

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA
TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Efecto de la cocción sobre las albúminas y
globulinas de las setas comestibles *Agaricus
bisporus* y *Pleurotus ostreatus***



Universidad de Valladolid

Alumno: Sánchez Ramos, Samuel

Tutora: Jiménez López, Pilar

Curso: 2016/2017

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Las setas son un alimento que ha sido consumido desde la antigüedad y que se ha conservado hasta nuestros días. En los últimos años ha habido un interés creciente en cuanto a los efectos beneficiosos y propiedades medicinales que las setas pueden ofrecer. En este sentido, las proteínas son moléculas que presentan varios de estos efectos en los seres vivos. Es importante recalcar que en nuestra cultura lo más habitual es consumirlas tras algún tipo de cocinado, lo cual puede afectar a la estructura y composición de las proteínas y por tanto podrían dejar de ejercer sus efectos.

El presente trabajo se centra en la observación del perfil proteínico de las setas *A. bisporus* y *P. ostreatus* y de cómo afectan los procesos de cocción a este perfil. Los resultados observados en este estudio muestran diferencias significativas entre el pie y el sombrero en ambas setas, el número de proteínas que están presentes en ambas es bajo, siendo mayor en *P. ostreatus* que en *A. bisporus*. La cocción produjo una pérdida en la cantidad de proteínas, afectando especialmente a las proteínas de alto peso molecular. Una de las proteínas del sombrero de *P. ostreatus* se encontró en todas las muestras. En las muestras de sombrero de *A. bisporus* salteado se encontraron dos bandas que también aparecían en el extracto crudo.

Palabras clave: Seta, composición química, valor nutricional, fracción proteica, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, cocción.

1. ABSTRACT AND KEYWORDS

Mushrooms are a food that have been consumed since ancient times, and so it is currently. In recent years there has been an increasing interest towards the beneficial effects and medicinal properties they can offer us. In this regard, proteins are molecules with several of these effects upon living beings. It is important to stress that in our culture, speaking generally, mushrooms are consumed cooked and that may affect the proteins' structure and composition, leading to the stoppage of their usual effects.

This essay focuses on the *A. bisporus* and *P. ostreatus*' proteinic profile observation, and how cooking procedures act on that profile. The results of the study show significant variations between their caps and stalk, a low number of proteins, having *P. ostreatus* a higher quantity than *A. bisporus*. The cooking led up to a loss in the proteins' amount, affecting specially those proteins with a higher molecular weight. One of the *P. ostreatus* cap's proteins was found in each of the samples. In sautéed *A. bisporus* cap's samples there were found two strips, also present in the raw samples.

Keywords: Mushroom, chemical composition, nutritional value, protein fraction, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, cooking

2. ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
DM	Materia seca	NK	Natural Killer
FM	Materia fresca	CSAP	<i>Cordyceps sinensis</i> antibacterial protein-N-terminal sequence ALATQHGAP
FIPs	Proteína fúngica inmunomoduladora	AGS	Ácido graso saturado
RNA/ARN	Ácido ribonucleico	AGM	Ácido graso monoinsaturado
VIH	Virus de la inmunodeficiencia adquirida	AGP	Ácido graso poliinsaturado
IL-	Interleuquina	RIP	Ribosome-inactivating protein
TNF	Factor de necrosis tumoral	NF-κB	factor nuclear kappa B
Th	T helper	BSA	Albúmina sérica bovina
GABA	ácido gamma aminobutírico	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico	PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
ADN	Ácido desoxirribonucleico	SDS	Sodio dodecilsulfato
TCA	Ácido tricloroacético	SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con Sodio dodecilsulfato

3. ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	2
2. ABREVIATURAS.....	4
3. ÍNDICES.....	5
4. INTRODUCCIÓN.....	8
4.1. Breve reseña histórica.....	8
4.2. Reino Fungi.....	8
4.2.1. Características microscópicas de las setas.....	10
4.2.2. Características macroscópicas de las setas.....	11
4.3. Composición nutricional de las setas.....	12
4.4. Propiedades beneficiosas y perjudiciales de las setas.....	13
4.4.1. Propiedades beneficiosas.....	13
4.4.2. Propiedades perjudiciales.....	15
4.1. Proteínas de setas con efecto biológico.....	18
4.2. Modificaciones de los alimentos por la cocción.....	21
4.3. Hongos sometidos a estudio.....	22
4.3.1. <i>Agaricus bisporus</i>	22
4.3.2. <i>Pleurotus ostreatus</i>	23
5. JUSTIFICACIÓN.....	25
6. OBJETIVOS.....	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1. MATERIALES.....	26
7.1.1. Equipos:.....	26
7.1.2. Material fungible.....	27
7.1.3. Reactivos.....	27

7.1.4.	Materiales biológicos	28
7.1.5.	Preparación de disoluciones	28
7.2.	MÉTODOS.....	28
7.2.1.	Cocción de las setas.....	28
7.2.2.	Preparación del extracto	29
7.2.3.	Diálisis de las muestras	30
7.2.4.	Concentración de las muestras	30
7.2.5.	Determinación de la cantidad de proteínas de setas.....	31
7.2.6.	Valoración cualitativa de las proteínas de setas mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
8.	RESULTADOS	33
8.1.	Determinación de proteínas totales mediante el método de Biuret:.....	33
8.2.	Determinación del perfil proteico de <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> , mediante electroforesis SDS-PAGE	34
9.	DISCUSIÓN.....	40
10.	CONCLUSIONES	41
11.	BIBLIOGRAFÍA	41
12.	ANEXOS	44
12.1.	ANEXO I	44
12.1.1.	Método del Biuret	44
12.1.2.	SDS-PAGE.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición nutricional de <i>A. bisporus</i>	22
Tabla 2: Composición nutricional de <i>P. ostreatus</i>	24
Tabla 3: Búsqueda en Pubmed.....	26
Tabla 4: Cantidades y tiempos empleados en la elaboración del salteado	29
Tabla 5: Cantidades y tiempos empleados en la elaboración del risotto	29
Tabla 6: Cantidad de proteína de las muestras.....	34
Tabla 7: Cantidades de reactivos y muestra por tubo	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Árbol taxonómico.....	9
Figura 2: Detalle de la composición del himenio.	10
Figura 3: Detalle basidios en diferentes estados de maduración.	10
Figura 4: Fases de maduración de la seta	12
Figura 5: Recta patrón del Biuret	33
Figura 6: Electroforesis de <i>P. osteratus</i> crudo	35
Figura 7: Electroforesis de <i>P. osteratus</i> salteado.....	35
Figura 8: Electroforesis de <i>P. ostreatus</i> en risotto.....	35
Figura 9: Electroforesis de <i>A.bisporus</i> en crudo.....	38
Figura 10: Electroforesis de <i>A.bisporus</i> salteado	38
Figura 11: Electroforesis de <i>A.bisporus</i> en risotto	38
Figura 12: Resultados del método de Biuret.....	45
Figura 13: Imágenes del proceso de electroforesis	47

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Breve reseña histórica

Aunque el objetivo de este proyecto es aumentar la información sobre el estudio de las proteínas de las setas, hemos de comprender en primer lugar su importancia en el transcurso del tiempo.

Las setas a lo largo de la historia han tenido diversos usos, como la predicción del tiempo meteorológico, mediante la observación de su crecimiento en las lámparas de barro se usaba como signo de llegada de las precipitaciones, elaboración de colorantes, confección de indumentaria, transporte de fuego o yesca, o cicatrizante. Un ejemplo de seta que ha sido empleada para muchos de estos usos es *Fomes fomentarius*.

Otro uso importante de los hongos ha sido su aplicación en la medicina; ya en el mundo antiguo, Hipócrates refiere el uso de algunas setas como cauterizante y cicatrizante. También se tiene referencia de que prender fuego a un hongo, posiblemente *Fomes fomentarius*, y colocarlo sobre la parte afectada se usaba como cicatrizante. En la medicina tradicional China también han tenido aplicaciones médicas, en la que se los relaciona con los meridianos del bazo, estómago, hígado y pulmón.

Sin embargo el uso más importante de las setas a lo largo de la historia ha sido el gastronómico; se sabe con certeza que en el mundo antiguo, las setas se consumían habitualmente.

Tanto en la actualidad como a lo largo de la historia, el principal uso de las setas es éste último, el gastronómico, aunque en las últimas décadas la investigación científica de las setas ha demostrado que son una fuente muy importante de sustancias con numerosas aplicaciones en la salud y en la medicina.

4.2. Reino Fungi

El Reino Fungi es uno de los reinos taxonómicos en los que se pueden clasificar los seres vivos y está constituido por los hongos: seres vivos unicelulares o pluricelulares, formados por células eucariotas que se caracterizan por no presentar cloroplastos y que, generalmente, presentan una pared celular rígida rica en quitina.

Son heterótrofos ya que no tienen clorofila, debido a la ausencia de cloroplastos, por lo tanto no realizan la fotosíntesis y en consecuencia no son capaces de sintetizar materia orgánica a partir de la inorgánica, si no que utilizan la materia orgánica de otros seres vivos para generar la suya propia. Su forma de alimentación puede ser:

Simbiótica: Los hongos pueden asociarse a otros organismos vivos en una relación de simbiosis, es decir aquella en la que ambos consiguen algún beneficio. Ejemplo *Lactarius deliciosus*.

Parasitaria: es aquella asociación entre dos organismos en la cual uno de ellos (parásito) obtiene un beneficio viviendo a expensas de otro (hospedador) causándole algún perjuicio. Ejemplo *Fomitopsis pinicola*.

Saprófita: Los seres saprofitos se alimentan de la materia orgánica procedente de los residuos de otros seres vivos. Presentan una digestión externa, ya que liberan enzimas al medio que degradan el sustrato y le permite absorberlo. Ejemplo *Fomes fomentarius*.

El reino fungi es muy heterogéneo, ya que dentro de este grupo podemos encontrar tanto hongos unicelulares como *Candida albicans* como pluricelulares como *Penicillium notatum*. Sin embargo, para el presente trabajo nos vamos a centrar únicamente en aquellos capaces de formar setas.

Aunque en ocasiones se usan las palabras hongo y seta como sinónimos no son los mismo ya que, como ya hemos visto, los hongos se refieren a todo el reino fungi, y las setas son estructuras macroscópicas especializadas en la reproducción de ciertos tipos de hongos.

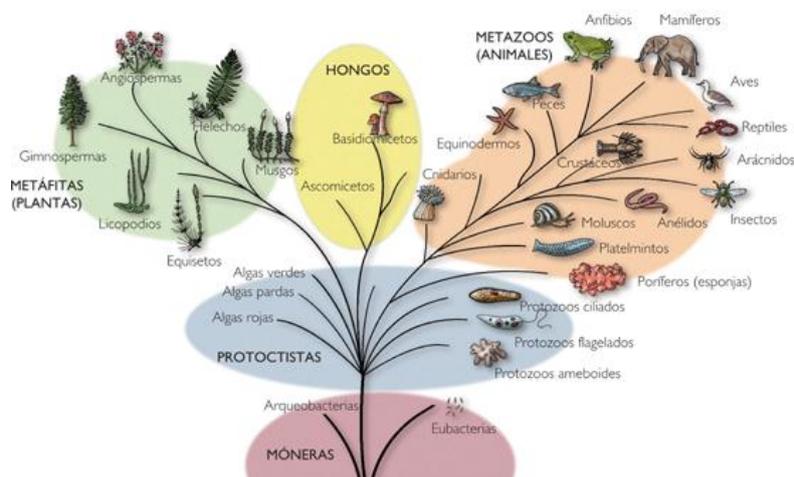


Figura 1: Árbol taxonómico. Fuente: Autor desconocido. Bajo licencia de Creative Commons

4.2.1. Características microscópicas de las setas

Los hongos productores de setas pertenecen al *phylum Basidiomycota* y presentan dos cuerpos diferenciados:

El **cuerpo vegetativo** es microscópico, se encuentra bajo tierra y está formado por una red de células generalmente en forma de filamentos llamadas hifas; estas, en función de la especie, pueden ser o no tabicadas o presentar unas estructuras llamadas *clamps*, conexiones entre la hifa apical y su hifa anterior que permite que el material genético de ambas se reparta equitativamente. Al conjunto de todas las hifas se denomina micelio.

