



---

**Universidad de Valladolid**

**Facultad de Medicina**

**Área de Nutrición y Bromatología**

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE  
LA SALUD: FARMACOLOGÍA, NEUROBIOLOGÍA Y NUTRICIÓN

**ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEÍNIC Y  
EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE  
LA DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNAS  
DE *Agaricus bisporus*.**

TRABAJO FIN DE MASTER

*Ana García Del Río*

Dirigido por: D<sup>a</sup>. María del Pilar Jiménez López y

D. Tomás Girbés Juan

**Valladolid, 2014.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría mostrar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera forman parte de este trabajo.

Especialmente quiero agradecer a los profesores D<sup>a</sup> María Pilar Jiménez y D. Tomás Girbés Juan, directores de este Trabajo Fin de Máster por su dedicación y ayuda a lo largo de todo este tiempo, para llevar a cabo la realización de este trabajo en su Departamento.

Y a todas las personas que no he citado expresamente pero que me han ayudado en el trabajo.

Por todo ello y mucho más les doy las gracias.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
1.1. Características generales de los hongos.....	5
1.2. Características macroscópicas de los hongos.....	7
1.3. Características microscópicas de los hongos.....	11
1.4. Propiedades químicas, nutricionales y medicinales de las setas.....	13
1.5. Descripción y clasificación científica del hongo sometido a estudio.....	15
1.6. Proteínas de la seta.....	18
1.7. Sustancias bioactivas y composición química de <i>Agaricus bisporus</i> .....	20
1.8. Digestibilidad de proteínas in vitro.....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3. MATERIALES</b> .....	24
3.1. Material de laboratorio.....	24
3.1.1. Equipos.....	24
3.1.2. Material fungible.....	25
3.1.3. Reactivos químicos.....	26
3.1.4. Material biológico.....	28
<b>4. MÉTODOS</b> .....	28
4.1. Preparación de disoluciones y filtración.....	29
4.2. Esterilización.....	29
4.3. Preparación de los extractos para electroforesis.....	30
4.4. Método de biuret.....	31
4.5. Preparación de las membranas de diálisis en agua MQ.....	33

4.6. Diálisis de los extractos de hongos.....	34
4.7. Concentración de proteínas utilizando membranas Millipore YM-10.....	36
4.8. Concentración de proteínas con filtros Amicon.....	37
4.9. Concentración de proteínas con Pierce Concentrator 20 ml/9K.....	38
4.10. Electroforesis de proteínas de hongos en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).....	39
4.11. Digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas con pepsina.....	45
4.12. Deseccación de geles de poliacrilamida.....	45
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
5.1. Determinación de proteínas por el método de biuret.....	47
5.2. Determinación del perfil proteínico de <i>Agaricus bisporus</i> .....	47
5.2.1. Perfil proteínico de <i>Agaricus bisporus</i> en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	47
5.2.2. Efecto de la diálisis en el perfil proteínico de <i>Agaricus bisporus</i> .....	50
5.3. Digestión gástrica con un fluido gástrico simulado del extracto acuoso del sombrero de <i>Agaricus bisporus</i> .....	51
5.4. Efecto del tratamiento térmico sobre la digestibilidad de las proteínas del extracto acuoso del sombrero de <i>Agaricus bisporus</i> con fluido gástrico simulado.....	53
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Características generales de los hongos.

Los hongos representan un componente esencial de la biodiversidad, no sólo por el gran número de especies, sino también por su importancia ecológica, evolutiva y socio-económica (Desprez-Loustau et al., 2007). Se consumen como una exquisitez, y en particular por su aroma y textura específica.

Se habla indistintamente de hongos y setas, sin embargo el término hongo implica un individuo completo con autonomía propia, mientras que las setas sólo son una parte del hongo, es decir, el fruto del mismo, que solo producen los hongos más evolucionados. Las setas, son hongos, organismos saprófitos que dependen de los materiales orgánicos que son proporcionados por el “humus” de nutrientes. Las setas se comen casi en su totalidad por sus propiedades culinarias y para proporcionar sabor a otros alimentos en muchas regiones de Europa y Asia (Dabbour y Takruti, 2002a).

En biología, el término Fungi ("hongos") designa un reino que incluye a los organismos celulares sin cloroplastos. Se definen como organismos vivos que se reproducen por esporas y carecen de clorofila, por lo que viven de forma saprofítica, simbiótica o parásita. Pueden ser unicelulares o pluricelulares. Tienen una membrana plasmática donde predomina el ergosterol en vez de colesterol, núcleo, cromosomas (los hongos son, por lo general, haploides), y orgánulos intracelulares. Aunque ningún hongo es estrictamente anaeróbico, algunos pueden crecer en condiciones anaeróbicas (García-Blanco y Sánchez-Rodríguez, 2009).

Se consideran un grupo heterogéneo, formado por organismos pertenecientes por lo menos a tres líneas evolutivas independientes. Son

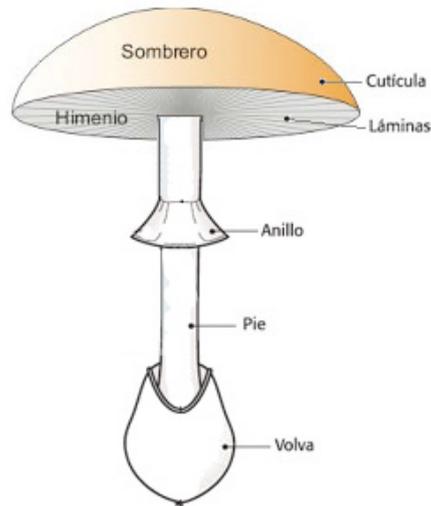
organismos eucarióticos que realizan una digestión externa de los alimentos, secretando enzimas, y que absorben luego las moléculas disueltas resultantes de la digestión. Son los descomponedores primarios de la materia muerta de plantas y de animales en muchos ecosistemas. Dentro del esquema de los cinco reinos de Whittaker y Margulis, los hongos pertenecen en parte al reino Protista (los hongos ameboides y los hongos con zoosporas) y al reino Fungi (el resto). En 1969 Whittaker separó a los organismos fúngicos del reino Plantae. Por otro lado, las setas pueden ser útiles para la formación de micorrizas (simbiosis entre un hongo y las raíces de una planta: algas, líquenes o con otro grupo) y beneficiosas para la descontaminación del suelo. Se piensa que esa simbiosis fue esencial para la conquista del medio terrestre por las plantas (Lelley,1999).

Su pared celular es rígida, con un componente polisacárido (mananos, glucanos y quitina) asociado íntimamente con proteínas.

Se estima que podrían existir aproximadamente 1.5 millones de especies de hongos. Esta variación se debe a que hay variaciones genéticas entre especies, lo que denominamos especies “crípticas”, que son muy similares morfológicamente a otras (Hawksworth,1991; Hawksworth, 2011).

## 1.2. Características macroscópicas de los hongos.

Los hongos constan de las siguientes partes:



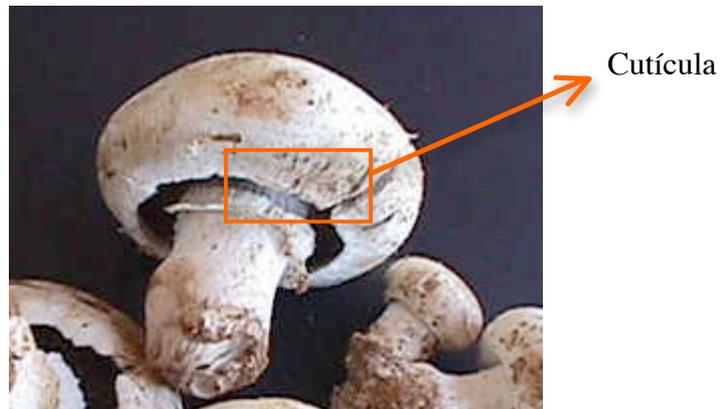
**Fig I1. Partes de un hongo. Imagen extraída de <http://www.turismosanabria.es/micoturismo2.php>.**

El sombrero: es una de las partes fundamentales del hongo, constituye la parte superior. Dependiendo de los diferentes estadios de crecimiento y su himenio podemos distinguir distintos tipos. Su forma y color son muy variadas: cóncavo, convexo, aplanado, embudado, cubierto con escamas, acampanado, redondo, etc. La forma más conocida es la que se parece a un paraguas.



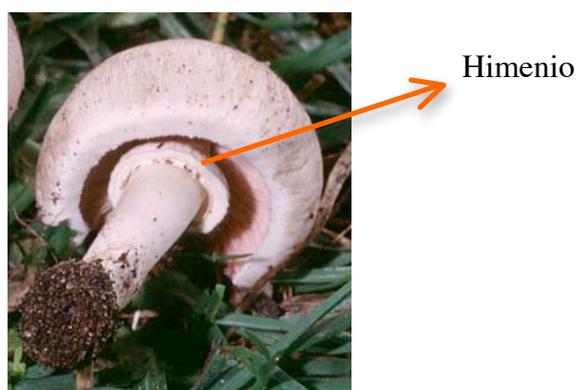
**Fig.I2. Sombrero de *Agaricus bisporus*. Imagen extraída de <http://setas-hongos.blogspot.com.es/2012/10/agaricus-bisporus-champinon-comun.html>.**

La cutícula, es la membrana que cubre el sombrero y puede presentar diversos aspectos: arrugada, cubierta por escamas, brillante, mate, sedosa, viscosa, seca, etc. Y puede presentar alguna ornamentación. Su color es muy variable.



**Figura I3. Detalle cutícula *Agaricus bisporus*. Imagen extraída de <http://elvalledesabero.blogspot.com.es/2013/10/champinones.html>.**

El himenio: Es la parte fértil del hongo, donde se producen las esporas. Es un tejido muy fino. Puede ser liso, con pliegues, láminas o tubos. Recubre la parte inferior del sombrero y está protegido por el velo cuando el hongo es joven.



