, las **glutelinas** al contrario que en seta pequeña, las tres proteínas de bajo peso molecular más intensas en pie, aparecen con más intensidad en sombrero, teniendo pesos moleculares de 9.000, 9.700 y 11.500. (Figura 12)

Seta delicuescente

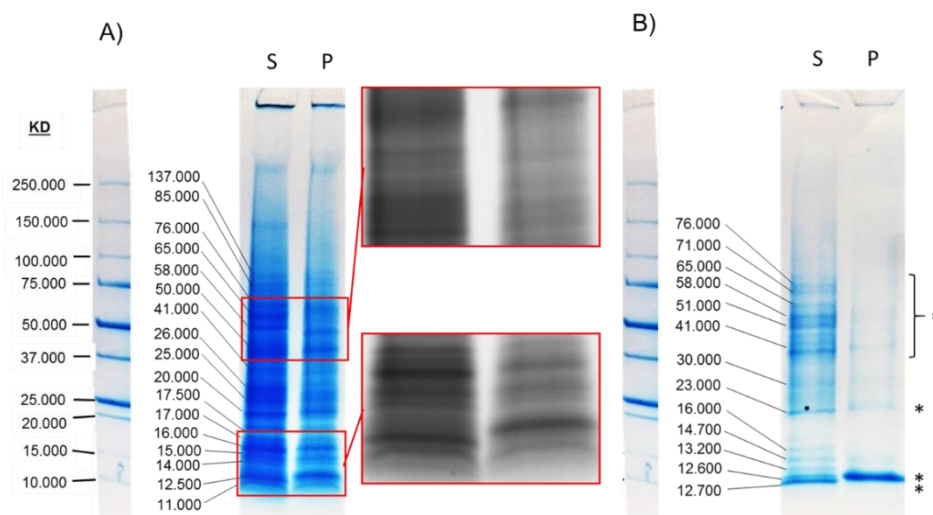


Figura 14. Perfil proteico del sombrero (S) y pie (P) de la seta delicuescente *C. comatus* A) Albúminas B) Globulinas

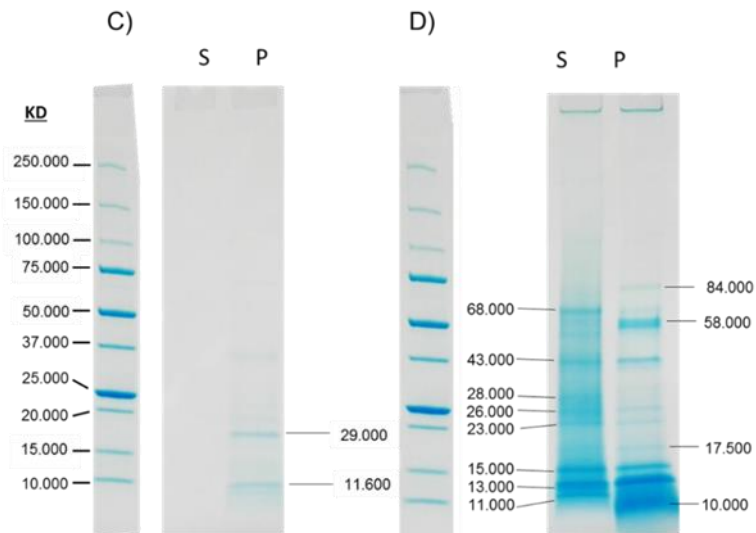


Figura 15. Perfil proteico del sombrero (S) y pie (P) de la seta delicuescente *C. comatus* C) Prolaminas D) Glutelinas