Los cuerpos fructíferos o setas son la parte fértil de estos hongos y son estructuras macroscópicas formadas principalmente por asociación de grupos de hifas. Dentro del cuerpo fructífero encontramos el himenio; es en esta formación donde se encuentran distribuidos en forma de empalizada los basidios (estructuras microscópicas productoras de esporas), las hifas estériles y los cistidios que son estructuras con función excretora y de protección y que se piensa que también pueden servir para reducir la adhesión de las láminas.

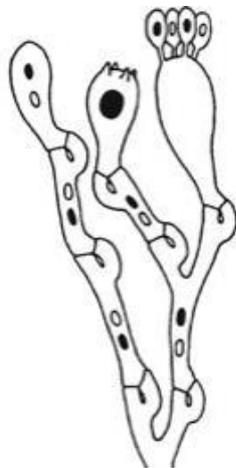


Figura 3: Detalle basidios en diferentes estados de maduración. Imagen extraída de Strasburger's Plant Sciences 2013

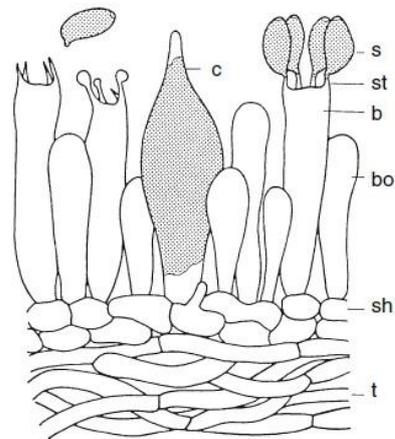


Figura 2: Detalle de la composición del himenio. Imagen extraída de Strasburger's Plant Sciences 2013

4.2.2. Características macroscópicas de las setas

Dentro de la seta podemos diferenciar varias partes, las dos **principales** son el sombrero y el pie:

•**El sombrero o píleo** es la parte superior de la seta. Tiene generalmente forma de paraguas y presenta dos partes fundamentales:

o El himenio: está compuesto por laminillas, que aumentan considerablemente la superficie aumentando la cantidad de basidios que puede presentar una seta y su fertilidad.

o La cutícula externa: es la parte del sombrero donde se ancla el himenio; además sus características externas (forma, textura, aspecto, color...) permiten la diferenciación de las setas. En algunas ocasiones, sobre la cutícula se pueden encontrar restos del velo universal, estructura que envuelve la mayor parte de las láminas del hongo, cubre la seta al nacer y al crecer esta, desaparece total o parcialmente como en el caso de la *Amanita muscaria* en la que las manchas blancas del sombrero son restos del velo universal.

•**El pie o estipe** es el tallo sobre el cual se sustenta el sombrero. Sus características (posición, el aspecto, la forma,...), en unión con las de la cutícula, se emplean en la diferenciación de las setas.

También podemos encontrar otras estructuras **accesorias** tales como:

•**Volva**: es una estructura presente en la zona inferior del pie de algunas setas que procede de los restos del velo. Ejemplo: *Amanita caesarea*

•**Anillo**: es una estructura que se puede encontrar en la parte superior del pie; procede del velo parcial que une el himenio al pie durante el crecimiento, sin embargo, cuando la seta ya está madura no presenta ninguna función. Ejemplo *Cortinarius caperatus*

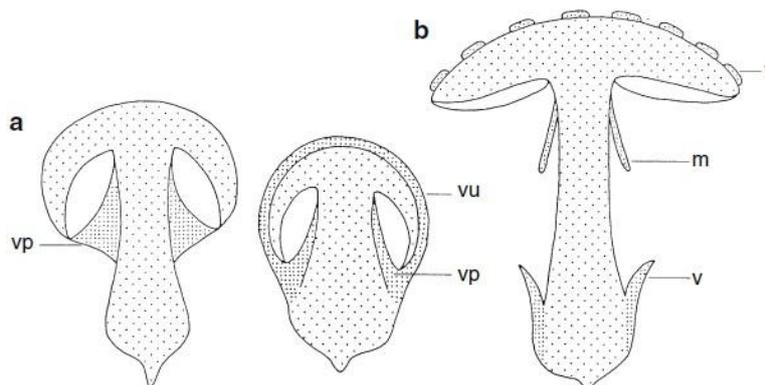


Figura 4: Fases de maduración de la seta (a) con detalle de los velos universal (vu) y parcial (vp) y sus restos en la seta madura (b) volva (v) anillo (m) y restos sobre la cutícula (m). Imagen extraída de Strasburger's Plant Sciences 2013

4.3. Composición nutricional de las setas

La **composición nutricional** de las setas es ampliamente variable, esto se debe a factores como el grado de maduración, la variedad, las condiciones del terreno y del ambiente, si son cultivadas o silvestres o las condiciones de la recolección. Por ello, el conocimiento de la composición nutricional es muy limitado.

El peso de las setas se debe principalmente al agua, presentan un elevado porcentaje de **humedad**, entorno al **90%** después de la recolección(1), y en consecuencia la cantidad de **materia seca** es baja —normalmente se encuentra entre **80 y 140g/kg** (2) —.

Dentro de la **materia seca** el grupo mayoritario son los hidratos de carbono, que pueden llegar a representar la mitad o más del peso seco; dentro de este grupo encontramos **hidratos de carbono digeribles** como manitol, glucosa y glucógeno en proporciones variables e hidratos de carbono **no digeribles** que forman un porcentaje elevado dentro del total siendo el principal la quitina, que representa en torno al 80-90% de la pared celular de las setas.

El segundo grupo más abundante son **las proteínas**, un estudio determinó su concentración en diversas setas en **12-29,3%**(1). Por su composición en aminoácidos se consideran de un alto valor biológico, comparándose, en algunos casos, con las de las proteínas de huevo de gallina (3). La **digestibilidad** de las proteínas de setas de *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes* se ha estimado en 73,4% y 76,3% respectivamente, son valores comparables a los de las legumbres que están en torno al 70-80% y son inferiores a los de la carne, que es superior al 90%. La cantidad de **aminoácidos esenciales** oscila, generalmente entre 30-50g/100g (materia seca –

DM-) de proteínas y son especialmente ricas en treonina, valina, ácido glutámico, ácido aspártico y arginina y pobres en metionina y cisteína. (4)

La cantidad de **cenizas** suele oscilar entre **60 y 120g/kg** (DM) (2), siendo su principal componente el potasio. La distribución dentro del cuerpo fructífero suele ser desigual, siendo normalmente más abundante en el himenio. En algunas se pueden dar fenómenos de acumulación, llegando a contener niveles muy relevantes de minerales; la acumulación afecta principalmente al potasio pero también a algunos metales pesados como el As, Pb, Hg y Cd.

Las setas son pobres en **lípidos**. Suelen tener cantidades en torno a **20 y 30g/kg** (DM), esto hace que su contribución nutricional sea muy limitada. En cuanto a su composición, es variable, pero en general el ácido graso más abundante es el ácido linoleico, seguido del oleico.

El **contenido energético** de las **setas cultivadas** se ha estimado en **419Kcal/kg** (materia fresca - FM) y para setas **silvestres 397Kcal/kg** (FM) (2). Sin embargo, en el mismo estudio según el autor el cálculo podría estar sobreestimado, ya que, para éste no se hizo distinción entre carbohidratos digeribles y no digeribles.

La cantidad de **vitaminas y provitaminas** aportadas por las setas no está del todo clara. Se tienen algunos datos que muestran que en general suelen ser más ricas en vitaminas las setas silvestres que las cultivadas; en este sentido, es relevante el caso de la vitamina D₂, que puede variar entre valores desde indetectable hasta 100mg/Kg (DM) en las condiciones adecuadas (2).

Las setas presentan además **otras sustancias** que varían ampliamente en función del tipo de seta, entre las que cabe destacar las sustancias antioxidantes. También presentan otras como purinas, compuestos indólicos, hidrazinas, estatinas, etc.

4.4. Propiedades beneficiosas y perjudiciales de las setas

4.4.1. Propiedades beneficiosas

Las setas presentan numerosas propiedades beneficiosas. Las principales son las siguientes:

Efecto antioxidante: Las setas presentan una gran cantidad de sustancias antioxidantes, principalmente en forma de ácidos fenólicos, aunque también contienen otras sustancias como flavonoides, glicosidos, polisacáridos, tocoferoles, ergotioneína, carotenoides y ácido

ascórbico. Las sustancias antioxidantes son sustancias capaces de neutralizar especies reactivas, de entre las cuales las especies reactivas del oxígeno son las más importantes, estas moléculas presentan efectos tanto beneficiosos como perjudiciales destacando dentro de los últimos el envejecimiento y enfermedades asociadas a este. (5)

Efecto inmunomodulador: las sustancias con actividad inmunomoduladora se clasifican en cuatro grupos: Terpenos, proteínas fúngicas inmunomoduladoras (FIPs), lectinas y polisacáridos. Estas muestran efectos potenciadores de la inmunidad tanto innata como la adaptativa; son capaces de aumentar la proliferación y activación de componentes del sistema inmune innato como células natural killer (NK), neutrófilos y macrófagos y estimular la expresión y secreción de citoquinas. Estas últimas activan la inmunidad adaptativa al estimular la producción de anticuerpos por las células B y la producción y estimulación de la diferenciación de células T a T helper 1 y 2.

Efecto antitumoral: algunos estudios han demostrado el efecto antitumoral de diversas setas, este efecto se debe principalmente a la acción de los polisacáridos, por su efecto inmunomodulador, y al efecto antioxidante.

Efecto antidiabético: numerosos estudios han demostrado el efecto antidiabético de algunas setas, sobretodo en modelos animales, este efecto parece estar relacionado con los polisacáridos de las setas.

Efecto antimicrobiano: numerosas sustancias tanto de bajo (terpenos, ácidos orgánicos, esteroides...) como elevado peso molecular (proteínas, péptidos, polisacáridos...) poseen efectos antimicrobianos, esencialmente antibacterianos y antivirales.

Los efectos antimicrobianos, bacteriostáticos o bactericidas, pueden ser frente a diferentes especies de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (6). En cuanto a los efectos antivirales se ha comprobado que ciertas proteínas, péptidos y polisacáridos inhiben la actividad de las enzimas retrotranscriptasa inversa y proteasas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). También presentan efectos inhibitorios en los virus de la hepatitis B y del herpes simplex tipo I, mediante interferencia en la adsorción del virus (7).

Efecto anti-estreñimiento: Las setas presentan una gran cantidad de fibra, especialmente insoluble, esta ejerce numerosos efectos beneficiosos a nivel del colon entre ellos la aceleración del tránsito intestinal, mejorando el estreñimiento.

Efecto antihipertensivo: Se han observado efectos antihipertensivos en algunas setas como *A. bisporus* y *Pleurotus cystidiosus*, debido a la presencia de proteínas inhibitorias de la enzima convertidora de angiotensina. Además, *Pleurotus ostreatus* contiene lovastatina un anticolesterohémico.