**Figura I4. Detalle himenio *Agaricus bisporus*. Imagen extraída de [http://www.fourlangwebprogram.com/fourlang/nl/nles\\_Setas\\_y\\_Hongos\\_comestibles.htm](http://www.fourlangwebprogram.com/fourlang/nl/nles_Setas_y_Hongos_comestibles.htm).**

Las láminas o tubos, son unos tabiques verticales que se encuentran en la parte inferior del sombrero. Pueden terminar sin tocar el pie, libres, pueden tocarlo pero con una hendidura o entrante en su inserción, escotadas, pueden alcanzarlo en toda su anchura, adnatas o pueden descender más o menos por el pie, decurrentes, etc.



**Figura I5. Detalle láminas *Agaricus bisporus*. Imagen extraída de <http://www.amanitacesarea.com/agaricus-campestris.html>.**

El pie: es la parte del hongo que sostiene el sombrero. Generalmente tiene forma cilíndrica. Eleva el sombrero para favorecer la dispersión de las esporas y provoca la rotura del velo. Puede ser central, lateral o excéntrico, delgado o grueso, curvado, bulboso, fibroso, cartilaginoso o granuloso. En el pie puede aparecer el anillo, es un estructura que no aparece en todas las setas y que se debe a la rotura total o parcial del velo al crecer la seta.



**Fig. I6. Pie de *Agaricus bisporus*. Imagen extraída de <http://waste.ideal.es/agaricusbisporus.htm>.**

La volva: es un resto membranoso del velo que envuelve la base del pie, protegiendo a la seta al nacer. Al crecer desaparece, bien de forma total o parcialmente.



Volva

**Fig I7. Volva de *Agaricus bisporus*. Imagen extraída de <http://www.amanitacesarea.com/agaricus-bisporus.html>.**

La carne: es la materia que forma toda la seta. Sus caracteres organolépticos son: su textura (carnosa, coriácea o leñosa), su color (blanca, amarilla, azul, varía dependiendo de la oxidación y el clima), su olor ( a ajo, a anís, a fenol, a cloro, etc) y su sabor (amargo, picante, dulce, desagradable, etc).



**Fig18.** Detalle de la carne de *Agaricus bisporus*. Imagen extraída de [http://archivosdemicologia.blogspot.com.es/2012\\_02\\_01\\_archive.html](http://archivosdemicologia.blogspot.com.es/2012_02_01_archive.html).

### **1.3. Características microscópicas de los hongos.**

Para el estudio a nivel celular de los hongos es imprescindible la observación al microscopio de ciertas estructuras, como es el caso de las esporas, las hifas, los cistidios y los pelos, que pueden presentar diversidad de formas y tamaños.

La hifa es la unidad vegetativa en la estructura de los hongos. Su forma es filamentosa y de tipo tubular con paredes celulares. Pueden presentar tabiques (hifas septadas) o no (hifas aseptadas). Al microscopio se puede observar el diámetro del tabique, la presencia o no de fíbulas, su pigmentación, etc. El conjunto de hifas forman el micelio, y sus frutos son las setas.



**Fig. 19. Hifas no septadas de un hongo visto al microscopio. Imagen obtenida de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182001000400007](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182001000400007).**

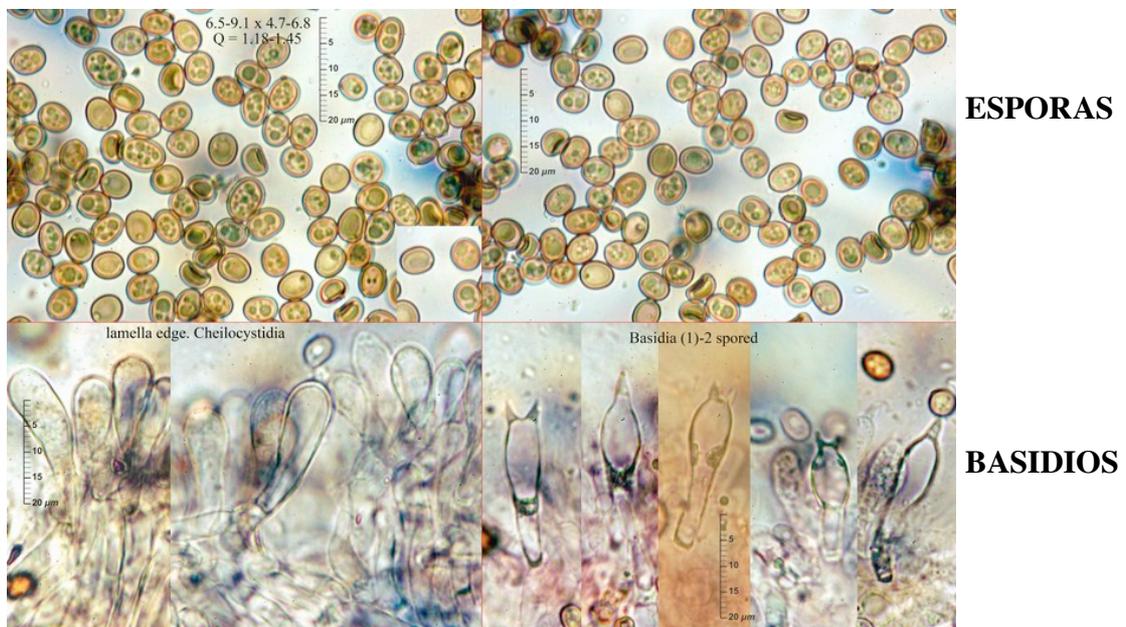
Una espora es una célula reproductora producida por los hongos. Es un elemento importante en los ciclos biológicos. Las esporas se clasifican por su número, forma, tamaño y color, que son los criterios taxonómicos. Hay esporas esféricas, ovales, estrelladas, cilíndricas, etc. Además pueden presentar tabiques, ser lisas o rugosas. Su tamaño varía entre 3 y 20 micras.

Las esporas de los hongos suelen ser pigmentadas y dan colores diversos a los micelios: negros, marrones, amarillos o verdosos. Son resistentes a la desecación. Viven suspendidas en el aire y ayudan a la diseminación de los hongos. Se propagan adheridas al cuerpo de los insectos y otros animales. Tanto las esporas sexuales como asexuales cuando germinan originan un nuevo micelio.

En función del tipo de esporas se definen los cuatro grupos principales de hongos: oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas. Hacemos referencia a las basidiosporas (características del filo Basidiomycota), que forman basidios o estructuras en conjuntos de cuatro unidades, aunque en algunas especies pueden encontrarse dos y seis esporas por basidio.

Las ascas son estructuras reproductoras microscópicas, que dan origen a las esporas en los Ascomycetes.

Los basidios son los órganos donde se desarrollan las esporas de los Basidiomycetes. Las células que rodean a los basidios son estériles y se denominan cistidios, los cuales aparecen en el himenio de los basidiomicetes. Las ascas están formadas por una célula especializada con forma de saco en cuyo interior se forman las esporas. A las esporas producidas por los ascos también se les llama ascosporas.



**Fig.I10.** Esporas y basidios de *Agaricus bisporus*. Imagen extraída de <http://www.asturnatura.com/especie/agaricus-bisporus.html>.

#### **1.4. Propiedades químicas, nutricionales y medicinales de las setas.**

El conocimiento de su composición química es limitado y la información sobre la disponibilidad de sus componentes es escasa.

Las setas contienen una cantidad muy elevada de agua (entre el 82-92%). Los principales componentes son los polisacáridos y las proteínas estructurales, mientras que el contenido en lípidos es bajo. La fosfatidilcolina es el principal fosfolípido presente en algunos hongos

(Kalac, 2009). En cuanto a las proteínas, su porcentaje en peso seco puede variar entre el 10 y el 30%. En cambio contienen poca grasa, por lo que se han incluido en muchas dietas de adelgazamiento por su bajo contenido calórico.

La quitina, el glucógeno, el manitol y la trehalosa son los componentes típicos. El glucógeno es el polisacárido de reserva de las setas. La quitina es un polisacárido estructural insoluble en agua, que no se digiere por lo que resulta indigesta, al igual que la celulosa (Kalac, 2009).

Nos aportan una cantidad apreciable de minerales, los más destacados son el potasio, fósforo, magnesio, yodo, zinc, selenio y calcio. Hay que evitar recolectarlas cerca de las carreteras y fábricas porque tienden a absorber los metales pesados de los residuos y las aguas contaminadas.

Poseen vitamina C, vitamina A, ergosterol, vitamina K, también vitaminas del complejo B, como la riboflavina B2, niacina B3, biotina B8, ácido fólico y ácido pantoténico (Kalac, 2009).

Debido al bajo valor energético, la alta proporción de fibra no digerible, los beta-glucanos específicos, con su actividad biológica para modular el sistema inmunitario y los antioxidantes que tienen, se ha incrementado el interés de los investigadores y de los consumidores en los últimos años.

Destacamos las propiedades medicinales asociadas a los hongos, porque actúan como estimulantes del sistema inmunitario, son anticancerígenos, antibióticos, antivirales, estimulantes del crecimiento de las células nerviosas, inmunodepresivos, y se cree que pueden actuar como

inhibidores de algunas enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, etc. (Chang y Wasser, 2012; Reis y cols., 2011).

### **1.5. Utilidad en medicina, alimentación, biotecnología y agricultura. Su importancia biológica.**

#### *a) Aplicaciones en medicina.*

Los hongos son reconocidos por sus propiedades medicinales y se han utilizado en la medicina tradicional desde hace milenios.

Las setas son beneficiosas como suplementos dietéticos o suplementos nutritivos. Los efectos medicinales atribuidos a las setas incluyen los efectos antiviral, antiparasitario, desintoxicante, inmunomodulador, antitumoral, antioxidante, eliminación de radicales, antiinflamatorio, cardiovasculares, efectos antihiperlipidémicos o antihipertensivos, hepatoprotector y antidiabéticos (Wasser, 2002; (Lindequist y cols., 2005); (Khan y Islam, 2011).

Las ribonucleasas fúngicas que catalizan la hidrólisis de las moléculas de ARN con diferentes grados de especificidad, poseen actividades antitumorales y antivirales, constituyendo un importante grupo de agentes terapéuticos (Erjavec y cols., 2012).

La tirosinasa, una enzima clave de la vía de la biosíntesis de la melanina, se ha implicado en la deficiencia de pigmento, incluyendo los trastornos de vitiligo y albinismo, y en los trastornos de hiperpigmentación, incluyendo el glaucoma y el melanoma maligno (Faria y cols., 2007).