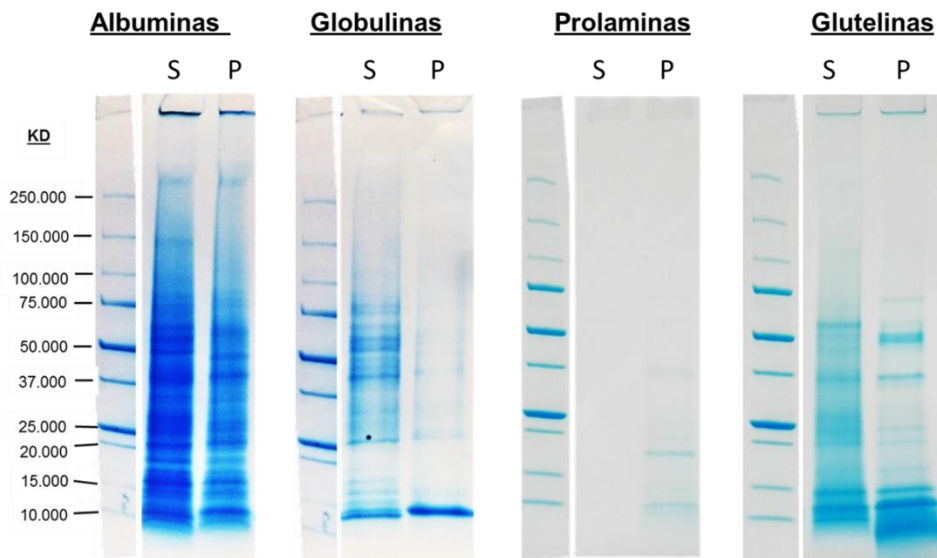


Figura 16. Perfil proteico del sombrero (S) y pie (P) de la seta delicuescente *C. comatus*
Agrupación de las cuatro fracciones

Como vemos en la figura 14, las **albuminas** de la seta delicuescente son prácticamente similares en el sombrero y pie de la seta. Las proteínas de esta fracción que son más intensas en el sombrero como las de pesos moleculares de 12.500, 16.000, 20.000, 50.000, 58.000, 60.000 y 76.000, aparecen con la misma intensidad en el pie prácticamente. A simple vista no se distingue ninguna proteína de esta fracción que solo aparezca en uno de los sitios. En cambio, en la fracción de **globulinas**, la proteína con peso molecular de 12.600 aparece con mucha más intensidad en el pie, mientras que las demás del pie aparecen con menos intensidad que en sombrero. No se aprecian proteínas en el sombrero de la fracción de **prolaminas** como ocurre en la seta pequeña, en cambio en el pie se distinguen dos con pesos moleculares de 11.600 y 29.000 (Figura 15).

En el caso de las **glutelinas** existe una proteína de 13.000 de peso molecular mucho más intensa en pie, y cuatro proteínas que solo aparecen en pie, con pesos de 10.000, 17.500, 58.000 y 84.000. (Figura 15).

Por último, diversas proteínas aparecen en las cuatro fracciones debido probablemente a interacciones distintas con otras estructuras celulares e incluso complejos macromoleculares proteicos.

7. DISCUSION

El procedimiento de extracción explicado anteriormente, es el aplicado normalmente a proteínas de plantas, aunque la autora Biljana Bauer Petrovska lo aplicó a un grupo amplio de setas. Los hongos, además, contienen una gran cantidad de glucanos, en particular β -glucanos muy hidratables y que dificulta la obtención de los extractos. En la investigación de esta autora aparece por primera vez una determinación del perfil proteico de *C. comatus*, pero con una imagen de baja calidad.

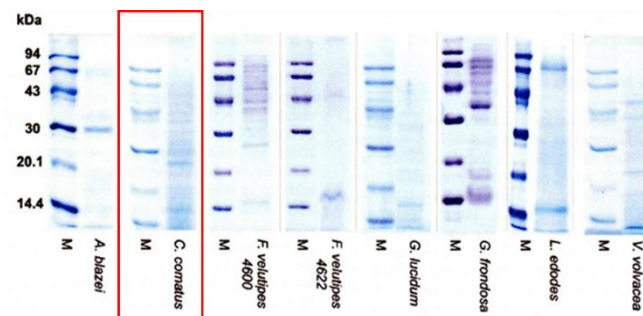


Figura 17. Perfil proteico *C. comatus*. Imagen extraída de un artículo de Biljana Bauer Petrovska. Eur Food Res Technol (2001) 212:469–472