Efecto anti-inflamatorio: El efecto anti-inflamatorio de los diferentes extractos de setas se ha relacionado con su capacidad de eliminar pasos específicos en la ruta de liberación del factor nuclear kappa B (NF-κB).

Es importante tener en cuenta que algunas de estas propiedades únicamente se han observado en sus extractos, por lo que cuando son ingeridas como alimento, podrían no tener tantos beneficios debido a que las cantidades de algunos de los compuestos beneficiosos pueden no encontrarse en cantidades suficientes como para ser efectivas.

4.4.2. **Propiedades perjudiciales**

Además de tener numerosas sustancias beneficiosas, presentan numerosos compuestos que pueden ser nocivos, estos pueden ser características de algunos géneros o pueden afectar a una sola especie pudiendo aparecer en setas consideradas tanto comestibles como venenosas. Sus efectos pueden ser autolimitados o mortales, siendo la sintomatología intestinal la más común (que es con la que suelen comenzar muchas de las intoxicaciones por setas), y se conocen por el nombre de micetismos.

Según sus efectos las toxinas se clasifican en los siguientes grupos:

Neurotoxias: Las neurotoxinas afectan al sistema nervioso, están presentes en numerosas especies y géneros y se clasifican en función del síndrome que causan, estos pueden ser: síndromes colinérgicos, epileptogénicos, micoatropínicos, encefalopáticos y halucinógenos.

El síndrome colinérgico se debe a la presencia de muscarina, un agonista de la acetilcolina (que a diferencia de esta no puede ser degradada por la colinesterasa), que ejerce un efecto prolongado al mantenerse un mayor tiempo en circulación. Es especialmente importante en los géneros *Inocybe*, *Clitocybe*, *Boletus* y *Rubinoboletus*.

El síndrome epileptogénico: se debe principalmente a la ingestión de *Gyromitra esculenta* que contiene giromitrina. Esta se hidroliza en monometilhidracina, un inhibidor del pirodoxal

fosfato, afectando a las rutas metabólicas dependientes de esta vitamina, como la síntesis de ácido gamma aminobutírico (GABA) a partir del glutamato.

Síndrome micoatropínico o síndrome Glutaminérgico/GABAminérgico: es un síndrome que se produce tras la ingestión de setas como *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina*, *Amanita ibotengutake*. Estas setas contienen muscimol, aminoalcohol agonista del GABA, y ácido iboténico, aminoácido no proteico agonista el glutamato, derivados del glutamato y del GABA respectivamente. Especies del género *Morchella* también producen neurotoxicidad, que puede incluir el síndrome micoatropínico.

Síndrome encefalopático: Es un síndrome que está asociado a otras intoxicaciones por setas derivado de la ingesta de *Hapalopilus rutinalis*, *Pleurocybella porrigens*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus eringii*, *Amanita phalloides* o *Gyromitra esculenta*.

Síndrome alucinógeno: Este síndrome se debe principalmente a la ingestión de setas que contienen psilocibina que incluye *Psilocybe spp.*, *Panaeolus spp.* y *Stropharia aeruginosa*.

Toxinas neurovasculares: El consumo de pequeñas cantidades de setas de la especie *Clitocybe acromelalga* o *Clitocybe amoenolens* causa excitotoxicidad; que se manifiesta clínicamente como eritromelalgia. La toxicidad es debida a los ácidos acromélicos A, B, C, D y E, análogos del ácido kaínico.

Cardiotoxinas y muerte súbita: Algunas setas pueden causar cardiotoxicidad, *Amanita franchetii* y *Ramaria rufescens* son sospechosas de causar alteraciones cardiacas que causaron la muerte de 10 pacientes. En ocasiones esta cardiotoxicidad es secundaria a otra patología principal, principalmente aquellas que producen rabdomiólisis. (8)

Se ha relacionado el consumo de *Trogia venenata* con la muerte súbita en la provincia de Yunnan, aunque no se ha podido establecer con certeza cuál o cuáles son las sustancias causantes de la toxicidad.(8)

Toxinas gastrointestinales: existen numerosas setas que como única sintomatología producen distrés gatrointestinal y que suele estar autolimitado, también puede aparecer esta sintomatología tras la ingestión de setas con toxicidad sistémica. Las reacciones gástricas/gastroentéricas leves pueden ser producidas por setas de diferentes géneros como *Chlorophyllum*, *Boletus*, *Entoloma*, *Lactarius*, *Omphalotus*, *Clitocybe*, *Paxillus* y *Tricholoma*.

Otra de las sintomatologías producidas por toxinas gastrointestinales es el efecto pseudoantabus, es el mismo efecto que ejerce el Disulfiram, que cursa con intolerancia al etanol debido a la acumulación del acetaldehído; se debe al consumo de ciertas setas del género *Coprinus*, y a setas como *Lepiota aspera*, *Boletus luridus*, *Verpa bohemica*, *Clitocybe clavipes*, *Pholiota squarrosa* y *Tricholoma equestre*. Este efecto ha sido descrito ampliamente en *Coprinus atramentarius*, por efecto de la coprina.

Hepatotoxinas: Son principalmente la giromitrina y las amatoxinas. El consumo de setas con amatoxinas es la principal responsable de la mayoría de las muertes por micetismos. Las amatoxinas son un conjunto de toxinas, de las cuales actualmente se conocen 10, y proceden de setas del género *Amanita* como *A. phalloides*, *A. bisporigera*, *A. rubescens*, *A. ocreata*, *A. verna*, *A. virosa*, *A. fuliginia*, *A. subjunquillea*, *A. exitialis*, *A. suballiacea*, *A. tenuifolia* y *A. hygroskopica* y algunas especies de géneros como *Galerina* y *Lepiota*.

La anatoxina principal es la α -amanitina, una toxina termoestable que afecta principalmente al riñón y al hígado debido a que se une irreversiblemente a la RNA polimerasa II, reduciendo la formación de mRNA, afectando consecuentemente a la síntesis de proteínas y produciendo como resultado final la muerte celular. La α -amanitina también puede transformarse en intermediarios de radicales libres produciendo daños en las membranas celulares. También puede actuar sinérgicamente con citoquinas endógenas produciendo daño celular e induce la apoptosis. (8).

Nefrotoxinas: Los efectos nefrotóxicos más graves son los debidos a la ingesta de especies del género *Cortinarius*. La nefrotoxicidad de estas setas se debe a la presencia de orellanina, esta toxina se concentra en los riñones donde es oxidada, produciendo la acumulación de compuestos quinónicos y causando el daño celular. La orellanina interfiere con la enzima RNA polimerasa B e inhibe la fosfatasa alcalina de las células de los túbulos proximales generando la reducción de la síntesis de ATP. También pueden causar daño renal las intoxicaciones que cursan con rabdomiólisis.

Rabdomiólisis: la rabdomiólisis se ha relacionado con el consumo frecuente de *Tricholoma equestre*; También puede ser subsecuente al consumo de *Russula subnigricans* y algunas especies del género *Cortinarius*.

Toxinas hematológicas e inmunológicas: En cuanto a las toxinas hematológicas cabe destacar que la ingesta repetida de *Paxillus involutus* puede producir anemia inmuno-hemolítica que se debe a la formación de inmunocomplejos. Otra seta con toxicidad hematológica es *Podostroma cornu-damae* que contiene numerosas toxinas, que afectan al sistema gastrointestinal seguido de deshidratación e hipotensión, oliguria, alteración del estado mental, leucopenia, trombopenia, descamación lamelar de las palmas y la cara y alopecia.

También se han descrito reacciones alérgicas a *Boletus edulis*, *Agaricus bisporus* y *Lentinula edodes*.

4.1. Proteínas de setas con efecto biológico

Puesto que el presente trabajo está centrado en el estudio de las proteínas de setas voy a desarrollar un poco más a fondo las proteínas de setas con efecto biológico.

Las principales proteínas de setas con efecto biológico son las siguientes:

Lectinas: son proteínas en unión con carbohidratos que presentan roles muy diversos, algunas de ellas intervienen en el metabolismo de los propios hongos y otras intervienen en las relaciones parasitarias o simbióticas de estos con otros organismos. Las lectinas se encuentran principalmente en los cuerpos fructíferos de los hongos, aunque algunos las presentan en el micelio.

Se ha demostrado que las lectinas tienen numerosos efectos en otros seres vivos, los principales efectos que presentan son los siguientes:

Efecto hemaglutinante: La hemaglutinación se refiere a la aglutinación de los eritrocitos por virus, lectinas y anticuerpos. La mayoría de las lectinas son capaces de aglutinar la sangre humana de todos los grupos, sin ninguna especificidad y se conocen como panaglutininas o aglutininas no específicas. Estas se unen a los receptores sacáridos presentes en la superficie de todos los eritrocitos, independientemente del grupo sanguíneo. También existen lectinas específicas que se unen a sacáridos determinados en la superficie de los eritrocitos y son conocidos por aglutinar hematíes de un determinado grupo sanguíneo.

Efecto antiproliferativo/antitumoral: La composición de glicocalix de las células tumorales varía en comparación con las células normales, las lectinas presentan un potencial antiproliferativo

mediante la reticulación de los glucoconjugados de la superficie o por los efectos inmunomoduladores.

Efectos mitogénico y antimitogénico: Algunas lectinas presentan un efecto mitogénico, ya que tienen la propiedad de estimular la transformación de células linfocíticas en reposo en células blásticas que pueden realizar la mitosis. Este proceso se debe normalmente a la unión de los ligandos de los receptores de las células T, que comienzan la cascada de señalización IL-2, expresión genética y proliferación de los linfocitos. Aunque no siempre las lectinas muestran actividad mitogénica en linfocitos, algunas presentan el efecto contrario, son antimitogénicas, como las lectinas de *Tricholoma mongolicum* que suprimen la activación de linfocitos T y B.(9)

Actividad inmunomoduladora: Muy pocas setas presentan lectinas que presenten actividad inmunomoduladora, una de ellas son la lectinas de *Tricholoma mongolicum* que han demostrado que estimulan la producción de iones NO₂, que activa el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor activador de macrófagos.(9)

Actividad antivírica: Algunas setas presentan lectinas con propiedades antivirales como *Paxillus involutus*, que presenta actividad anti-fitovirus frente al virus del mosaico del tabaco. También se han encontrado varias setas como *Pleurotus citrinopileatus* con actividad anti-transcriptasa inversa del virus del VIH.

FIPs: Son proteínas con actividad inmunomoduladora, se caracterizan por presentar una secuencia de aminoácidos muy similar, por ello, son todas en la misma familia. Su peso molecular está en torno a los 13kD, y está compuesta de 100-114 aminoácidos. Algunas FIPs pueden estar asociadas a pequeñas cantidades de carbohidratos, otras en cambio son exclusivamente proteicas. Existen como homodímeros con forma de pesa con una estructura similar a la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

Las FIPs presentan los siguientes efectos:

Actividad hemaglutinante: Algunas FIPs son capaces de producir hemaglutinación, dependiendo del tipo puede ser a unos tipos de sangre en diferentes grados, por ejemplo la FIP-fve es capaz de aglutinar sangre humana eficientemente, mientras que otras como la FIP-vvo o la LZ8 (FIP-glu) tienen una menor capacidad. (10).

Actividad anti-anafiláctica: Algunas FIPs han demostrado tener actividad anti-anafiláctica, una de estas FIPs es la LZ8, en la cual se ha observado que su capacidad anti-anafiláctica podría estar relacionada con la alteración del ratio IL-2/IL-4, ya que el aumento de IL4 activa los linfocitos T helper (Th) 2, responsables de la secreción de IgE que es la inmunoglobulina implicada en el desarrollo de la reacción anafiláctica, sin embargo no se sabe muy bien si este efecto se debe a un aumento de la expresión de IL-2 o por represión de la IL-4.(10)

Actividad antitumoral: algunas FIPs han demostrado actividad antitumoral como por ejemplo FIP-gts, su efecto parece que puede regular el ciclo celular, haciendo que las células se mantengan en la fase G1 y hacer que las células entren en apoptosis. Lo cual inhibe la proliferación ilimitada de las células cancerígenas.