## *b) Aplicaciones en la alimentación.*

El mundo de los hongos ha alcanzado una gran popularidad debido a su valor gastronómico. Numerosas especies de setas que crecen silvestres en Europa central y oriental son consideradas un manjar (Kalac, 2009).

Según los datos de la Organización de la Alimentación y Agricultura (2010), la producción mundial de las setas y trufas en 2008 superó los 3,4 millones de toneladas. En España, según los datos recopilados por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2009), la producción de setas se duplicó en el período entre 1998 a 2008, llegando a 120.000 toneladas (Venturini y cols., 2011).

Las setas se consideran como un alimento saludable debido a que son bajas en calorías, grasas y ácidos grasos esenciales mientras que son ricas en proteínas, vitaminas y minerales. Además tienen propiedades medicinales ya mencionadas, entre otras, su inhibición plaquetaria, la reducción de la concentración del colesterol sanguíneo, su acción cardiosaludable, su actividad antimicrobiana y la reducción de los niveles de glucosa en sangre (Reis y cols., 2012).

## *c) Aplicaciones en la biotecnología y agricultura*

Es destacable la importancia de su uso en la fermentación, en donde las fracciones biodegradables de los productos, desechos y residuos procedentes de la agricultura y la silvicultura o de residuos industriales, se utilizan como sustratos para cultivar setas para la alimentación humana o animal, así como para la producción de enzimas, proteínas y otros compuestos medicinales.

Otra área amplia de investigación consiste en el uso de los hongos o de sus enzimas en la producción de energía renovable.

Los hongos se pueden utilizar para mejorar la digestibilidad de los piensos, como sustratos para el cultivo de hongos para producir cuerpos fructíferos comestibles. Podrían ser útil en la protección de plantas contra los agentes patógenos y plagas, con actividades nematotóxicas e insecticidas (Erjavec y cols., 2012); (Zhao y cols., 2009).

Es importante la producción de enzimas industriales, como las lacasas para la delignificación de la pulpa y el blanqueo (Erjavec y cols., 2012).

En procesos de biorremediación, varias hidrolasas se utilizan en la síntesis orgánica, incluyendo nitrilasas, esterases, amilasas, proteasas, lipasas (Erjavec y cols., 2012).

Las tirosinasas se han utilizado en la producción de antioxidantes para su uso como aditivos alimentarios o medicamentos farmacéuticos. Además tirosinasas de los hongos de *Aspergillus* se utilizan en la producción de L-DOPA a partir de L-tirosina para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson temprana y en enfermedades del miocardio. La tirosinasa de *Agaricus bisporus* se ha utilizado en varios estudios como la parte funcional de biosensores para la detección, por ejemplo, de la dopamina en el diagnóstico y los contaminantes ambientales fenólicos (Halaouli y cols., 2006).

También se usan las enzimas de hongos en la producción de los cosméticos, por ejemplo, las lacasas y peroxidases en el tinte del cabello y preparaciones para aclarar la piel, ya que la lacasa reemplaza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante (Jeon y cols., 2012).

Las glicosidasas se utilizan en la producción de edulcorantes, en la cocción, en la elaboración de la cerveza, la destilación, la elaboración del

vino, en la coagulación de la leche en la industria láctea y en la elaboración del queso (Erjavec y cols., 2012).

Las proteasas también se utilizan como potenciadores del sabor.

Por estos motivos, el interés en investigar en profundidad este reino ha aumentado con el paso de los años y se han llevado a cabo estudios de la capacidad antioxidante de las setas y su valor nutricional (Barros y cols., 2009). En menor medida, se han realizado estudios sobre la disponibilidad de los aminoácidos procedentes de la digestibilidad *in vivo* de los hongos y de la calidad de las proteínas que contienen (Dabbour y Takruri, 2002a); (Dabbour y Takruri, 2002b).

Los hongos ofrecen soluciones a problemas médicos y biotecnológicos, como la resistencia microbiana a los medicamentos, bajos rendimientos de cultivo y demanda de energía renovable.

#### **1.6. Clasificación científica y descripción de *Agaricus bisporus*.**

A continuación se describen las características del hongo que se estudia en este trabajo: *Agaricus bisporus*.

- Nombre común: Champiñón o seta de campo.
- Sinónimo: *Agaricus hortensis*.
- Taxonomía: pertenece al Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Clase Agaricomycetes, Orden Agaricales, Familia Agaricaceae.

Pertenece a la categoría Basidiomycetes.

- Fisiología: Hongo que forma basidiomas, con un sombrero carnoso de 5-10 cm de diámetro, de forma globosa que evoluciona con el tiempo a convexo y aplanado. Tiene una cutícula gruesa,

blanca, lisa y cubierta de escamas de color pardo. Presenta láminas libres, apretadas, de color blanco rosáceo.

El pie tiene de 7 a 14 cm. de alto y de 2 a 4 cm. de grosor. Se caracteriza por ser cilíndrico, liso, blanquecino, la base alargada y en ocasiones con restos del velo en los ejemplares jóvenes, presenta una base un poco gruesa. El anillo es ínfero, frágil, grueso, blanco y estriado en la parte superior. La carne es gruesa, consistente y blanca, que enrojece al corte. El olor que desprende es agradable, fúngico y tiene un sabor agradable y delicado, por ello se considera un excelente comestible.

Los basidiomas son bispóricos, que forman esporas redondeadas y ovadas.

- Hábitat y ecología: Crecen de primavera a otoño en zonas con estiércol (abonadas), y en humus de *Cupressus*.
- Distribución: Cosmopolita, es una especie cultivada en todo el mundo. Es el hongo más cultivado a nivel mundial.
- Culinariamente, son importantes por su comestibilidad. Es el hongo cultivado más importante que existe.

Se puede cultivar artificialmente y de manera industrial.



**Figura 17. Ejemplar de *Agaricus bisporus*. Imagen extraída de <http://www.amanitacesarea.com/agaricus-bisporus.html>.**

### **1.7. Sustancias bioactivas y composición química de *Agaricus bisporus*.**

Las sustancias bioactivas aisladas de hongos se pueden dividir en:

- Metabolitos secundarios (ácidos, terpenoides, polifenoles, sesquiterpenos, alcaloides, lactonas, agentes quelantes de metales, análogos de nucleótidos y vitaminas).
- Glicoproteínas.
- Polisacáridos de alto peso molecular, incluyendo polisacaropéptidos y proteoglicanos.

Los polisacáridos, especialmente los beta-glucanos, uno de los grupos más ampliamente investigados de moléculas bioactivas de setas, poseen propiedades antitumorales e inmunomoduladoras, y se usan en el tratamiento clínico (Guillamón y cols., 2010); (Wasser, 2011).

Los hongos son reconocidos como una fuente prometedora de nuevas proteínas identificadas muy pocas, de las que se han destacado las lectinas, enzimas lignocelulóticas, inhibidores de la proteasa e hidrofobinas (Erjavec y cols., 2012).

Las enzimas implicadas en la degradación de lignocelulosa, es uno de los grupos más investigados de proteínas de hongos superiores, donde cooperan enzimas hidrolíticas y oxidativas, incluyendo lacasas, peroxidasas y otras oxidasas, (hemi)celulosas y diferentes glicosidasas (Erjavec y cols., 2012).

Otras oxidorreductasas conocidas son las tirosinasas, enzimas clave en la síntesis del pigmento melanina, de las cuales la más estudiada es la

producida por el hongo *Agaricus bisporus*, que está implicado en el pardeamiento de post-cosecha (Erjavec y cols., 2012).

Se han aislado numerosas lectinas que demuestran características moleculares y fisiológicas únicas, incluyendo la diversidad en la estructura, la glicosilación y la especificidad de hidratos de carbono (Wong y cols., 2010).

Las proteínas inmunomoduladoras fúngicas (FIPs), tienen interés debido a su potencial terapéutico y médico (Xu y cols., 2011).

Otras proteínas con potencial médico incluyen las ribonucleasas (RNasas). Además, las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) han sido investigadas por sus efectos tóxicos y para el uso en el cáncer y terapias antivirales (Xu y cols., 2011).

Las hidrofobinas son otro grupo importante de proteínas exclusivas de hongos. Son pequeñas proteínas anfipáticas que se autoensamblan en la interfase en una capa monomolecular hidrófila-hidrófoba, invirtiendo la hidrofobicidad de la superficie, lo que les confiere un gran potencial para diversas aplicaciones biotecnológicas y médicas (Cox y Hooley., 2009; Hektor y Scholtmeijer , 2005).

### **1.8. Digestibilidad de proteínas in vitro.**

Los hongos segregan enzimas para digerir los alimentos que tienen alrededor para obtener nutrientes de la materia orgánica, lo que llamamos compost. El valor nutricional de las setas, depende en gran medida de la composición química del compost, que es una mezcla de paja, agua, suplemento de nitrógeno y mazorcas de maíz (Goyal y cols., 2006).

Hay variaciones en el contenido de proteínas en las setas debido a la variedad, etapa de desarrollo, el nivel de nitrógeno disponible y la parte muestreada de la seta (Goyal y cols., 2006).

El contenido de proteínas en setas es tan alto como el de la mayoría de las verduras. Son buena fuente de fibra y proteína, baja en grasa y tienen una alta digestibilidad proteica in vitro. Las setas son reconocidas por sus bajos niveles de grasa.

Hemos hecho una búsqueda en la literatura sobre la digestibilidad de proteínas in vitro de *Agaricus bisporus*, y únicamente hemos encontrado un artículo; por ello este campo podemos considerarlo muy significativo para futuros estudios.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es analizar el perfil proteínico de *Agaricus bisporus*, la digestibilidad y el efecto de la temperatura sobre dicha digestibilidad.

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer el perfil proteínico de *Agaricus bisporus* por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS).
2. Efecto de la diálisis en el perfil proteínico.
3. Determinación in vitro de la sensibilidad de las proteínas en la digestión con fluido gástrico simulado.
4. Efecto del tratamiento térmico sobre la digestibilidad de las proteínas.

### **3. MATERIALES**

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

#### **3.1. Material de laboratorio.**

##### **3.1.1 Equipos.**

Agitador de tubos: Raypa.

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

Balancín: Labnet.

Balanza de precisión: KERN ABS.