El fraccionamiento utilizado permite la extracción de una determinada proteína según su solubilidad relativa en el disolvente de extracción. Esto hace que una determinada proteína pueda aparecer en varias fracciones, dependiendo probablemente de su interacción con otras proteínas, matrices polisacáridas (paredes celulares) o complejos lipoproteicos. De hecho, como se puede observar en las figuras de electroforesis anteriores, varias proteínas se encuentran simultáneamente en diferentes fracciones.

Las electroforesis no son carriles alineados perfectamente, ya que el proceso genera efecto de “smile” debido a la resistencia y tendencia a hacer difusión lateral. Esto provoca que los carriles se establezcan con forma de sonrisa y la determinación del peso molecular sea más complicado.

En relación a las proteínas obtenidas en las electroforesis, se observa una cantidad de ellas con pesos moleculares de entre 12.000 y 15.000, las cuales posiblemente sean proteínas fúngicas inmunomoduladoras, que se encuentran en sombrero más concentradas que en pie. En la seta pequeña son la 14.500, 13.500 y 12.500. En seta madura son la 14.500 y 13.000 y en seta delicuescente la 14.700, 14.000, 13.200, 12.700 y 12.500. Algunas proteínas inmunomoduladoras de los hongos denominadas FIPs (Fungal Immunomodulatory Proteins), han sido aisladas de distintas especies de hongos como *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma tsugae*, *F. velutipes* y *V. volvacea*, las cuales presentan efectos mitogénicos y activadores en linfocitos de la sangre periférica de humanos (hPBLs), por lo que estimulan la producción de citoquinas como la IL-2, el IFN- γ , y el TNF- α . Además, se ha demostrado que estas proteínas son, igualmente, capaces de actuar como agentes inmunosupresores (24)

8. CONCLUSIONES

1. En general, la seta *C. comatus* tiene mayor concentración de proteínas en el sombrero que en el pie, según se ha podido comprobar por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.
2. La fracción más abundante de proteínas es la fracción de albuminas en los tres estadios de desarrollo de la seta *C. comatus*.
3. Existen proteínas que aparecen en distintas fracciones, por su interacción con distintas matrices intracelulares.
4. En los tres estadios de desarrollo de la seta aparecen proteínas de pesos moleculares de entre 15.000 y 12.000, las cuales probablemente sean proteínas pertenecientes al grupo de FIPs (Fungal Immunomodulatory Proteins), presentes también en otras especies de setas.
5. En la seta delicuescente aparecen prácticamente las mismas proteínas que en los otros dos estadios de la seta, con alguna diferencia que pudieran ser proteínas relacionadas con el control del desarrollo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Arregui A, Campos JC. Manual de buenas prácticas y Guía de setas de Guadalajara. Guía de setas de Guadalajara. 2010;; p. 208.
2. Boa E. Los hongos silvestres comestibles: Perspectiva global de su uso e importancia para la población. Organización mundial de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. 2005;; p. 107.
3. Lamaison JL, Polese JM. Encyclopedie visuelle des champignons España: Editions Artemis; 2009.
4. Cuesta J. Ecología y hábitat de los hongos. Asociación micológica el royo. [Online]. Available from: http://www.amanitacesarea.com/guia_ecologia2.html.
5. Kalač P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. J Sci Food Agric. 2012 septiembre; 93(2):209-18(11).
6. Sun L, Liu Q, Fan CBAJ. Comparison of Free Total Amino Acid Compositions and Their Functional Classifications in 13 Wild Edible Mushrooms. Molecules. 2017 febrero; 24;22(3)(10).
7. Tang C, Hoo PCX, Tan LTH, Pusparajah P, Khan TM, Lee LH, et al. Golden Needle Mushroom: A Culinary Medicine with Evidenced-Based Biological Activities and Health Promoting Properties. Front Pharmacol. 2016 diciembre;(27).
8. Kalač P. Chemical Composition and Nutritional Value of European Species of Wild Growing Mushrooms: A Review. Food Chemistry. 2009 marzo; 113(1):9-16(8).
9. Ramos IR. Propiedades nutricionales y saludables de los hongos. Informe. La Rioja: Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de la Rioja; 2015.
10. Zhang JJ, Li Y, Zhou T, Xu DP, Zhang P, Li S, et al. Bioactivities and Health Benefits of Mushrooms Mainly from China. Molecules. 2016 julio; 20;21(7)(16).
11. Friedman M. Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans. Foods. 2016