Estimulación de la proliferación de linfocitos: como resultado de un ensayo de actividad inmunológica de los FIPs, se observó que estos pueden inducir mitógenesis y promover la función inmune en células esplénicas de ratones y en linfocitos humanos en sangre periférica, Este efecto mostró diferentes grados en función de las diferentes especies y actividad dosis-dependiente.(10)

Inducción de la expresión de citoquinas: Las FIPs pueden estimular la expresión de citoquinas en linfocitos periféricos, que tienen un importante rol en la regulación inmune. Su mecanismo de acción es indirecto, a través de la mediación en la aglutinación célula-célula o célula-fundus. Las FIPs consiguen, gracias a su efecto mitógeno, la estimulación de células del sistema inmune capaces de liberar citoquinas que activan al resto de células de la inmunidad

Proteínas y péptidos con actividad antibacteriana: ciertos péptidos como plectasin, peptaibol boletusin, peptaibol chrysospermin 3 y peptaibol chrysospermin 5, presentan actividades antibacterianas frente a bacterias gram +.

La proteína *Cordyceps sinensis* antibacterial protein-N-terminal sequence ALATQHGAP (CSAP), extraída de la seta *Cordyceps sinensis*, presenta actividad bacteriostática frente a bacterias Gram +, como *Staphylococcus aureus* y en pequeña medida frente a *Bacillus subtilis*. Y frente a Gram – presenta actividad frente a *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella typhi*. También una proteína asilada de *Clitocybe sinóptica* fue activa frente a Bacterias gram negativa como *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Xanthomonas malvacearum* y *Xanthomonas oryzae*. (6)

Ribosome-inactivating protein (RIPs): Las RIPs son proteínas capaces de eliminar residuos de adenosinas de rRNA, presentan actividades biológicas como efecto anti-retrotranscriptasa inversa del VIH-1, anti-fúngica o anti-proliferativa.

Lacasas: son enzimas pertenecientes a las multicopper oxidases, enzimas que oxidan su sustrato al aceptar electrones en un centro de cobre mononuclear y transferirlas a un centro de cobre trinuclear, que están implicadas en la patogénesis, inmunogénesis y morfogénesis de los organismos y en turnover metabólico de sustancias orgánicas complejas. Se han conseguido extraer lacasas de diversas setas como *Pleurotus eryngii*, que presenta actividad anti-retrotranscriptasa inversa del VIH-1 o de *Pleurotus ostreatus*, con capacidad anti-replicante del virus de la hepatitis C.

4.2. Modificaciones de los alimentos por la cocción

En nuestra cultura lo más habitual es comer las setas tras algún tipo de tratamiento térmico; este, en general, produce cambios en la textura de los alimentos, modifica la firmeza, la consistencia, el color, etc. Esto hace que a nivel gastronómico la cocción sea algo fundamental, puesto que aparte de estos cambios en la textura, durante el tratamiento térmico se produce la reacción de Maillard que es la responsable del desarrollo de aromas y sabores del producto cocido y que aumentan en gran medida la palatabilidad de la comida.

A pesar de los beneficios en cuanto a palatabilidad en la composición nutricional la cocción afecta de manera significativa al valor nutritivo final. Esta afectación depende del tipo de cocción, no todas las cocciones afectan por igual al contenido nutricional, un estudio observó que la cocción que más afectó al contenido de cenizas, hidratos de carbono y proteínas fue la fritura profunda.(11)

Varios autores coinciden en que el contenido de **nutrientes** en las setas **tras la cocción** es **elevado**, sin embargo este efecto se debe a la pérdida de agua, por ello si en lugar de atender a la materia fresca atendemos a la **materia seca** podemos observar cómo este aumento no es real, si no que se produce **un descenso significativo**. En un estudio se observó que durante el hervido se pierden sustancias antioxidantes, vitaminas y que parte de los componentes hidrosolubles pasaban al agua de cocción(12); Otro estudio comprobó que tras la cocción se conservó en torno al 70-72% de materia seca, hidratos de carbono, grasa y proteínas.(13)

4.3. Hongos sometidos a estudio

El presente estudio se centra en el análisis de las proteínas de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*.

4.3.1. *Agaricus bisporus*.

Agaricus bisporus, llamado popularmente champiñón común, pertenece a: Clase: Eubasidiomycetes Orden: Agaricales y Familia: Agaricaceae

Características generales: Esta seta se caracteriza por presentar un sombrero carnoso de color blanco que puede ser globoso o aplanado con un diámetro de unos 5 a 10cm. En la parte inferior del sombrero se encuentran las laminillas del himenio; estas presentan un color rosado en las fases más jóvenes, que va volviéndose pardo a medida que envejece. El pie es cilíndrico, de color blanco, con una altura de unos 7 a 14 cm y una anchura de 2-4 cm. Su carne es también de color blanco, que vira a rosado en contacto con el aire.

Distribución geográfica: es **cosmopolita**, desarrollándose principalmente en las praderas.

Composición nutricional:

COMPONENTE	CANTIDAD	REFERENCIA
HUMEDAD(FM)	89,71±0,25%	(11)
CENIZAS(DM)	9,4±0,06g/100g	(11)
PROTEÍNAS(DM)	24,64±0,17g/100g	(11)
LIPIDOS(DM)	2,34±0,3g/100g	(11)
CARBOHIDRATOS(DM)	63,66±0,03g/100g	(11)
ENERGÍA(DM)	374,2±0,5g/100g	(11)
GLUCANOS(DM)	15,97±0,69g/100g	(11)
POLIFENOLES TOTALES (DM)	181,99±2,29µg GAE/100mg	(11)
AGS(DM)	23,08%	(14)
AGM(DM)	15,31%	(14)
AGP(DM)	61.61%	(14)
ERGOSTEROL LIBRE(DM)	6,42±0,15mg/g	(15)

Tabla 1: Composición nutricional de *A. bisporus*

Efectos beneficiosos: Los principales efectos beneficiosos de *A. bisporus* son el efecto inmunomodulador y anti-tumoral y el anti-bacteriano

Efecto inmunomodulador: Presenta actividad inmunomoduladora al activar macrófagos para que produzcan TNF- α y óxido nítrico.

Efecto anti-proliferativo: *Agaricus bisporus* presenta lectinas con actividad antiproliferativa de varias líneas celulares cancerígenas, ya que suprime la síntesis de ADN y la producción de inmunoglobulina en linfocitos T y B humanos que reducen el crecimiento de algunas líneas celulares tumorales.

Efecto antibacteriano y anti-vírico: Extractos de *A. bisporus* han demostrado efecto antimicrobiano frente a bacterias gram positiva como: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus flavus* y *Micrococcus luteus*. Y frente a las siguientes bacterias Gram negativa: *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiellapneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Slmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica*. Las lectinas de *A. bisporus* han demostrado tener actividad inhibitoria de VIH

Propiedades perjudiciales: *A.bisporus* contiene Agaritina, un ácido L-glutámico que puede ser activado enzimáticamente en un metabolito mutagénico, unirse al ADN y formar aductos.

4.3.2. **Pleorotus ostreatus.**

Pleurotus ostreatus, comúnmente se conoce como seta de ostra, por la similitud de su sombrero con dicho molusco. Perteneciente a: Clase: Eubasidiomycetes Orden Agaricales y Familia: Pleurotaceae

Características generales: El sombrero de esta seta es aplanado, con bordes irregulares y márgenes enrollados, que a medida que madura la seta se van desenrollando; tiene un tamaño variable entre 5 y 20cm de diámetro y su color varía entre el gris, crema, amarillento y azulado negruzco. Las laminillas son largas y desiguales, de color blanco o crema; el pie es excéntrico y puede presentarse en uno de los bordes, suele ser corto aunque es posible que sea inexistente. La carne de esta seta es blanca, de consistencia firme, espesa, con un olor intenso y sabor agradable aunque poco definido.

Distribución geográfica: es también **cosmopolita**, y se desarrolla principalmente en bosques caducifolios, ya que se alimenta de manera saprófita de los troncos y hojas muertos.

Composición nutricional:

COMPONENTE	CANTIDAD	REFERENCIA
HUMEDAD	89,41±0,27 g/100g	(11)
CENIZAS	6,73±0,05 g/100g	(11)
PROTEÍNAS	12,5±0,24 g/100g	(11)
LÍPIDOS	2,46±0,01 g/100g	(11)
CARBOHIDRATOS	78,35±0,36 g/100g	(11)
ENERGÍA	382,5 ±0,1 g/100g	(11)
GLUCANOS	49,15±0,52 g/100g	(11)
POLIFENOLES TOTALES	30,08±1,23 µg GAE/100mg	(11)
AGS	17,0±0,5%	(16)
AGM	13,6±0,3%	(16)
AGP	69,4±0,7%	(16)
ERGOSTEROL LIBRE	3,31±0,17mg/g	(15)

Tabla 2: Composición nutricional de *P. ostreatus*

Propiedades beneficiosas: Entre las propiedades beneficiosas que presenta *P. ostreatus* se encuentran:

Actividad inmunomoduladora: Presenta diferentes tipos de polisacáridos que pertenecen a los β-glucanos, heteroglicanos y proteoglicano, de los cuales el más importante es el pleurano, ya que es el más efectivo.

Efecto anti-hipercolesterohémico: Contiene además lovastatina, una molécula de la familia de las estatinas, que inhibe la ruta de síntesis del colesterol, reduciendo los niveles de colesterol sanguíneo.

Efecto antiproliferativo: Presenta lectinas que inhiben sarcoma S180 y hepatoma H-22 *in vivo*. (17)

Efecto anti-bacteriano: *P. ostreatus* presenta actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella typhimurium*.

Efectos perjudiciales: *P. ostreatus* contiene ostreolisina una proteína ácida de 16kD, que forma parte de la familia de las proteínas aegerolisinas. Causa un incremento transitorio de la presión arterial y después una progresiva caída de la presión acompañada de bradicardia, isquemia miocárdica y extrasístoles. La hiperkalemia resultante de la actividad hemolítica

probablemente juega un papel importante en su toxicidad. También puede contener Orellanina que es un alcaloide y una micotoxina.

5. JUSTIFICACIÓN

En los estudios encontrados hasta la fecha en relación a las proteínas de setas se ha observado como la tendencia general se ha centrado principalmente en cómo afecta la cocción a la cantidad de proteínas, sin embargo, no hay estudios que observen cómo afectan los diferentes tipos de cocción a las diferentes fracciones de proteínas, ni de las diferencias existentes entre las diferentes partes de las setas (pie y sombrero). Además, tampoco se ha observado como esta afectación en cuanto al perfil de proteínas. Por otro lado, también es cierto que en muchos de los estudios las cocciones empleadas en él no se corresponden con la cocción más típica de la seta.

El presente estudio pretende estudiar el efecto de la cocción en las albúminas y globulina de dos setas para determinar cómo se ven afectadas tras el tratamiento térmico.

La importancia de este estudio radica en observar cuales de las proteínas son resistentes al tratamiento térmico, que en futuras investigaciones podrían relacionarse con sus efectos beneficiosos o perjudiciales como son el efecto inmunomodulador o el desarrollo de reacciones alérgicas.

6. OBJETIVOS

El objetivo principal de dicho estudio es observar como la cocción modifica la cantidad de proteínas (albúminas y globulinas) y observar cuales son las proteínas más y menos afectadas por dicho tratamiento, así como observar las diferencias existentes entre el sombrero y el pie en estos aspectos.