Balanza: KERN 572.

Baño de agua: Velp Scientifica (multistirrer 6).

Célula con agitación (concentrador): Amicon.

Centrífuga: Gigiten-R ORTO ALRESA.

Amicon ultra 0,5 centrifugal filter, 10 kDa. Sigma-Aldrich.

Concentrador de 50 y 10 ml: Amicon.

Congelador -24°C: Fagor.

Cubetas electroforéticas mini-VE Amersham Biosciences.

Equipo de agua Hellix. Millipore.

Escáner CanonScan Lide 200 acoplado a un ordenador MacBook Pro.

Espectrofotómetro: HELIOS  $\alpha$ Thermo.

Estufa: P.SELECTA 150 litros.

Microcentrífuga Labnet.

pHmetro: pH-meter basic 20 + CRISON.

Pipetas automáticas: Proline Plus de Biohit.

Triturador MICCRA.

### **3.1.2. Material fungible.**

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

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

Espátulas.

Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes.

Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.

Guantes de látex.

Imanes agitadores.

Jeringa Hamilton.

Membrana de filtración MF Millipore 0,45  $\mu$ m.

Microtubos de plástico de 1,5 y 2 ml.

Papel de filtro convencional (Afora).

Parafilm M.

Pierce Concentrator 20 ml/ 9K (Thermo Scientific)

Pinzas y tijeras de acero inoxidable.

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

Placas Petri redondas y cuadradas.

Probetas de vidrio y de plástico de diferentes volúmenes.

Puntas de pipeta automática.

Tubos Falcon de 15 y 50 ml.

Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.

### **3.1.3. Reactivos químicos.**

Todos los reactivos empleados en la realización de este trabajo quedan incluidos en la siguiente tabla, siendo todos ellos de una alta pureza (Tabla 1).

**Tabla 1. Reactivos utilizados.**

<b>Reactivos</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Acetona</b>	Panreac
<b>Ácido acético</b>	Baker
<b>Ácido clorhídrico</b>	Panreac
<b>Acrilamida/bisacrilamida</b>	Amresco
<b>Albúmina sérica bovina</b>	Roche
<b>Azida sódica</b>	Sigma-Aldrich
<b>Azul de bromofenol</b>	Sigma-Aldrich
<b>Azul Coomassie R-250</b>	Panreac

---

<b>Butanol-1</b>	Merck
<b>Carbonato de sodio</b>	Panreac
<b>Cloruro sódico</b>	Panreac
<b>Dodecil sulfato sódico</b>	Sigma-Aldrich
<b>EDTA</b>	Panreac
<b>Etanol 96 %</b>	Merck/Bayer
<b>Glicerol</b>	Thermo
<b>Glicina para electroforesis</b>	Sigma
<b>Hidróxido de sodio</b>	Panreac
<b>Metanol</b>	Panreac
<b>Pepsina</b>	Sigma-Aldrich
<b>Persulfato amónico</b>	Sigma-Aldrich
<b>Reactivo de biuret</b>	Panreac
<b>Sulfato de cobre (II)</b>	Merck
<b>TEMED</b>	Sigma-Aldrich
<b>Tris</b>	Sigma-Aldrich Roche

---

Todas las soluciones se preparan con agua tipo Milli Q (Millipore), y se esterilizan, cuando es necesario a 120 °C y a 1 atmósfera de presión durante 40 minutos.

### 3.1.4. Materiales biológicos.

Los hongos empleados para la obtención de los extractos para la realización de este trabajo fueron recogidos e identificados por D. Santiago de Castro Alfageme, inspector veterinario de la Junta de Castilla y León. Todas las muestras se almacenaron a -24°C y descongeladas justo antes de su uso.

- *Agaricus bisporus*, recogido en mayo de 2013.



**FigMa1. Muestra de *Agaricus bisporus*.**

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Preparación de disoluciones y filtración.**

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

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

### **4.2. Esterilización.**

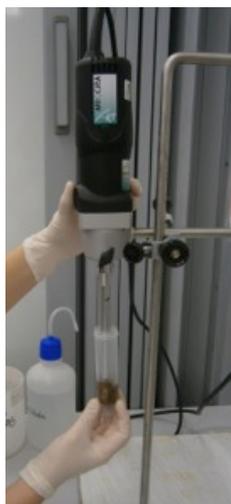
La esterilización se realiza en un autoclave a una temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$  y a 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

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

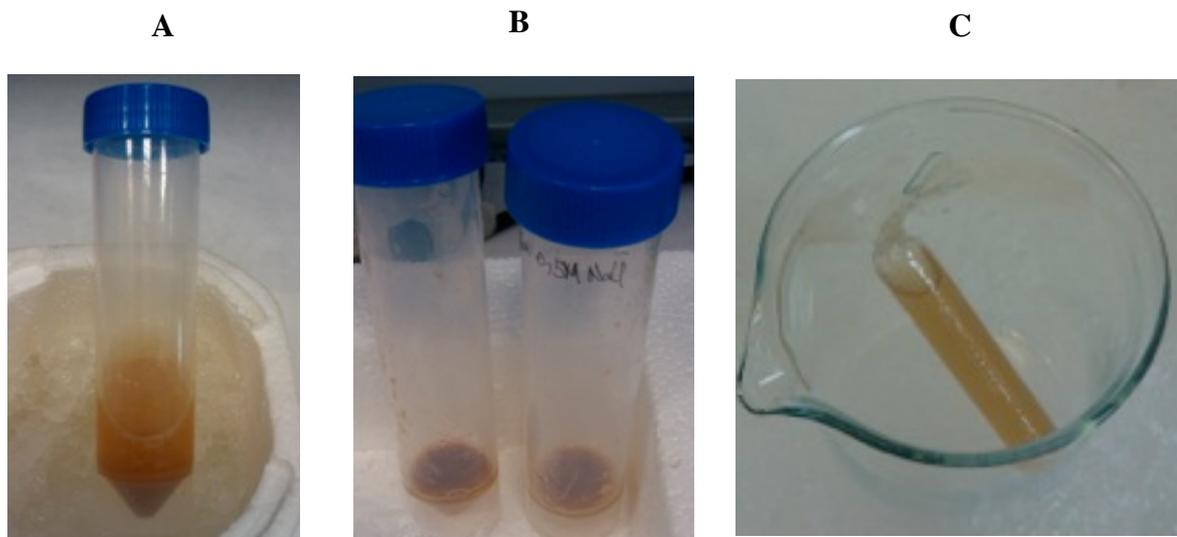
El resto del material de laboratorio (puntas de micropipetas, microtubos, tubos cónicos, filtros, jeringas, etc.) se adquirió de forma estéril o se esterilizó utilizando el autoclave, como se ha indicado.

#### **4.3. Preparación de los extractos de hongos para electroforesis.**

Para la obtención de los extractos proteicos de *Agaricus bisporus* se pesan 5 g de muestra y se añaden 10 ml. de tampón de extracción (Tris 0,1M, EDTA 10 mM, pH 7,4). Posteriormente se trocean con la ayuda de las pinzas y las tijeras, y se trituran con un disgregador MICCRA D-9 /RT. La pasta resultante se centrifuga en tubos Falcon a 3.500 r.p.m durante 15 minutos. Recogemos el sobrenadante y realizamos una segunda centrifugación durante 4 minutos a 10.000 r.p.m. Alicuotamos las muestras obtenidas y las guardamos a -20°C hasta su uso.



**Fig Me1. Preparación de extractos y trituración con disgregador MICCRA D-9/RT.**



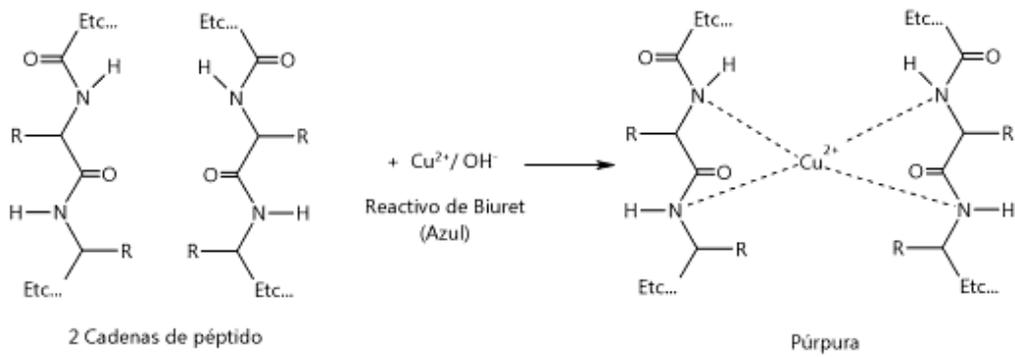
**Fig Me2.** Extracto centrifugado (A). Pellet del extracto centrifugado (B). Extracto en membrana de diálisis preparado para dializar (C).

#### 4.4. Método de biuret.

Este ensayo mide las proteínas totales en una solución. Se fundamenta en una reacción coloreada producida por la formación de un complejo, de color púrpura, entre el reactivo de biuret y una solución alcalina de sulfato de cobre. Se forma un complejo de coordinación entre los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y los pares de electrones no compartidos de nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos presentando un máximo de absorción a 540 nm.

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

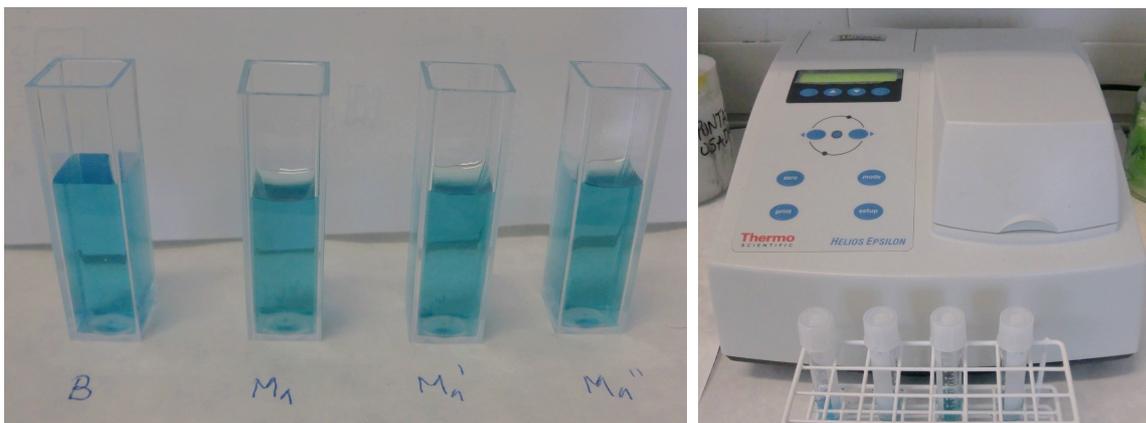
Da positiva la reacción en todos los compuestos que tengan dos o más enlaces peptídicos consecutivos en sus moléculas.