- noviembre; 5(43).
12. FungiMedi. Hongo shaggy ink cap. Medi Fungi. [Online].; 2015 [cited 2017 junio 5]. Available from: <http://medifungi.com/es/ai/hongo-shaggy-ink-cap.401.html>.
 13. Petrovska BB. Protein Fraction in Edible Macedonian Mushrooms. European Food Research and Technology. 2001 marzo; 212 :469–472(4).
 14. Li B, Dobruchowska JM, Gerwig GJ, Dijkhuizen L, Kamerling JP. Structural investigation of water-soluble polysaccharides extracted from the fruit bodies of *Coprinus comatus*. Carbohydrate Polymers. 2012 agosto; 91(1):314-21(8).
 15. Stojkovic´a D, Reisb FS, Barrosb L, Glamoc`lijaa J, C´iric´a A, Griensvenc LJIDv, et al. Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O.F.Müll.) Pers. Food and Chemical Toxicology. 2013 septiembre; 59 (2013) 289–296(31).
 16. Dotan N. The culinary-medicinal mushroom *Coprinus comatus* as a natural antiandrogenic modulator. Integrative Cancer Therapies. 2010 diciembre; 10(2) 148–159(4).
 17. Zhao S, Rong CB, Kong C, Liu Y, Xu F, Miao QJ, et al. A Novel Laccase with Potent Antiproliferative and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activities from Mycelia of Mushroom *Coprinus comatus*. BioMed Research International. 2014 agosto; 2014(5):417461(8).
 18. Sadi G, Emsen B, Kaya A, Kocabaş A, Çınar S, Kartal. Dİ. Cytotoxicity of some edible mushrooms extracts over liver hepatocellular carcinoma cells in conjunction with their antioxidant and antibacterial properties. Pharmacognosy Magazine. 2015 mayo; 11(27).
 19. Ozalp FO, Canbek M, Yamac M, Kanbak G, J. L. Consumption of *Coprinus comatus* polysaccharide. Pharmaceutical Biology. 2014 marzo; 52(8): 994–1002(10).
 20. Zhou S, Liu Y, Yang Y, Tang Q, Zhang. J. Hypoglycemic Activity of Polysaccharide from Fruiting Bodies of the Shaggy Ink Cap Medicinal Mushroom, *Coprinus comatus* (Higher Basidiomycetes), on Mice Induced by Alloxan and Its Potential Mechanism. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2016 enero; 17(10):

957–964(9).

21. Lv Y, Han L, Yuan C, Guo J. Comparison of Hypoglycemic Activity of Trace Elements. *Biological Trace Element Research*. 2009 marzo; 131; 177–185(9).
22. Ren J, Shi JL, Han CC, Liu ZQ, Guo. JY. Isolation and biological activity of triglycerides of the fermented mushroom of *Coprinus Comatus*. *BMC Complement Altern Med*. 2012 abril; 24;12:52(12).
23. Li B, Lu F, Suo X, Nan H, Li B. Antioxidant properties of cap and stipe from *Coprinus comatus*. *Molecules*. 2010 marzo; 15(3), 1473-1486(12).
24. Moradali MF, Mostafavi H, Ghods S, Hedjaroude GA. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int Immunopharmacol*. 2007 Junio; 7(6):701-24(3).