Los objetivos fueron los siguientes:

I. Determinar el contenido total de proteínas de las setas estudiadas en crudo y observar su modificación tras los procesos de cocción.

II. Determinar los pesos moleculares de las proteínas de las setas sometidas a estudio crudas y observar las modificaciones que se producen en ellas tras los procesos de cocción.

III. Observar las diferencias existentes entre las proteínas procedentes del pie y las procedentes del sombrero de cada una de las setas

Para el presente estudio he realizado la siguiente búsqueda de artículos en PubMed, los términos de la búsqueda y el número de estudios encontrados se resumen en la siguiente tabla:

PALABRA CLAVE	NÚMERO DE ARTÍCULOS			NÚMERO DE REVISIONES		
	10 años	5 años	Total	10 años	5 años	Total
MUSHROOM	8692	5051	15765	442	276	775
+CHEMICAL COMPOSITION	3397	2346	7448	192	126	308
+NUTRITIONAL VALUE	157	114	213	23	17	28
+PROTEIN FRACTION	116	61	245	0	0	2
+COOKING	44	31	84	5	3	7
COOKING +<i>AGARICUS BISPORUS</i>	4	3	8	1	1	1
COOKING + <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	9	7	11	0	0	0

Tabla 3: Búsqueda en Pubmed

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIALES

7.1.1. Equipos:

Se han requerido los siguientes equipos para la elaboración de las diferentes pruebas:

- Centrifuga ORTO ALRESA-Digicen R
- Microcentrifuga Labnet Spectrafuge 24D
- Placa vitrocerámica Edesa
- Equipo de electroforesis BIORAD Miniprotean
- Campana de seguridad clase II Kötterman
- Picadora de hielo LOMI
- Agitador de tubos Raypa MIXTUB
- Micropipeta Hamilton
- Agitador magnético ACS-160: J.Jimeno S.A.
- Balancín: Labnet Rocket 25
- Balanza de precisión: GRAM FV 120
- Balanza: KERN 572
- Baño de agua: Velp Scientifica (multistirrer 6)
- Congelador: Miele
- Escaner para geles BIORAD
- Espectrofotómetro: Thermo scientific Helios Epsilon
- Pipetas automáticas: Biohit Proline Plus

7.1.2. Material fungible

El material fungible que se ha necesitado para realizar el estudio ha sido:

- Botellas de vidrio de diversos volúmenes de 50ml a 2l
- Puntas de micropipetas
- Tubos de 50ml
- Tubos Eppendorf 1,5ml
- Cubetas espectrofotométricas desechables
- Tubos de diversos tamaños de 10ml a 50ml
- Vasos de precipitados
- Mortero y pilón de porcelana
- Espátulas
- Gradilla de tubos
- Imanes agitadores
- Papel de filtro
- Parafilm M
- Pinzas
- Probetas
- Tijeras
- Geles preformados electroforesis BIORAD
- Tripas de celulosa para electroforesis de 23,8mm de diámetro
- Guantes de látex

7.1.3. Reactivos

La lista de los reactivos empleados para la realización del trabajo es la siguiente:

Reactivo	Casa comercial
Acetona	Panreac
Ácido acético glacial	Panreac
Ácido tricloroacético (TCA)	Panreac
Agua Elix	
Albúmina sérica bovina (BSA)	Roche
Azul Comassie	BIORAD
Carbonato de sodio	Panreac
Cloruro sódico	Panreac
EDTA	Panreac
Etanol	VWR Prolabo Chemicals
Hidróxido de sodio	J.T. Backer
Marcador electroforesis	BIORAD
Reactivo de Biuret	Panreac
Reactivo de Folin	VWR Prolabo Chemicals

Sample buffer	BIORAD
Sulfato de cobre	Merk
Tampon Tris/Glicina/SDS 10x	BIORAD
Tartrato sódico potásico	Panreac

7.1.4. Materiales biológicos

Para el presente estudio se emplearon muestras de *A.bisporus* y *P. ostreatus*

7.1.5. Preparación de disoluciones

Para el presente estudio se han elaborado las siguientes disoluciones:

Solución de cloruro sódico (NaCl) 0,5M: Para elaborar un litro de la disolución en un vaso de precipitados disolvemos 29,2449g de NaCl en un volumen de agua inferior a 1 litro, cuanto esté bien disuelto vertemos la disolución en una probeta de 1L y enrasamos hasta un volumen de 1 litro. Esta disolución es empleada para extraer las albúminas y globulinas, ya que, ambas fracciones son solubles en esta solución.

Solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2mM y carbonato de sodio (NaCO₃) al 2%: para elaborar 2 litros de esta solución añadimos 1,16896g de EDTA y los mezclamos con un volumen de agua inferior a los 2 litros, después añadimos 4g de Carbonato de sodio hasta que se disuelva por completo, por último vertemos la disolución en una probeta de 2L y enrasamos con agua hasta los 2 litros.

Solución de ácido tricloro acético (TCA) 50%: Para elaborar 100ml de esta solución vertemos en una probeta con una pequeña cantidad de agua un volumen de 50ml de TCA y enrasamos con agua hasta 100ml.

7.2. MÉTODOS

7.2.1. Cocción de las setas

7.2.1.1. Salteado

El salteado se realizó de la siguiente manera, salteamos el ajo y el jamón a fuego fuerte, cuando el ajo esté dorado se añade la parte de la seta con la que se va a hacer el extracto y se mueve hasta que esté hecha. Una vez cocinadas separamos las setas y las lavamos con agua

para evitar interferencias. Las cantidades y tiempo variaron en función de la cantidad de seta empleada, y se resumen en la siguiente tabla:

	<i>Pleurotus ostreatus</i>		<i>Agaricus bisporus</i>	
	Sombrero	Pie	Sombrero	Pie
MUESTRA (g)	75,3	11,95	78,28	34,63
AJO (g)	3,31	1,77	6,33	6,4
ACEITE (ml)	4	4	4	4
JAMÓN (g)	5	5,25	10,6	6
TIEMPO	3m 5s	1m 50s	3m 34s	2m 50s

Tabla 4: Cantidades y tiempos empleados en la elaboración del salteado

7.2.1.2. Risotto

Para la realización del risotto, en primer lugar, calentamos el aceite y doramos el ajo y la cebolla, cuando esté dorado añadimos el champiñón, dejamos que se haga durante 1 minuto y añadimos el tomate, a los 3 minutos añadimos el arroz y removemos constantemente, vamos añadiendo el agua poco a poco y dejándola reducir hasta que se acabe la cantidad total que debemos añadir, antes de terminar incorporamos el queso y removemos. Al igual que en el caso anterior una vez terminada la cocción separamos las setas y las lavamos con agua para evitar interferencias como inclusión de proteínas de los resto ingredientes empleados en la elaboración del plato.

Las cantidades y tiempos variaron en función de la cantidad de seta empleada y se resumen en la siguiente tabla:

	<i>Pleurotus ostreatus</i>		<i>Agaricus bisporus</i>	
	Sombrero	Pie	Sombrero	Pie
MUESTRA (g)	75,19	12,52	74,71	35,45
AJO (g)	4,18	4,74	5,31	4,47
ACEITE (ml)	22	20	30	20
CEBOLLA (g)	59	11,96	62,96	36,94
TOMATE (g)	71,7	27,69	69,95	35,94
AGUA (g)	375,95	62,6	373,55	177,35
ARROZ (g)	91,19	50,96	89,62	42,47
QUESO (g)	23,06	3,75	22,47	10,56
TIEMPO	28m	29m	34m	26m 30s

Tabla 5: Cantidades y tiempos empleados en la elaboración del risotto

7.2.2. Preparación del extracto

La preparación del extracto se realizó de la siguiente manera:

Se tomaron 4g de la muestra de seta al cual se le añadieron 16ml de una solución de NaCl 0,5M y se trituraron en el mortero. Este extracto se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos, las muestras crudas se volvieron a centrifugar debido a que presentaban una mayor turbidez.

7.2.3. Diálisis de las muestras

Los extractos se purificaron mediante diálisis en tripa de celulosa para evitar interferencias de otras moléculas como los glucanos en las determinaciones por electroforesis y así conseguir que las bandas se vean mejor. Para llevar a cabo este procedimiento, en primer lugar se prepararon las tripas de celulosa, para ello se cortaron a la medida necesaria y se hirvieron durante 10 minutos en una solución de lavado 2mM de EDTA y carbonato de sodio al 2% moviendo constantemente la tripa durante el hervido ya que suelen acumular aire que puede salir de forma brusca durante el hervido. Una vez hervidas se aclararon 3-4 veces con agua elix y se vuelven a hervir otros 10 minutos en la solución 2mM de EDTA y carbonato de sodio al 2%, pasado ese tiempo aclaramos de la misma forma que en el apartado anterior y se mantienen a 4°C en agua Elix.

Aclaramos la tripa con agua Elix antes de usarla y realizamos un nudo en uno de los extremos, a continuación con cuidado vertemos el extracto que se quiere dializar, una vez hecho se cierra la tripa dejando una pequeña cámara de aire. Las tripas se dejan en agua suficiente y en movimiento durante 16h en refrigeración (4°C) cambiando cada 8 horas el agua de diálisis.

Una vez realizado el dializado de las muestras se alicuotaron y se almacenaron en congelación a -24°C.

7.2.4. Concentración de las muestras

Debido a que la cantidad de proteínas en las muestras era escasa se concentraron con ácido tricloroacético (TCA). Para ello se añadió a 1 ml de muestra 250ml de TCA 50% y se dejó reposar en baño frío durante 30 minutos, después se centrifugaron las muestras a 10.000rpm durante 15 minutos, se retiró con cuidado el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y los restos que pudieron quedar con papel absorbente. A continuación, se añadió 1ml de acetona fría, se retiró de la misma forma que en el caso anterior y se secaron los eppendorf con calor

indirecto. Finalmente se añadieron 100ml de la solución de NaCl 0,5M y se resuspendió el pellet en esta solución.

7.2.5. **Determinación de la cantidad de proteínas de setas**

Según a AOAC el método de referencia para la cuantificación de proteínas es el método de Kjeldahl, que mide la cantidad de nitrógeno total de una muestra, y precisa de un factor que determine la cantidad de nitrógeno proteico en relación con el nitrógeno total. Este factor normalmente suele ser de 6,25, aunque en las setas, debido a la presencia de quitina (polisacárido rico en nitrógeno), este factor es diferente, en la literatura científica suele usarse el valor de 4,38, este valor fue obtenido en *A. bisporus*, y ya que la cantidad de quitina es variable en función de la seta, podría no ser extrapolable al resto de setas.

En el presente estudio se ha optado por emplear el método del Biuret, ya que este método se basa en la cuantificación de enlaces tripeptídicos, por lo que eliminaría el efecto de la quitina. Aunque es cierto que esta técnicas no son tan precisas como el método de Kjeldahl, sí que es cierto que en ciertas ocasiones se ha observado una buena correlación entre esta y el Kjeldahl.

7.2.5.1. *Método del Biuret*

El método del Biuret es un método colorimétrico para la cuantificación de proteínas. Se basa en el uso del reactivo de Biuret, que contiene, sulfato de cobre e hidróxido de sodio. El método se basa en la capacidad del cobre de formar un enlace de coordinación en medio básico entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos produciendo un cambio de color desde el azul al púrpura y presentando un máximo de absorción a 540nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de tripeptidos de la muestra y por tanto a la cantidad de proteína.