**Fig Me3. Reacción del método de Biuret.**

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

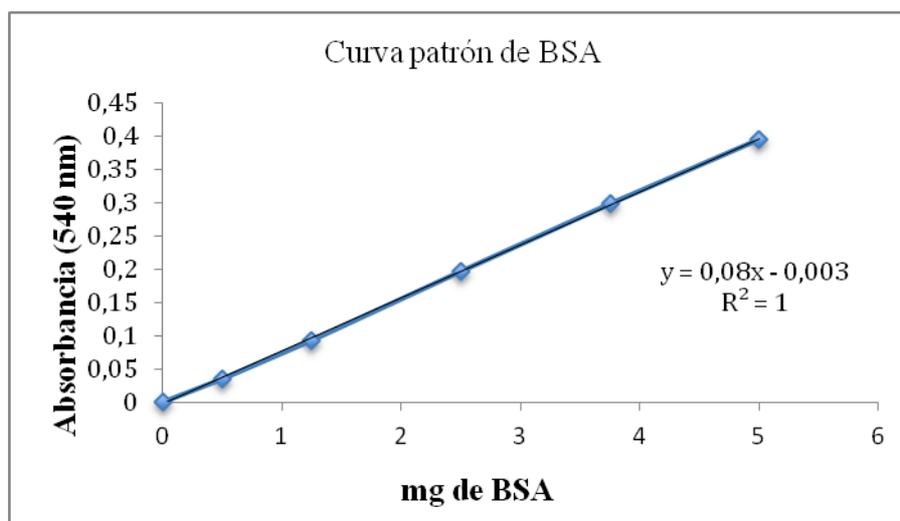
En primer lugar, se añadió la cantidad adecuada de la solución de cloruro sódico 0,9 % para obtener un volumen final de 3 ml. a cada uno de los tubos Falcon. Posteriormente se incorporó el BSA a la muestra de seta correspondiente y finalmente 1,5 ml. de reactivo de biuret. Se incubó durante 10 minutos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



**Fig Me4. Muestras preparadas para medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.**

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

Se realiza la representación gráfica para determinar si la respuesta del patrón es lineal y para poder expresar los valores obtenidos con las muestras en mg de proteína equivalente de BSA por gramo de *Agaricus bisporus*.



**Fig Me5. Curva patrón de BSA del método de Biuret.**

Los resultados se interpolan a partir de la representación gráfica.

#### **4.5. Preparación de las membranas de diálisis en agua MQ.**

Se cortaron en trozos las membranas de diálisis con una longitud de aproximadamente 50 cm. y un diámetro de 14,3 mm. Se escogió este diámetro teniendo en cuenta el volumen de extracto que se quería dializar. Se hirvieron las membranas de diálisis durante 10 minutos en 500 ml. de una solución de bicarbonato de sodio al 2 % y EDTA 1 mM, agitándolas de forma continua.

A continuación, se lavan y enjuagan las tripas con agua Elix y por último se hierven las membranas nuevamente en bicarbonato de sodio al 2% y EDTA 1 mM, en esta ocasión en un litro de esta solución y durante

15 minutos y removiéndolas continuamente. Esta operación se realizó dos veces. Posteriormente, se lavan y se enjuagan las membranas de diálisis (aproximadamente tres veces) con agua Elix. Después se hierven 10 minutos en agua Elix. Se repitió este último paso, y para finalizar, se almacena las tripas de diálisis en 1 litro de agua Elix y azida sódica 0,1 g y se guardan a 4 °C, hasta su uso.

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



**Figura Me6. Preparación de las membranas de diálisis.**

#### **4.6. Diálisis de los extractos de hongos.**

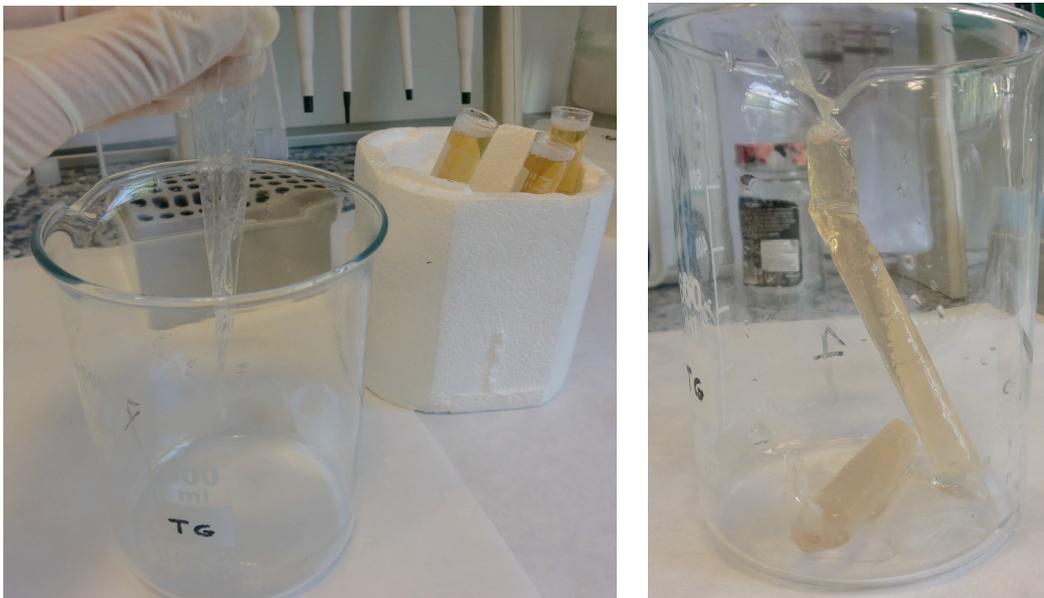
Se dispone de las membranas de diálisis preparadas en tiras de 50 cm. en agua Elix con azida sódica y se cortan en función del volumen de extracto a dializar.

La diálisis se realiza en agua MQ (membranas de diálisis 14.000 Daltons). Antes de utilizar las membranas, se lavó el interior y el exterior de las membranas con agua Elix. Una vez estuvieron completamente

lavadas, se incorporó a las membranas los extractos de setas para, finalmente, anudarlas dejando una pequeña cámara de aire e introducir las en dos litros de agua Elix con agitación constante y una temperatura de 4°C, en 4 litros de agua MQ durante 24 horas.

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

Una vez dializadas, se sacaron las membranas de diálisis y se secaron cuidadosamente con papel absorbente. Para extraer el contenido, se cortaron las bolsas por uno de los extremos y se fueron vaciando con una pipeta automática. Los extractos dializados fueron alicuotados y guardados a -24°C hasta su uso. Posteriormente se concentra el extracto proteico con la celda de filtración Amicon empleando una membrana YM-10 (en el apartado siguiente).

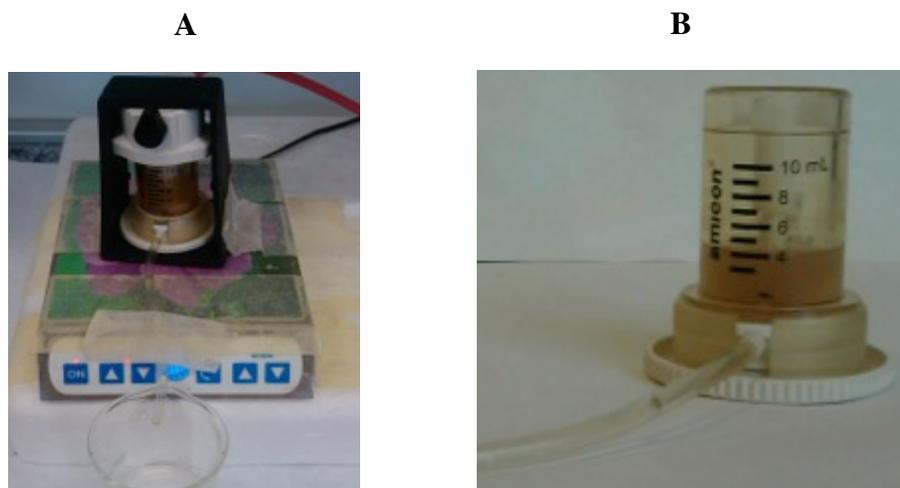


**Figura Me7. Extractos de hongos en tripas de diálisis.**

#### 4.7. Concentración de proteínas utilizando membranas Millipore YM-10.

Los extractos dializados se concentraron en una célula de agitación de Amicon utilizando membranas Millipore YM-10. El sistema consiste en la aplicación de  $N_2$  que ejerce presión sobre la muestra a concentrar. Esta presión fuerza el paso de aquellos solutos que presentan un tamaño inferior al del poro de la membrana (10 HDa), mientras que los solutos mayores quedan retenidos en el interior de la célula. Estas células presentan una agitación que impide que se deposite material particulado sobre la membrana taponando los poros e impidiendo la salida de los solutos más pequeños.

Se añade primeramente agua Elix y se pone en funcionamiento una agitación suave-moderada, luego se abre la presión del gas hasta que alcance  $2,5 \text{ kg/cm}^2$ . Comprobando que no hay ningún problema y que la célula funciona correctamente, se repite el proceso, pero esta vez colocando el extracto a concentrar. Por lo general, la concentración deseada de nuestras proteínas está entre 2 y 3 mg/ml. Finalmente, se guardan las proteínas concentradas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .



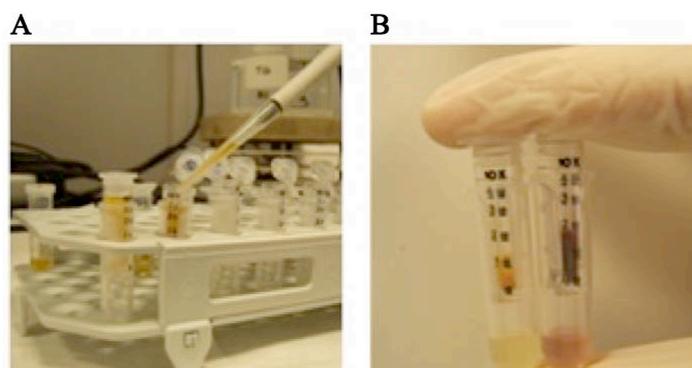
**Fig Me8.** Agitación en la célula Amicon (A). Célula de Agitación Amicon (B).

#### 4.8. Concentración de proteínas con filtros Amicon.

Se emplean los filtros Amicon ultra 0,5, 10 kDa para la concentración de proteínas. Se inserta el filtro Amicon Ultra-0,5 en los tubos de la microcentrifuga. Posteriormente se añaden 500  $\mu$ l de muestra en el Amicon Ultra y se tapa. Se coloca el dispositivo de filtro tapado en el rotor de la centrifuga, la alineación de la correa de la tapa debe de estar hacia el centro del rotor, y enfrentado con otros dispositivos para equilibrarlo.

Luego se centrifuga el dispositivo a 14.000 g durante aproximadamente 3 minutos. Se quita el dispositivo ensamblado de la centrífuga y se separa el dispositivo de filtro Amicon del tubo de microcentrifuga.

Finalmente para recuperar el soluto concentrado, colocamos el dispositivo de filtro Ultra Amicon boca abajo en tubos limpios en el rotor de la centrífuga, enfrentando cada tubo con un dispositivo similar para equilibrarlo. A continuación se centrifuga durante 2 minutos a 1.000 g para transferir la muestra concentrada desde el dispositivo al tubo.



**Figura Me8.** Extractos en **tubos de filtración** de amicon de 0,5 ml (A), detalle de los **extractos concentrados** (B).



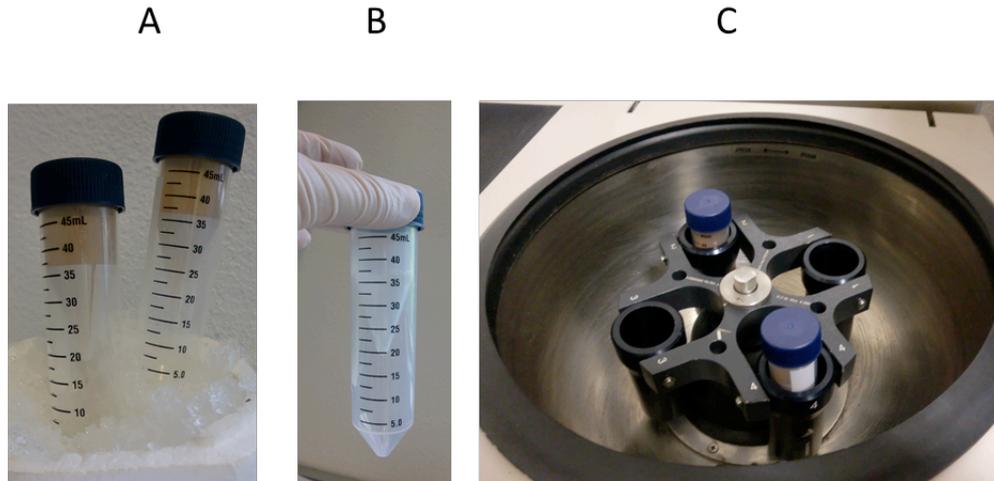
**Fig Me9. Centrifugación de muestras.**

#### **4.9. Concentración de proteínas con Pierce Concentrator 20 ml/ 9K.**

Se emplean tubos Falcon con filtros para la concentración de proteínas. Se coloca la muestra en la parte superior del concentrador. Posteriormente se tapa y se coloca el tubo con el concentrador en el rotor de la centrífuga con el contrapeso adecuado.

Después se centrifuga a 2.500 r.p.m durante 15 minutos hasta que alcance la concentración deseada.

Finalmente se coge la muestra concentrada en la cámara superior del tubo Falcon con una pipeta de 200  $\mu$ l.



**Fig. Me10. A) Tubo concentrador. B) Tubos concentradores con la muestra preparada para centrifugación. C) Centrifugación de las muestras para su concentración.**

#### **4.10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).**

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. Las moléculas se separan en función de su carga eléctrica.

Se define la movilidad electroforética como la velocidad de desplazamiento por unidad de campo eléctrico.

En unas condiciones determinadas de electroforesis, diferentes moléculas tendrán diferentes movilidades electroforéticas en un medio determinado. Uno de los métodos más comúnmente empleado de electroforesis de proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS). Esta técnica es conocida como SDS-PAGE (Polyacrilamide gel electrophoresis) de Laemmli (1970), la cual ha sido empleada en este trabajo. Se lleva a

cabo la separación de proteínas en función de su tamaño. En nuestro caso se utilizó un sistema de Amersham Biosciences.

Para la realización de la electroforesis se necesita una fuente de alimentación donde se establece una diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo; una cubeta, en cuyos extremos se sitúan los electrodos; el gel de electroforesis y el tampón tanto de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1 % (p/v)) como el de la muestra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2 % (p/v)), glicerol 10 % (v/v) y 0,025 % (p/v) de azul de bromofenol en una proporción 3:1). El azul de bromofenol sirve como medio de contraste para el seguimiento (tracking dye). La electroforesis se lleva a cabo a temperatura ambiente (Mattinen y cols., 2008).

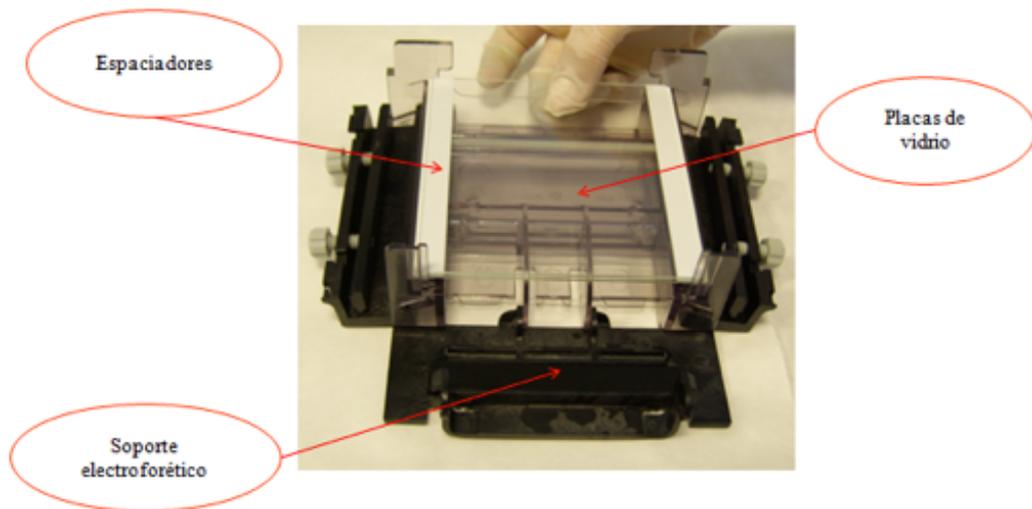
Los geles de electroforesis se componen de:

- Acrilamida / bisacrilamida. Permite formar una matriz tridimensional, dando lugar al gel de poliacrilamida. Si se varía la concentración de acrilamida y bisacrilamida en la preparación del gel se consiguen distintos grados de porosidad y, por tanto, distintos intervalos de separación de proteínas.
- Tampón: comúnmente se añade Tris-HCl.
- Persulfato amónico. Agente iniciador de la polimerización.
- TEMED (N, N, N, N'- tetrametil – etileno - diamina). Actúa como agente catalizador.
- SDS 10%. Detergente aniónico.

Todo la preparación del experimento se realiza en hielo.

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

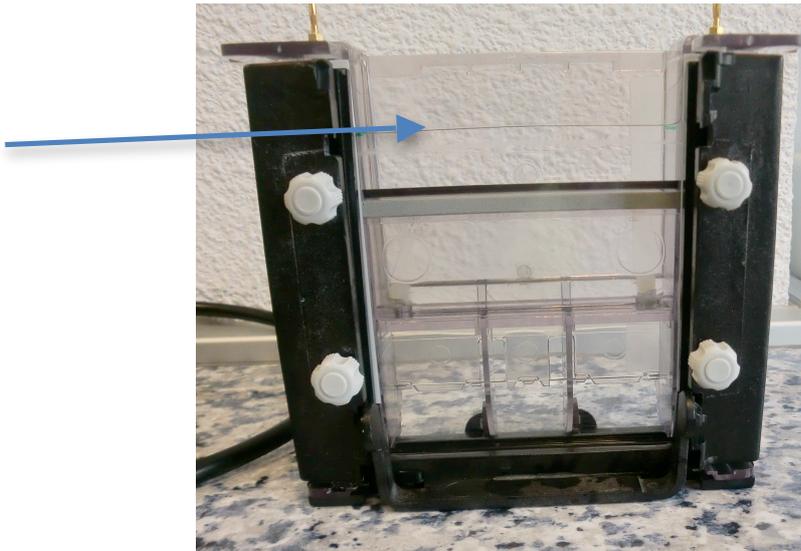
Una vez hemos limpiado el material para la realización de la electroforesis, se montan los cristales con los separadores en el soporte y se prepara el gel, que está formado por dos fases con distinta concentración de poliacrilamida. Es una electroforesis discontinua porque hay dos fases. Una primera fase inferior denominada gel separador 15% (p/v) de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), Tris-HCl 375mM (pH 8,8), SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,1 % (p/v) y TEMED 0,07 % (v/v). La segunda fase superior se denomina gel compactador o gel de *stacking* 4% (p/v) de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,08% (p/v) y TEMED 0,08% (v/v).