10. ANEXOS

ANEXO I: 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 Isopropanol 55% y 0,6% de 2-mercaptoetanol:** Se añadieron 145 ml de isopropanol y 1,2 ml de 2-mercaptoetanol a una probeta y enrasamos hasta 200ml con agua Elix. Se guardó la solución a 4°C.
- **Solución de Ácido Bórico 25mM, 0,6% de 2-mercaptoetanol y 0,5% de Dodecilsulfato sódico (SDS):** Se añaden 0,306 gramos de ácido bórico a 150 ml de agua Elix, se incorporó el hidróxido sódico (NaOH) 0,3 M hasta obtener un pH 10, después se agregó 1 gramo de dodecilsulfato sódico (SDS) y 1,2 ml de 2-mercaptoetanol, disolvemos y enrasamos hasta 200 ml con agua Elix. Se guardó la solución a 4°C.

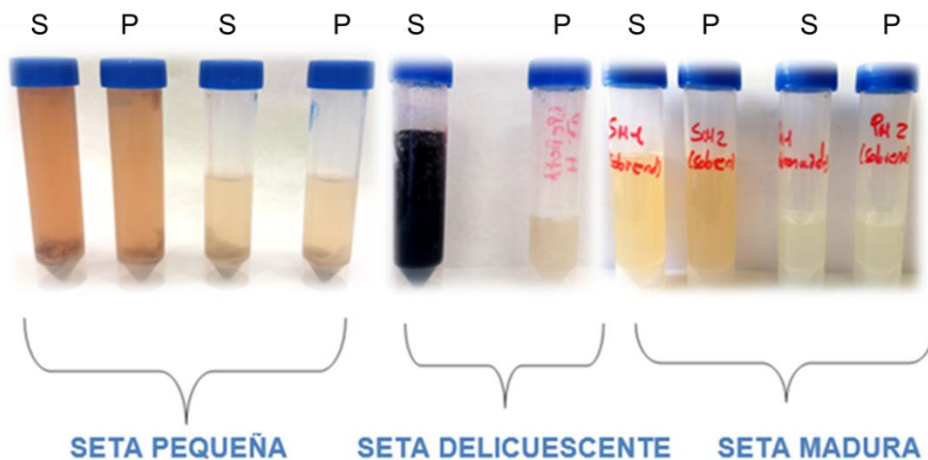


Figura 1. Disoluciones de la seta *Coprinus comatus* sombrero (S) y pie (P) en los tres estadios. Foto original realizada en el laboratorio.

ANEXO II: Precipitación con TCA, Método del Biuret y Método Lowry

Precipitación con ácido tricloroacético (TCA): este proceso se realizó tanto para el posterior proceso del método del Biuret y Lowry, como para la realización de la electroforesis. Se descongelaron los eppendorf con 1 ml de cada muestra, en el caso del Biuret y Lowry fueron 12 muestras, ya que se realiza por duplicado cada una, albuminas del sombrero y albuminas del pie de cada seta por duplicado, y se añadió 250 µl de TCA a cada uno. Posteriormente se introdujeron en un baño de agua hielo durante treinta minutos. Una vez pasado el tiempo, se centrifugaron a 10.000 g durante 15 min en centrifuga Micro centrifuga "Spectrafuge 24D". A continuación se retiró el TCA, se añadió 1 ml de acetona, se esperó 2-3 minutos, se retiró la acetona y se secó el tubo. Por último se añadieron 100 µl del disolvente adecuado para la extracción de la fracción correspondiente, en el Biuret y Lowry fue NaCl 0,5M para extraer la máxima cantidad de proteínas de la fracción de albuminas y en la electroforesis en las albuminas se añadió agua, en las globulinas NaCl 0,5M y en prolaminas y glutelinas Ácido Bórico con mercaptoetanol y dodecil sulfato sódico (SDS). Una vez añadido el disolvente, se resuspendió. Para realizar el método del Biuret y el Lowry por último se añaden 30 µl más del mismo disolvente en cada muestra para poder extraer 100 µl fácilmente y en el caso de la electroforesis se añaden 33 µl de buffer, se agitó en la mini centrifuga y se hirvió durante 5 minutos.