7.2.6. **Valoración cualitativa de las proteínas de setas mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La electroforesis es una técnica que permite el transporte y separación de sustancias mediante el uso de un campo eléctrico, por ello la electroforesis únicamente puede realizarse con moléculas que presenten carga eléctrica (ácidos nucleicos y proteínas). El comportamiento que van a tener las moléculas bajo el influjo del campo eléctrico se puede determinar mediante la

carga electroforética, (U) que depende del tamaño, de la forma y de la carga; se define según la siguiente ecuación:

$$U = \frac{1}{E} \frac{dX}{dt} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ v}^{-1}$$

La electroforesis de zona es aquella en la que se usa un soporte estabilizante que contiene las moléculas que queremos someter al proceso. Este soporte es el elemento más importante puesto que condiciona el tipo de electroforesis; debe reunir una serie de características básicas como la habilidad de reducir al máximo la difusión y la convección y resistencia a los tampones más habituales para realizar la electroforesis, así como permitir el paso de agua y moléculas voluminosas a través de sus poros y no presentar cargas que interfieran con las de la muestra.

Podemos clasificar los **soportes** en **dos tipos**:

Grupo I o soportes no restrictivos son aquellos en los que el tamaño del poro no limita el movimiento de las moléculas. Dentro de este grupo se pueden encontrar soportes de agarosa y soportes de celulosa.

Grupo II o soportes restrictivos: dentro de este grupo encontramos los soportes elaborados con poliacrilamida; en estos geles el tamaño del poro es similar al de las proteínas, ofreciendo un efecto de tamiz y haciendo que la separación de las moléculas no solo dependa de la densidad de carga, sino también de su tamaño.

Los geles de poliacrilamida presentan la ventaja de ser químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica. Por ello la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es la técnica de separación más extensamente usada para la caracterización de mezclas complejas de proteínas.

Los geles de poliacrilamida presentan la particularidad de que el tamaño del poro puede ser elegido previamente a su elaboración. La poliacrilamida se forma a partir de la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida, y en función de la proporción de ambas, las características del gel resultante varían, entre ellas el tamaño del poro. La poliacrilamida además permite también elaborar geles en gradiente, permitiendo una separación de sustancias con mayor definición dentro del soporte.

La electroforesis en geles de poliacrilamida más común es la que usa sodiododecilsulfato (SDS), un detergente que produce la desnaturalización de las proteínas, permitiendo así que la conformación secundaria o terciaria no afecte a la movilidad electroforética y dependa únicamente de la carga y el tamaño. Además el SDS reacciona con las cargas positivas de las moléculas dejando únicamente cargas negativas permitiendo una motilidad electroforética en un único sentido.

8. RESULTADOS

Como ya se ha comentado el experimento se ha realizado solo sobre albúminas y globulinas, pero en aras de una mejor comprensión, a partir de este momento utilizaré el termino proteína para designar ambos términos en conjunto.

8.1. Determinación de proteínas totales mediante el método de Biuret:

Se determinó el contenido total de proteínas mediante el método del Biuret en los extractos preparados, según el protocolo especificado en el ANEXO I.

Con los datos de la absorbancia de los patrones (BSA: 2mg/ml) se elaboró una recta patrón sobre la cual se extrapolaron los contenidos de proteína de las muestras.

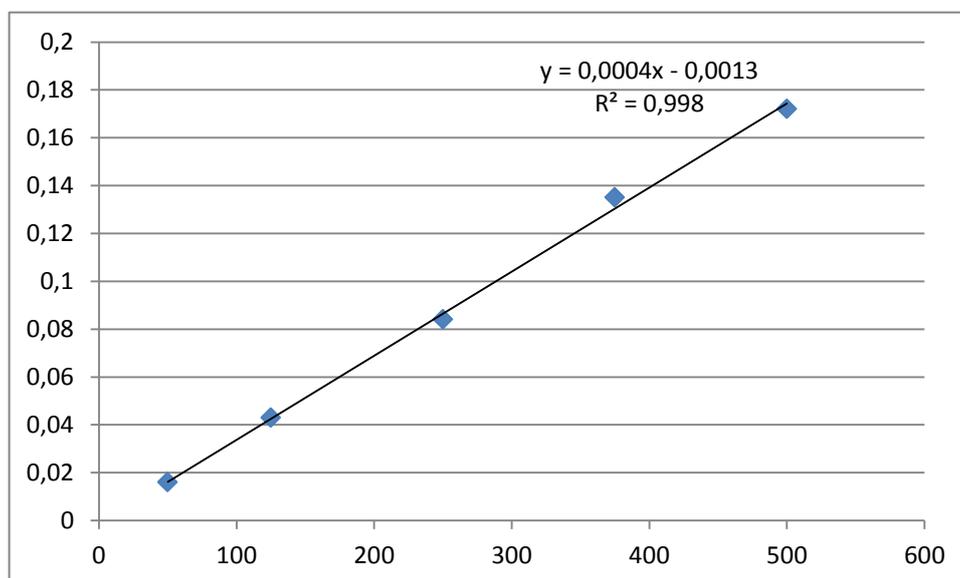


Figura 5: Recta patrón del Biuret

Sobre esta recta patrón se extrapolaron los valores de las absorbancias de las muestras, para hallar el contenido total de proteínas, los datos obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

COCCIÓN	PARTE	PROTEÍNA(μg)	
		<i>P. ostreatus</i>	<i>A. bisporus</i>
CRUDO	PIE	5,84	2,96
	SOMBERO	6,84	5,6
SALTEADO	PIE	3,94	7,96
	SOMBRERO	5,64	7,64
RISSOTO	PIE	6,08	10,48
	SOMBRERO	9,5	5,68

Tabla 6: Cantidad de proteína de las muestras

En cuanto a la cantidad de proteína en función de la parte de la seta *P. ostreatus* presenta siempre una mayor cantidad de proteínas en el sombrero que en el pie; Esto no es igual en *A. bisporus*, en este tras la cocción la cantidad de proteína en el pie es mayor.

Las mayores concentraciones de proteínas se encuentran en el sombrero en risotto, y en pie en risotto para *P. ostreatus* (9,5 μg) y *A. bisporus* (10,48 μg) respectivamente. Y, en contraposición, las menores concentraciones de proteína se encuentran en el pie salteado de *P. ostreatus* (3,94 μg) y en el pie crudo de *A. bisporus* (2,96 μg).

8.2. Determinación del perfil proteico de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, mediante electroforesis SDS-PAGE.

Para la determinación de perfil proteínico se realizó una electroforesis SDS-PAGE según el protocolo indicado en el ANEXO I. Se tomaron imágenes de geles obtenidos y se determinó la distancia existente entre los diferentes pesos moleculares del patrón y el origen, con estos datos se elaboró una recta patrón sobre la cual se extrapolaron el resto de medidas de los perfiles proteínicos de las muestras.

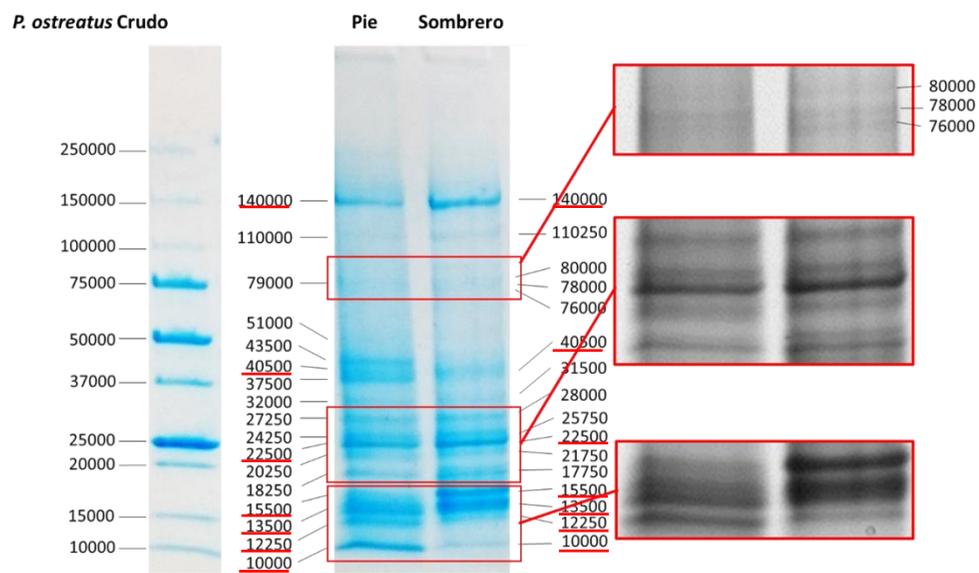


Figura 6: Electroforesis de *P. osteratus* crudo

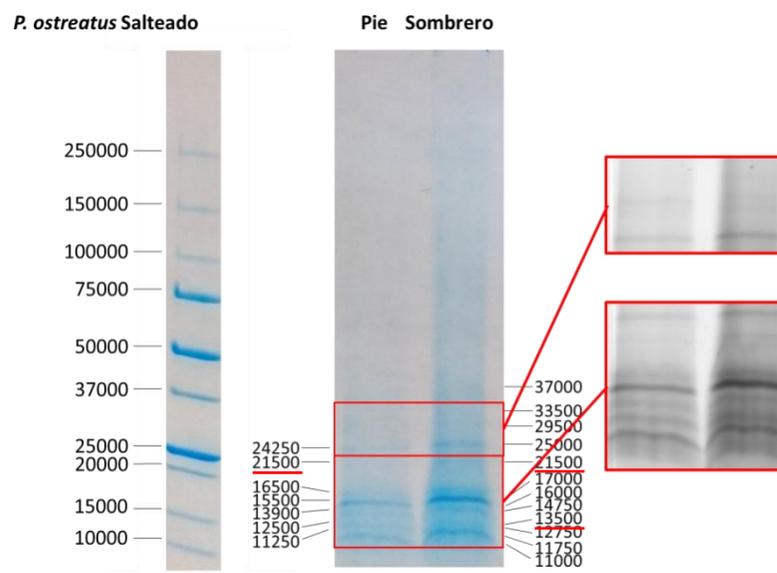


Figura 7: Electroforesis de *P. osteratus* salteado

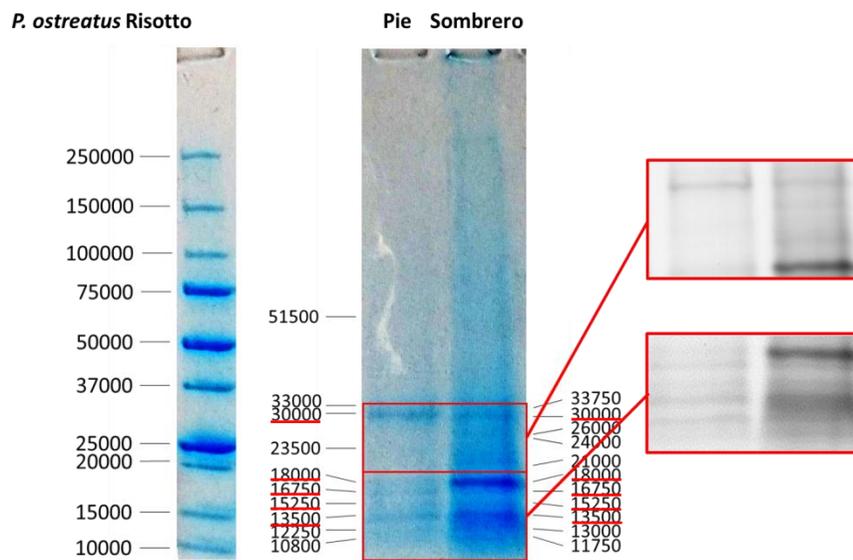


Figura 8: Electroforesis de *P. osteratus* en risotto

Una de las primeras cosas que se puede observar en los perfiles correspondientes al **pie de *P. ostreatus*** (Figuras 6, 7 y 8) es que la intensidad del color es menor que en el sombrero, esto se debe a que contienen una menor cantidad de proteína, dato que concuerda con lo observado anteriormente en método del Biuret.