**Figura Me11 . Soporte electroforético, espaciadores y placas de vidrio.**

En primer lugar se rellena con una pipeta automática el espacio entre los dos cristales con el gel separador, dejando una distancia de 3 cm del

borde superior del cristal. Se añaden 200  $\mu\text{l}$  de butanol para que el frente quede recto y no aparezcan burbujas. Se deja transcurrir un tiempo para que gelifique el gel. Una vez gelificado, posteriormente se retira el butanol y se elimina cualquier resto que pudiera quedar, realizando varios lavados con agua MilliQ entre los dos cristales.



**Fig Me12. Gelificación del gel separador (flecha).**

En segundo lugar, se añade sobre el gel separador la mezcla del gel compactador entre los dos cristales, y a continuación se coloca el peine en la parte superior antes de que polimerice el gel compactador, cuyo tamaño varía en función del número de muestras que queremos analizar. Una vez polimerizado el gel compactador, se retira el peine y se procede a lavar los pocillos con agua MilliQ para eliminar cualquier resto de poliacrilamida que pudiera haber quedado.

Se han formado los pocillos para posteriormente aplicar las muestras.

Las muestras preparadas que se quieren analizar en la electroforesis se colocan a ebullición durante 2 minutos.

Después se llenan las cámaras superior e inferior de la cubeta con el tampón de electroforesis de modo que entre en contacto con ambos

extremos del gel. Se aplican las muestras y los patrones en los pocillos del gel, usando una jeringuilla Hamilton de 50  $\mu$ l, anotando el orden de aplicación de las muestras.

Se deposita un volumen de 15 $\mu$ l de las muestras en los pocillos, se conectan los cables de la cubeta a la fuente de alimentación, comprobando la polaridad rojo (+), negro (-). La electroforesis se lleva a cabo con una intensidad de corriente de 25 mA y con una diferencia de potencial entre electrodos de 120 V. Cuando el frente, visible por el azul de bromofenol, se acerca al extremo inferior del gel, se desconecta la corriente y se saca el soporte electroforético (tarda aproximadamente tres horas).

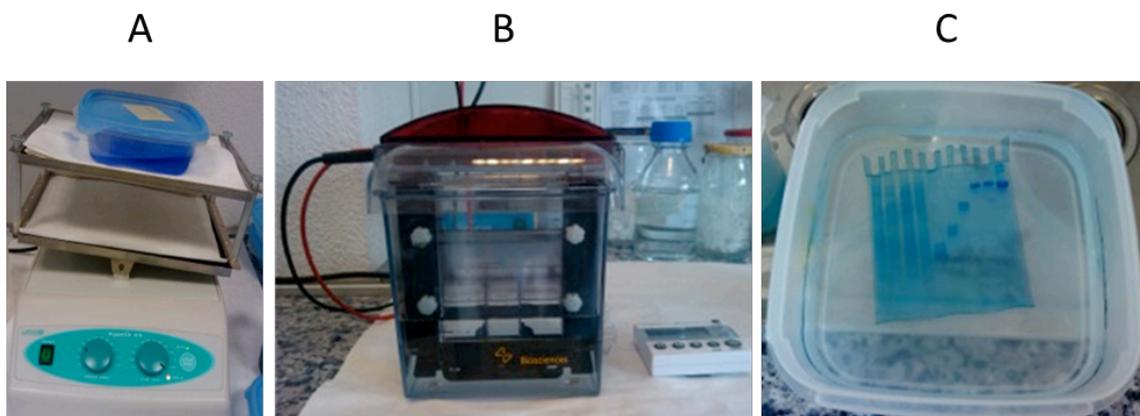


**Figura Me11. Detalle de cubeta electroforética al inicio de conectar los cables de la cubeta a la fuente de alimentación.**

Finalmente se saca el gel separando las placas de vidrio con mucho cuidado de no invertir su orientación y con la ayuda de un papel de acetato. Se tiñe el gel de electroforesis con movimientos basculantes a temperatura

ambiente durante toda la noche, mediante su inclusión en solución de tñido que contiene azul de Coomasie, ácido acético y metanol.

Luego se pasa el gel a solución de desteñido que contiene 7% ácido acético, 5% metanol y agua, desteñendo el gel acompañado de movimientos basculantes en un agitador. En esta solución se deben realizar cambios periódicos hasta que se haya producido una decoloración del gel que nos permita visualizar perfectamente las distintas bandas de las proteínas teñidas.



**Figura Me12.** Geles de electroforesis en agitación con **solución de tñido** (A) Detalle del avance de electroforesis en el **gel** (B). Gel de electroforesis con **solución de desteñido** (C).

Se escanean los geles en un escáner CanonScan Lide 200 acoplado a un ordenador, para digitalizarlos.

Para calcular el peso molecular de cada banda de proteína, empleamos como marcadores de referencia: SELfd 3,7 mg/ml (68.000 Daltons), ebulina f 1,77 mg/ml (56.000 Daltons), anhidrasa carbónica 0,8 mg/ml (29.000 Daltons), lactoalbúmina 5 mg/ml (14.200 Daltons), inhibidor de tripsina 5 mg/ml (20.000 Daltons).

Se realiza una representación del logaritmo de la masa molecular frente a la distancia migrada, y obedece a una línea recta para gran número

de proteínas, calculando de este modo el peso molecular de cada proteína obtenida en la electroforesis.

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

La digestión enzimática de las proteínas de las setas se lleva a cabo con pepsina. Este trabajo experimental se realiza de acuerdo al protocolo descrito por Koppelman y cols. (2010) con algunas modificaciones.

Las condiciones experimentales simulan la temperatura corporal típica (37 °C) y bajo pH en la digestión *in vitro*.

Este proceso se detuvo en puntos de tiempo específicos para controlar el grado de digestión con pepsina: 0, 5, 15, 30 y 60 minutos.

Primero se incuban las muestras a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30 y 60 minutos) a una temperatura de 37 ° C en una solución de pepsina 20 mg/ml en fluido gástrico simulado (SGF), compuesto por HCl 0,063N y NaCl 30 mM a un pH 1,2.

La digestión se detuvo en el momento apropiado con la mezcla Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM y 2 µl de agua, agitando de forma inmediata.

Como control positivo de la degradación de las proteínas se incubó BSA al 1 % durante 5 y 15 minutos.

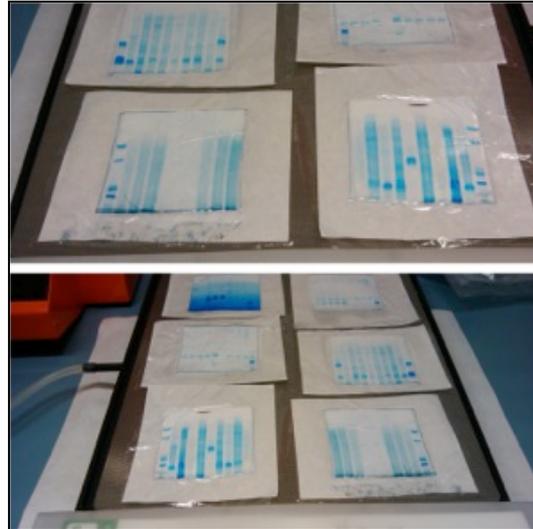
Tras la digestión, se cogen 18 µl de cada muestra y se mezclan con 6 µl de tampón de electroforesis. Posteriormente se hierven las muestras durante 2 minutos y se cogen 15 µl de estas muestras para analizarlas mediante la electroforesis SDS-PAGE, y así poder identificar los productos de la digestión.

#### **4.12. Deseccación de geles de poliacrilamida.**

Se coloca el gel en una hoja de papel de filtro y luego se coloca el gel en el dispositivo de desecación, evitando que quede aire atrapado

debajo del gel. Posteriormente se cubre el gel con la hoja de polietileno poroso, con el lado liso hacia el gel. Se comprueba que los bordes de todas las hojas del papel de filtro están dentro de la cavidad de la platina.

Finalmente se cubre con una lámina de sellado de caucho de silicona transparente. Se utiliza una temperatura de 50 °C para geles de agarosa



**Fig M15. Desección térmica de geles con vacío en el dispositivo de desecación.**

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Determinación de proteínas por el método del biuret**

En este trabajo se ha determinado el contenido de proteínas de las muestras de setas por el método de biuret, como se ha descrito en el apartado 4.4.

Primeramente se efectúa la curva de calibrado con una disolución de BSA 10 mg/ml y después se realiza el ensayo con las muestras de *Agaricus bisporus*.

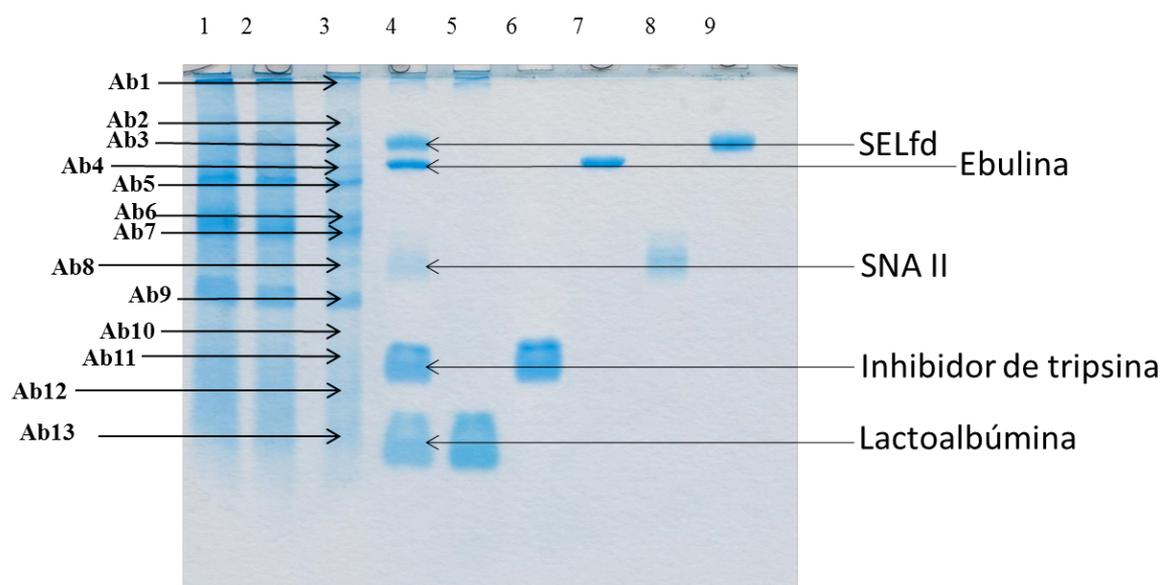
El contenido de proteínas de la muestra de *Agaricus bisporus* en el sombrero presenta un contenido proteínico de 1,84 mg /ml de extracto de *Agaricus bisporus*. Como se preparan 10 ml de extracto, se puede estimar una cantidad de proteína de 1,84 mg totales. Este volumen es el recuperado de la mezcla inicial de 5 g de seta más 10 ml de tampón de extracción.