Método del Biuret: Para llevar a cabo el método, se preparó una solución de cloruro sódico al 0,5% y una disolución de albumina sérica bovina (BSA) 10 mg/ml. Se colocaron diez tubos falcon, un blanco, cinco patrones, dos muestras de sombrero y dos de pie de la seta en fase pequeña con la fracción de albuminas. Se realizó este método del Biuret con la fracción de albuminas ya que es la fracción más representativa, en los tres estadios de la seta. En primer lugar se añadió el NaCl con la cantidad mostrada en la tabla. Posteriormente se incorporó el BSA y finalmente el reactivo del 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 patrón realizada en papel milimetrado, con el patrón de BSA 10mg/ml.

Albuminas	B	P1	P2	P3	P4	P5	SPI	SPI	PPI	PPI
NaCl 0,5	1500 μl	1488 μl	1475 μl	1450 μl	1375 μl	1250 μl	1400 μl	1400 μl	1400 μl	1400 μl
BSA (10mg/ml)	0 μl	12 μl	25 μl	50 μl	125 μl	250 μl	-	-	-	-
Muestra	-	-	-	-	-	-	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
Biuret	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl
10 min 55°C 15 min 20°C										
Absorbancia	0	0,01	0,023	0,042	0,069	0,089	0,023	0,027	-	-

Albuminas	SMI	SMI	PMI	PMI	SDI	SDI	PDI	PDI
NaCl 0,5	1400 μl	1400 μl	1400 μl	1400 μl	1400 μl	1400 μl	1400 μl	1400 μl
BSA (10mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
Biuret	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl
10 min 55°C 15 min 20°C								
Absorbancia	0,011	0,021	0,015	0,015	0,241	0,277	0,030	0,027

Tabla 1. Proceso Método del Biuret

Método Lowry: En este método se midió la concentración de albuminas de los tres estadios también. Se preparó un blanco, 4 patrones y las muestras. En primer lugar, se añadió el disolvente, luego el BSA 2 mg/ml y la muestra. A continuación, se añadió el reactivo C formado por el reactivo A (NaCO₃ 2%, NaOH 0,1M), reactivo B1 (CuSO₄.5H₂O al 1%) y el reactivo B2 en proporciones 50:0,5:0,5 en volumen. A continuación, se mezclaron los tubos en la mini centrifuga y se dejaron reposar quince minutos en oscuridad. Por último se añadió el reactivo Folin-Ciocalteu diluido a 1/4, y después de mezclarlo se dejó treinta minutos en oscuridad para que se desarrollará la reacción y leer las absorbancias en el espectrofotometro a 580 nm.

Albuminas	B	P1	P2	P3	P4	SPI	SPI	PPI	PPI
AGUA	200µl	180µl	1475 µl	160µl	140µl	140µl	140 µl	140 µl	140 µl
BSA (2mg/ml)	0 µl	20µl	40 µl	60 µl	80 µl	-	-	-	-
Muestra	-	-	-	-	-	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
Reactivo C	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
15 min oscuridad									
Folin 1:4	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
30 min oscuridad									
Absorbancia	0	0,236	0,437	0,622	0,718	1,489	1,622	0,763	0,809

Albuminas	SMI	SMI	PMI	PMI	SDI	SDI	PDI	PDI
AGUA	140 µl	140 µl	140 µl	140 µl	140 µl	140 µl	140 µl	140 µl
BSA (2mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
Reactivo C	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
15 min oscuridad								
Folin 1:4	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
30 min oscuridad								
Absorbancia	1,342	1,278	1,103	1,090	1,517	1,339	0,900	0,893