En las **muestras crudas** de *P. ostreatus* (Figura 6) podemos observar primeramente, en función de la intensidad del color del perfil proteico, que la cantidad de proteínas que presenta el sombrero es mayor que la del pie. En cuanto al número de bandas identificadas, el número es muy similar, ya que en el pie se encontraron un total de 17 bandas, mientras que en el sombrero fueron 16. A pesar de esta similitud en cuanto al número de bandas, la cantidad de bandas que comparten el pie y el sombrero es escasa, son únicamente siete, que se corresponden con los pesos moleculares 140000, 40500, 22500, 15500, 13500, 12250 y 10000 D. Las bandas con mayor intensidad en las muestras crudas de *P. osteratus*, en muchos casos son bandas que aparecen tanto en el sombrero como en el pie, estas son las que se encuentran en 140000, 22500, 13500D, además de estas, el pie presenta una banda de color intenso en 10000D y el sombrero en 15500D.

En la electroforesis de *P. ostreatus* tras el **salteado** (Figura 7) se aprecia una pérdida significativa de la intensidad y número de las bandas, en cuanto a número de bandas en el pie únicamente se encuentran seis, en cambio en el sombrero hay un total de once bandas, en ambos casos la mayor parte de las bandas se encuentran entre los pesos moleculares de 30000 y 11000D. Tras el este proceso de cocción las bandas que presentan tanto el pie como el sombrero es muy escasa, ya que únicamente comparten una banda que se encuentra en 215000D. En este caso las bandas de mayor intensidad en el pie están en 15500 y 11250, mientras que en el sombrero están en 25000, 16000 y 11750D, no habiendo coincidencia en ninguna de ellas.

Por último en la electroforesis de las muestras de *P. ostreatus* elaboradas en **risotto** (Figura 8), los perfiles presentan también un color menos intenso, especialmente en el pie, y un menor número de bandas. El número de bandas que presentan los perfiles proteicos de pie y sombrero son similares, siendo de diez en el caso del pie y de once en el del sombrero, concentrándose al igual que en el caso anterior en la franja ente 30000D y 11000D. Sin embargo en este caso la similitud entre las bandas de ambos perfiles es mayor, ya que comparten las bandas que se encuentran en 30000, 18000, 16750, 15250 y 13500D. Tanto pie

como sombrero presentan una banda de color intenso en los 30000D, además el sombrero presenta otras bandas intensas en 18000, 13500D.

En general **tras el proceso de cocción** se observa una pérdida importante de proteínas, especialmente de aquellas con pesos moleculares más elevados. El proceso de cocción produce la pérdida de gran cantidad de proteínas, sin embargo cabe destacar el hecho de que la franja de 13500D del sombrero se mantienen tras ambos procesos de cocinado.

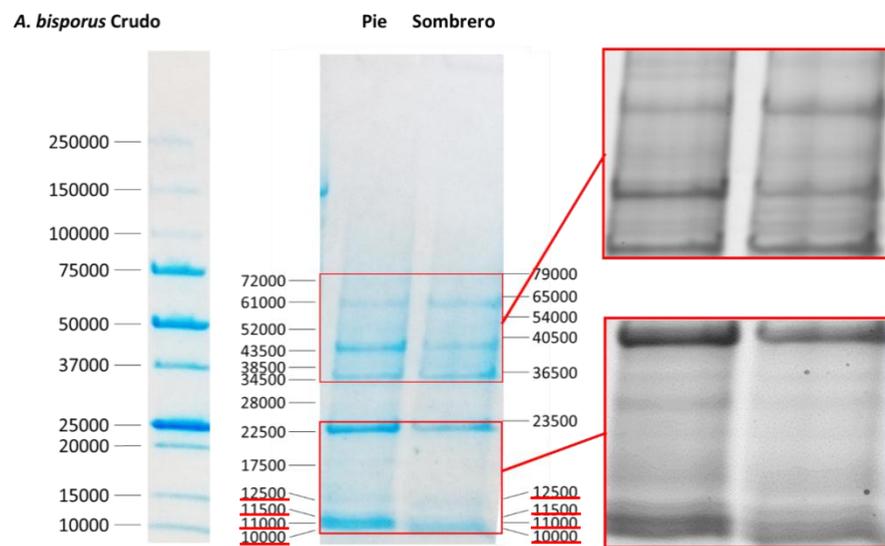


Figura 9: Electroforesis de *A. bisporus* en crudo

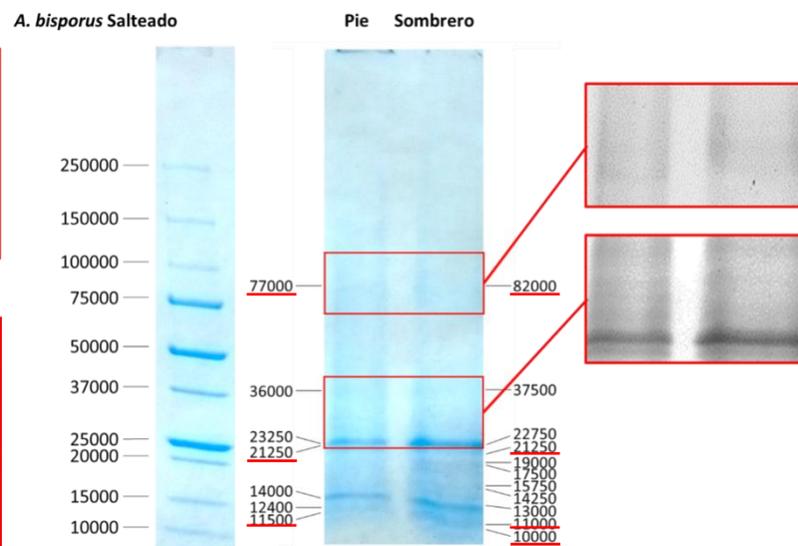


Figura 10: Electroforesis de *A. bisporus* salteado

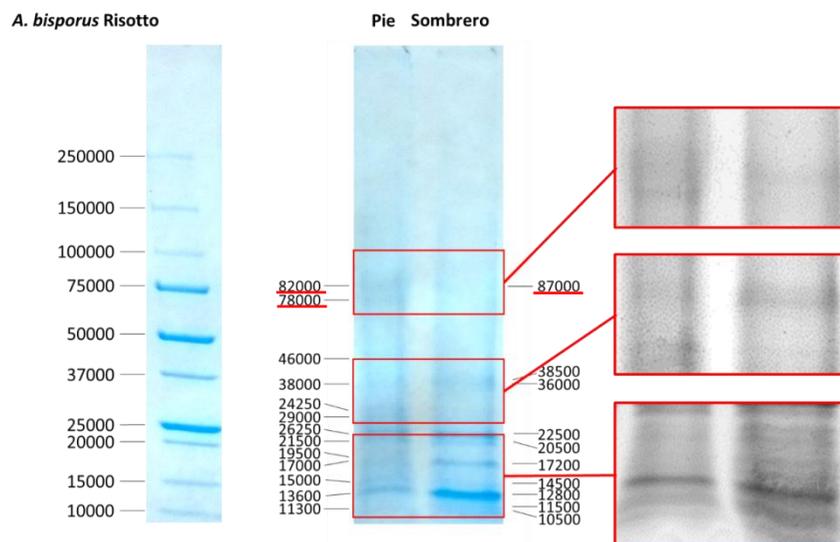


Figura 11: Electroforesis de *A. bisporus* en risotto

Al igual que en el caso anterior podemos observar como la intensidad de las bandas de los perfiles proteicos de los **pies de *A. bisporus* (Figuras 9, 10 y 11)** son más claras, debido a la menor cantidad de proteína, excepto en el caso del pie crudo (Figura 9) que parece ser mayor. Todo esto contrasta totalmente con los datos obtenidos mediante método del Biuret (Tabla 6), en la que se aprecia que los valores de las muestras de los pies de *A. bisporus* que han sufrido tratamiento térmico son superiores a sus respectivos sombreros.

En cuanto a los perfiles proteicos del sombrero y el pie **crudo** de *A. bisporus* (Figura 9), observamos que el número de bandas es inferior al observado en *P. ostreatus*, y que el pie cuenta con trece bandas y el sombrero con diez. La similitud de los perfiles es también menor, en este caso comparten las bandas que se encuentran en 12500, 11500, 11000 y 10000 D. Y las bandas con mayor intensidad son en el pie las bandas de 42500, 22500 y 11000D, mientras que en el sombrero son las que aparecen en 36500 y 23500D, no presentando en este caso coincidencias entre bandas con mayor intensidad entre el sombrero y el pie.

Tras el **salteado**, en el perfil proteico del pie y el sombrero de *A. bisporus* (Figura 10) observamos que al igual que en los casos anteriores, se ha producido una pérdida de intensidad del color; las franjas totales que aparecen son siete y once respectivamente que se encuentran principalmente entre los 23000 y 10000D, apareciendo entre ambas una única franja común en 21250D. Las bandas más intensas en el salteado son las que se encuentran en 23250 y 14000 en el pie y en 22750 y 13000 en el sombrero, y no presentan ninguna banda común.

En las muestras empleadas en el **risotto** de *A. bisporus* (figura 11) la pérdida en la intensidad de color es similar al caso anterior, al igual que el número de bandas del sombrero que presenta 10 bandas, sin embargo en el caso del pie es algo superior ya que aparecen 13 bandas, situadas entre los 87000 y 10500D, sin embargo ninguna banda es común a ambas partes. Las bandas de color más intenso dentro de este perfil son las situadas en 26250 y 13600D en el pie y 22500, 172000 y 12800D en el sombrero.

En cuanto a la **similitud entre los perfiles** proteínicos de pie y del sombrero tras los procesos de cocción en este caso no se han encontrado ningún tipo de concordancia que se mantenga en las tres. Aunque si hay bandas que se han conservado tras el salteado, dentro del pie se ha conservado la banda de 11500D y en el sombrero se han mantenido las bandas 11000 y 10000D.

Un dato importante es el hecho de que tanto en el extracto de *A.bisporus* en salteado como en risotto, han aparecido bandas con **pesos moleculares superiores** al valor superior de la seta en crudo (77000 y 82000D en el salteado de pie y sombrero respectivamente y 82000 y 78000D en el pie de la seta en risotto y 87000D en el sombrero de la misma). Esto puede ser debido a la contaminación con proteínas de los ingredientes usados tanto en el risotto como en el salteado como el arroz, el tomate, el jamón, el queso, el ajo o la cebolla

9. DISCUSIÓN

Una de las primeras cosas que podemos observar tras el análisis de los datos es la discordancia entre los datos del Biuret y los datos obtenidos en el perfil proteínico de ambas setas en cuanto a cantidad de proteínas presentes en muestras crudas, muestras salteadas o muestras en risotto, ya que, tanto en experimentos anteriores(13), como en el ensayo de Biuret, la concentración de proteína en materia fresca de muestras cocinadas es superior a la presente en setas crudas. Esta discordancia con la literatura científica también se encuentra dentro del Biuret en los datos de *P. ostreatus*.

Otro de los aspectos a comentar es el hecho de que haya en el caso de *P. ostreatus* una banda que se mantenga en el sombrero tras el proceso de cocinado y en el pie aparezca tanto en crudo como en risotto, esto puede ser debido a que es una proteína termo-resistente que podría mantenerse durante la cocción.

Durante el análisis de las muestras crudas de las bandas se han observado algunas bandas muy cercanas a bandas que están presentes en las muestras en crudo. Estas proteínas pueden ser derivadas de las proteínas presentes en el extracto crudo que han sufrido una degradación parcial por el tratamiento térmico y cuya identidad habría que determinar mediante secuenciación, lo que no ha sido posible en este trabajo

Es indudable que el tratamiento térmico de las setas estudiadas provoca cambios fundamentales en degradación y desnaturalizaron de algunas proteínas. No obstante algunas proteínas de bajo peso molecular resisten bien el tratamiento térmico. Estas proteínas muy probablemente se encuentran entre las que colectivamente se denominan FIPs (Fungal Immunomodulatory Proteins) que son responsables de muchas de las propiedades que estas setas presentan sobre el sistema inmune.

Por tanto en base a nuestros resultados está claro que es necesaria una mayor investigación para determinar cuáles son las proteínas que se mantienen tras la cocción y si estas podrían llegar a tener un efecto beneficioso o perjudicial tras su ingesta.

10. CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados del presente estudio he podido concluir que:

1. Existen diferencias en cuanto al perfil proteínico entre el sombrero y los pie de *A. bisporus* y *P. ostreatus*.
2. El perfil de proteínas de los extractos crudos de pie y sombrero de *P. ostreatus* crudo es más parecido que en el caso de *A. bisporus*
3. Algunas proteínas parecen mantenerse durante el proceso de cocción
4. La similitud entre el pie y el sombrero tras la cocción es escasa, especialmente en *A. bisporus*.
5. El tratamiento térmico reduce la intensidad del perfil proteico del sombrero y el pie, y por tanto la cantidad de proteína, y a la similitud entre ellos; afectando principalmente a las proteínas de mayor peso molecular.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Wang XM, Zhang J, Wu LH, Zhao YL, Li T, Li JQ, et al. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. Food Chem. Elsevier Ltd; 2014;151:279–85.
2. Kalač P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. J Sci Food Agric. 2013;93(2):209–18.
3. Yin JZ, Zhou LX. Analysis of nutritional components of 4 kinds of wild edible fungi in Yunnan. Food Res Dev. 2008;29:133–6.
4. Cheung PCK. The nutritional and health benefits of mushrooms. Nutr Bull. 2010;35:292–9.
5. Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, Todorovic N, Vunduk J, Petrovic P, et al. Antioxidants of Edible Mushrooms. Molecules. Switzerland; 2015 Oct;20(10):19489–525.

6. Alves MJ, Ferreira ICFR, Dias J, Teixeira V, Martins A, Pintado M. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Med.* Germany; 2012 Nov;78(16):1707–18.
7. Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *J Funct Foods.* Elsevier Ltd; 2012;4(4):687–709.
8. Graeme KA. Mycetism: a review of the recent literature. *J Med Toxicol.* United States; 2014 Jun;10(2):173–89.
9. Hassan MAA, Rouf R, Tiralongo E, May TW, Tiralongo J. Mushroom lectins: Specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):7802–38.
10. Li Q, Wang X, Zhou X. Recent status and prospects of the fungal immunomodulatory protein family. *Crit Rev Biotechnol.* 2011;31(4):365–75.
11. Roncero-Ramos I, Mendiola-Lanao M, Pérez-Clavijo M, Delgado-Andrade C. Effect of different cooking methods on nutritional value and antioxidant activity of cultivated mushrooms. *Int J Food Sci Nutr.* Informa UK Ltd.; 2017;68(3):287–97.
12. Faller ALK, Fialho E. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Res Int.* 2009;42(1):210–5.
13. Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem.* 2001;73(3):321–5.
14. Glamočlija J, Stojković D, Nikolić M, Ćirić A, Reis FS, Barros L, et al. A comparative study on edible *Agaricus* mushrooms as functional foods. *Food Funct.* 2015;6(6):1900–10.
15. Villares A, Mateo-Vivaracho L, García-Lafuente A, Guillamón E. Storage temperature and UV-irradiation influence on the ergosterol content in edible mushrooms. *Food Chem.* Elsevier Ltd; 2014;147:252–6.
16. Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira ICFR. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food Chem Toxicol.* Elsevier Ltd; 2012;50(2):191–7.
17. Singh RS, Bhari R, Kaur HP. Mushroom lectins: current status and future perspectives.

Crit Rev Biotechnol. England; 2010 Jun;30(2):99–126.

18. Bauer Petrovska B. Protein fraction in edible macedonian mushrooms. Eur Food Res Technol. 2001;212:469–72.

12. ANEXOS

12.1. ANEXO I

Para la realización del presente trabajo se han realizado un método para la cuantificación de proteínas (Biuret) y un método para la separación de proteínas (SDS-PAGE).

En este anexo se van a desarrollar los protocolos que se han seguido para la realización de cada una de las pruebas.

12.1.1. Método del Biuret

12.1.1.1. *Objetivo*

Determinación de albúminas y globulinas totales de setas

12.1.1.2. *Material y métodos*

- Micropipetas automáticas
- Tubos de 10ml
- Cubetas espectrofotómetro
- Espectrofotómetro
- Agitador de tubos
- Reactivos:
 - Reactivo de Biuret
- Muestras:
 - Muestras dializadas y concentradas de albúminas y globulinas setas
 - Patrón BSA 2mg/ml

12.1.1.3. *Procedimiento*

1. Pipetear en tubos las cantidades de solución de NaCl 0,5M, patrón de BSA, muestra problema y reactivo de Biuret que se detallan en la tabla:

	B	P1	P2	P3	P4	P5	M
NaCl 0,5 M	1,5ml	1,45ml	1,375ml	1,25ml	1,125ml	1,ml	1,5ml
PATRÓN BSA 2mg/ml	0µl	50µl	125µl	250µl	375µl	500µl	--
MUESTRA	--	--	--	--	--	--	100µl
R. BIURET	1,5ml	1,5ml	1,5ml	1,5ml	1,5ml	1,5ml	1,5ml

Tabla 7: Cantidades de reactivos y muestra por tubo

2. Mezclar bien por agitación
3. Incubar los tubos durante 10 minutos a 55°C y después incubar otros 5 minutos a 20°C.
4. Medir absorbancias a 540nm, ajustando a cero con el blanco



Figura 12: Resultados del método de Biuret

12.1.2. SDS-PAGE

12.1.2.1. Objetivos

Determinar los diferentes pesos moleculares de las albúminas y globulinas de setas

12.1.2.2. Material y métodos

- Balancín
- Equipo de electroforesis
- Geles preformados
- Pipetas automáticas

- Pipeta Hamilton

- Reactivos
 - Etanol

 - Ácido acético glacial

 - Tampón Tris/Glicina/SDS 10x

 - Sample Buffer

 - Colorante Comassie blue

- Muestras:
 - Muestras dializadas y concentradas de albúminas y globulinas setas

 - Marcador de electroforesis

 - BSA

12.1.2.3. Procedimiento

1. Preparamos la solución de fijado (*fixin solution*): La solución de fijado es una solución de etanol al 40% y ácido acético glacial al 10%. Para preparar 200ml de la solución de fijado mezclamos 80ml de Etanol con 20ml de ácido acético glacial, añadimos agua hasta un volumen de 200ml.

2. Preparación de la cuba de electroforesis: preparamos el running buffer, realizando una dilución 1:10 del Tampón Tris/Glicina/SDS 10x.

3. Abrimos los geles preformados y los colocamos en su soporte, quitamos el peine y llenamos el soporte con running buffer, asegurándonos de que no halla fugas.

4. Una vez comprobado que no hay fugas llenamos el soporte hasta que el running buffer cubra los peines, después llenamos el resto de la cubeta con el running buffer.

5. Preparamos las muestras: Añadimos a 100µl de muestra 33µl de tampón de sample buffer, y calentamos en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos.

6. Llenamos los pocillos: Pipeteamos en el primer pocillo 10 μ l de marcador y en el último 5 μ l de BSA.
7. En cada uno de pocillos restantes pipeteamos 20 μ l de las muestras que queremos estudiar.
8. Comenzamos la electroforesis: Cerramos la cubeta de electroforesis y la conectamos a la corriente y dejamos que corran hasta que el frente llegue al final, unos 35 minutos.
9. Una vez terminado el tiempo colocamos los geles 5 minutos en agua, después 15 minutos en la *fixing solution* y finalmente 8 horas en colorante comassie. Dejando los geles en movimiento continuo en el balancín

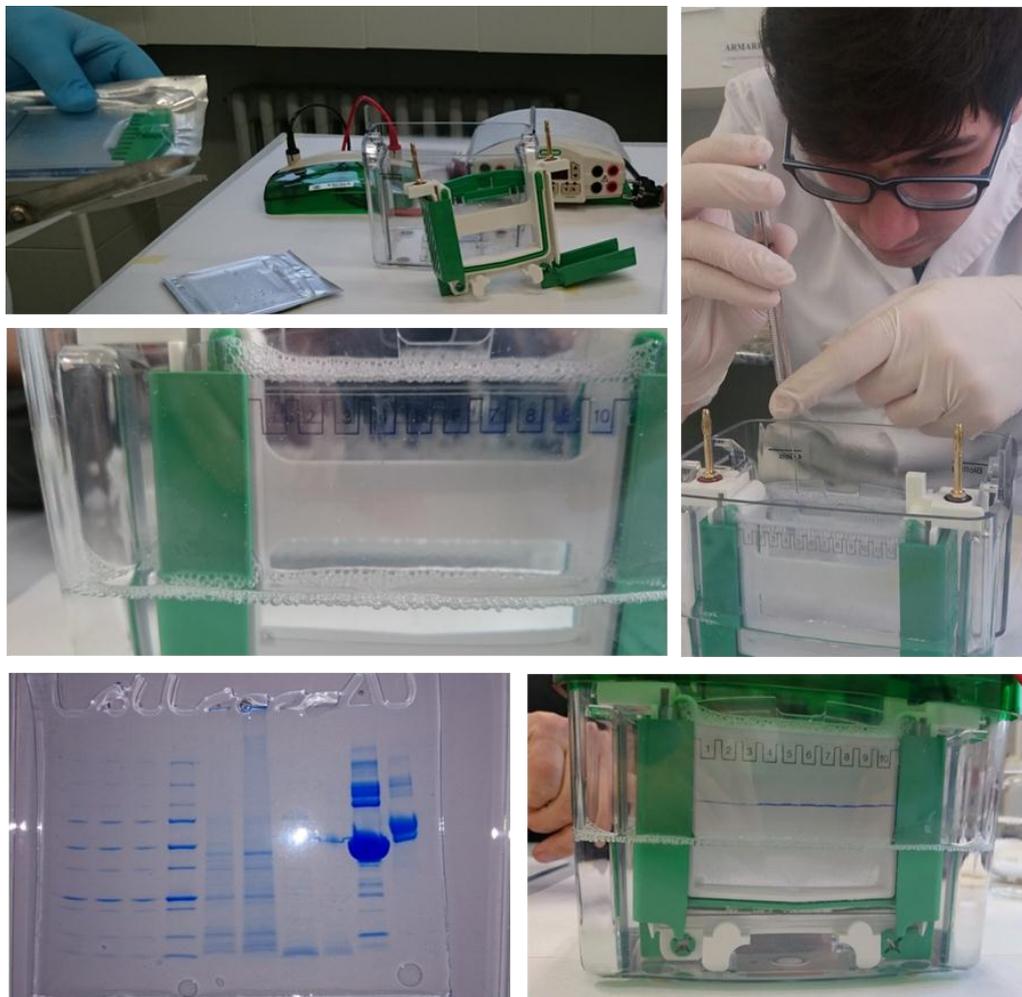


Figura 13: Imágenes del proceso de electroforesis