Tabla 2. Proceso Método Lowry

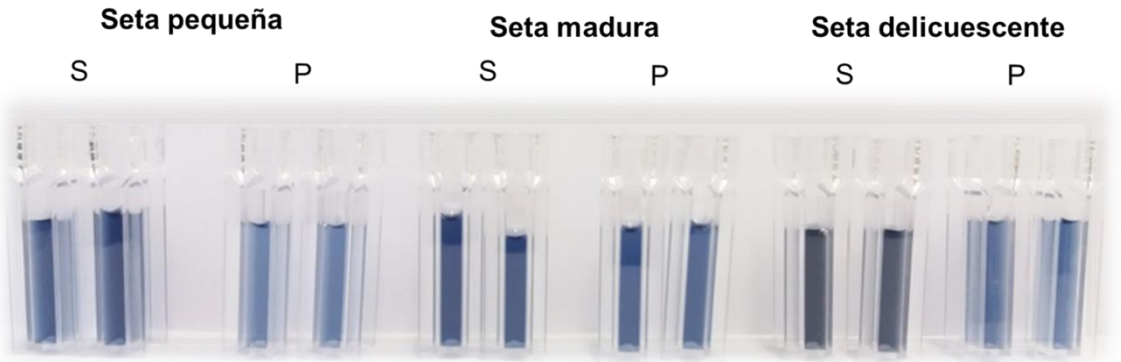


Figura 2. Método Lowry. Cubetas con las muestras sombrero y pie de seta pequeña, seta madura y seta delicuescente, por duplicado.

ANEXO III: Preparación de soluciones y proceso de electroforesis

Tampón TRIS (Running buffer): compuesto por 100 ml de tampón TRIS al 10%. Solución que permite que las muestras tengan un pH 8 para que las proteínas se desplacen.

Fijador del tinte: compuesto por 20 ml de ácido acético y 80 ml de etanol al 10%. Solución que 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:

- 1- En primer lugar se colocó el gel en uno de los soportes y se cerraron las dos pestañas laterales que sujetan el gel. Estas dos pestañas lo sellan herméticamente para evitar posibles fugas del tampón.
- 2- Se añadió el tampón running buffer al soporte con el gel, se aseguró de que no hubiera pérdidas y que la solución cubriera los pocillos. Después de comprobar que no había pérdidas del tampón, se introdujo el compartimento en el interior de la cubeta, y esta también se rellenó con solución tampón hasta la señal indicada en ella.
- 3- Se pincharon 10 μ l de solución marcador (Precision Plus Protein™ Standards) en el primer pocillo como elemento de referencia para poder calcular la cantidad de proteína de la muestra, mediante la microjeringa Hamilton. En los demás pocillos se introdujeron 20 μ l de las muestras pertinentes, y en el último pocillo se pusieron 3 μ l de BSA (10mg/ml) como referencia para saber la orientación del gel posteriormente. Después de cada aplicación de muestra, se lava la microjeringa con agua varias veces, para evitar contaminación cruzada.
- 4- Una vez pinchadas todas las muestras, se llena la cubeta con tampón hasta la señal que indica la cantidad dependiendo de si son dos geles o cuatro, se conectan los electrodos de la tapa de la cubeta a la fuente de alimentación, se pone en marcha con una corriente de 200 V y se observa la transmisión de corriente por la visualización de burbujas en la base del gel.

- 5- La electroforesis finaliza cuando las bandas del gel llegan al borde inferior del mismo. Una vez finalizada la electroforesis se extrae el gel y se coloca en un recipiente con agua durante 5 minutos. Pasado el tiempo, se retira el agua y se añade la solución fijadora y se coloca el recipiente sobre el agitador durante 15 minutos. Posteriormente, se retira el fijador y se añade la solución de tinte (QC Coloidal comassie stain) y se mantiene durante una noche en agitación.
- 6- Pasada la noche, se retira el tinte, y se añade agua Elix y se agita durante una hora. Se realiza un cambio de agua cada hora durante un día.
- 7- Pasado un día, se observaron las proteínas en el gel.



Figura 3. Cubeta y geles de electroforesis Bio-Rad