### **5.2. Determinación del perfil proteínico de *Agaricus bisporus*.**

Para determinar el perfil proteínico se realizan electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS, como se explica en el apartado 4.10. Y a partir de las masas moleculares relativas de los marcadores utilizados en la electroforesis, se calcula la masa molecular de las proteínas más destacables.

#### **5.2.1. Perfil proteínico de *Agaricus bisporus* en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.**

Las proteínas fueron numeradas del 1 al 13. Se distinguen algunas proteínas muy marcadas como Ab5, Ab7 y especialmente Ab9.



**Fig R1. Perfil proteínico** del sombrero de *Agaricus bisporus*. Identificando los marcadores utilizados y las proteínas de la seta.

Hemos encontrado 13 proteínas en el perfil proteínico de *Agaricus bisporus*.

La intensidad de la banda varía dependiendo de los  $\mu\text{l}$  que se han puesto en los pocillos 1, 2 y 3: 20  $\mu\text{l}$ , 15  $\mu\text{l}$  y 10  $\mu\text{l}$ , respectivamente.

Este extracto se preparó concentrado 2 veces y dializado. Como hemos descrito anteriormente la preparación de la muestra es de 72  $\mu\text{l}$  de extracto y 24  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra.

La concentración de proteínas en el extracto calculado por el método del biuret es de 1,84 mg/ ml de *Agaricus bisporus*. Por tanto, la cantidad colocada en cada pocillo fue la siguiente: en el pocillo 1 con 27,6  $\mu\text{g}$  de proteína. En el pocillo 2 con 20,7  $\mu\text{g}$  de proteína. Y en el pocillo 3 con 13,8  $\mu\text{g}$  de proteína.

Se utilizaron marcadores de distinto peso molecular que sirven de patrones:

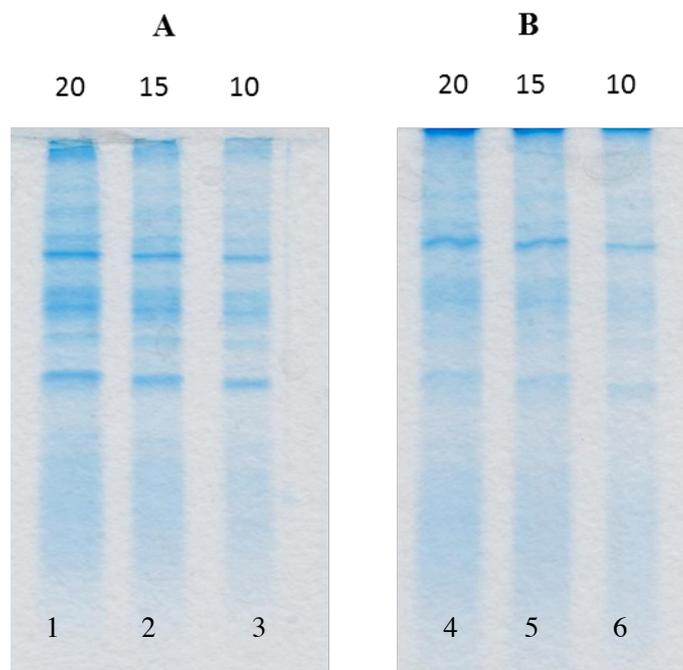
<b>Marcadores</b>	<b>Masa molecular</b>
<b>Selfd</b>	68.000 Da
<b>Ebulina</b>	56.000 Da
<b>SNA II</b>	30.000 Da
<b>Inhibidor de tripsina</b>	20.000 Da
<b>Lactoalbúmina</b>	14.000 Da

<b>Proteínas de <i>Agaricus bisporus</i></b>	<b>Masa molecular</b>
Ab1	90.000 Da
Ab2	78.000 Da
Ab3	66.000 Da
Ab4	60.000 Da
Ab5	56.000 Da
Ab6	47.000 Da
Ab7	44.000 Da
Ab8	38.000 Da
Ab9	34.000 Da
Ab10	31.000 Da
Ab11	22.000-23.000 Da
Ab12	19.000 Da
Ab13	15.000 Da

**Tabla R1. Masas moleculares de las bandas identificadas.**

### 5.2.2. Efecto de la diálisis en el perfil proteínico de *Agaricus bisporus*.

En la figura R2 podemos distinguir la diferencia entre un extracto dializado concentrado 2 veces mediante ultrafiltración, y un extracto dializado no concentrado.



**Fig R2. Efecto de la diálisis en el perfil proteínico de *Agaricus bisporus*.** A) Extracto dializado concentrado. B) Extracto dializado no concentrado. Las cantidades señaladas en la parte superior de la figura indican  $\mu\text{l}$  de muestra (con una concentración de proteína de 3,1 mg/ml de *Agaricus bisporus* en la figura A y 2,85 mg/ml de *Agaricus bisporus* en la figura B) en el pocillo.

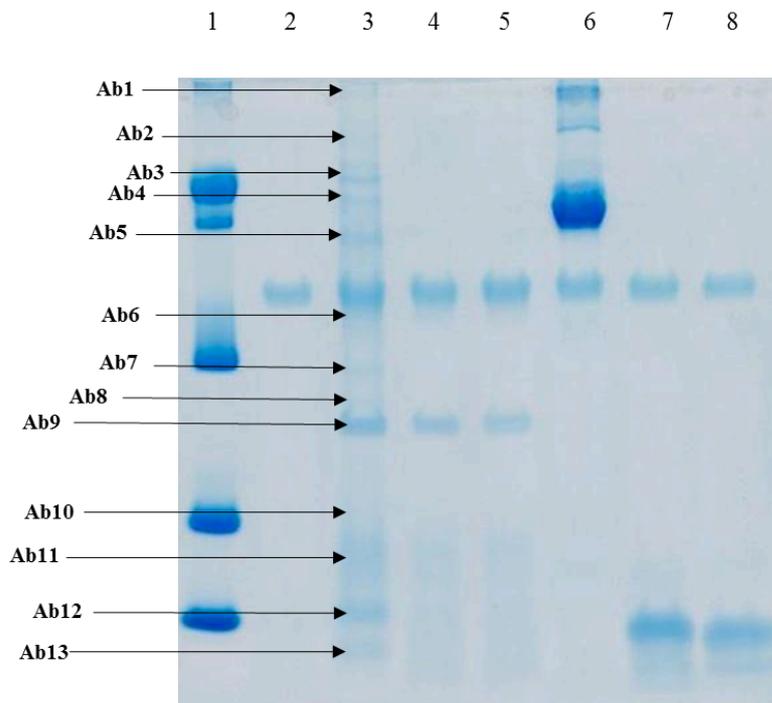
La cantidad colocada en cada pocillo fue: en el pocillo 1 con 46  $\mu\text{g}$  de proteína. En el pocillo 2 con 34  $\mu\text{g}$  de proteína. En el pocillo 3 con 23  $\mu\text{g}$  de proteína. En el pocillo 4 con 43  $\mu\text{g}$  de proteína. En el pocillo 5 con 21  $\mu\text{g}$  de proteína. Y en el pocillo 6 con 21  $\mu\text{g}$  de proteína.

Se ha estudiado el efecto de la diálisis de los extractos sobre el perfil proteínico. Como se muestra en la figura R2 observamos una clara diferencia en el extracto concentrado donde hay mayor cantidad de proteína.

Al realizar la diálisis separamos las moléculas en el extracto acuoso de *Agaricus bisporus* por la diferencia en sus índices de difusión o presión osmótica a través de una membrana semipermeable (tripa de diálisis). Observamos que al realizar la diálisis aumenta el volumen de la tripa de diálisis, es decir, entra agua.

### 5.3. Digestión gástrica con fluido gástrico simulado del extracto acuoso del sombrero de *Agaricus bisporus*.

Determinamos *in vitro* la sensibilidad de las proteínas en la digestión gástrica.



**Figura R3. Digestibilidad de las proteínas de *Agaricus bisporus*.** Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS y en condiciones no reductoras. Pocillo 1, marcadores moleculares: Self, ebulina, SNA II, inhibidor de tripsina y lactoalbúmina. Pocillo 2, pepsina a tiempo 0. Pocillo 3, *Agaricus bisporus* + pepsina a tiempo 0. Pocillo 4, *Agaricus bisporus* + pepsina durante 30 minutos incubando. Pocillo 5, *Agaricus bisporus* + pepsina durante 60 minutos incubando. Pocillo 6, BSA + pepsina a tiempo 0. Pocillo 7, BSA + pepsina durante 5 minutos incubando. Pocillo 8, BSA + pepsina durante 15 minutos incubando.

La cantidad de proteína colocada en cada pocillo fue de: 28 µg de pepsina, 44 µg de proteína de *Agaricus bisporus* y 4,72 µg de BSA.

Las muestras se incubaron durante una hora con pepsina a 37 ° C, a tiempo 0 (pocillos 2, 3, 6), 5 minutos (pocillo 7), 15 minutos (pocillo 8), 30 minutos (pocillo 4), y 60 minutos (pocillo 5).

Se realizó la digestión de las proteínas en un fluido gástrico simulado a tiempos 0, 5, 15, 30, 60 minutos. Después se realizó un análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS en condiciones no reductoras, de los extractos de *Agaricus bisporus* (figura R3).

Se observó degradación en las bandas Ab1, Ab3, Ab4, Ab5, Ab7, Ab11, Ab12 y Ab13 a los 30 minutos de la incubación con el enzima. La resistencia más notable fue la de la banda Ab9. Esta banda de 34.000 Da es resistente a la acción de la pepsina.

Disminuye la intensidad de las proteínas Ab11, Ab12 y Ab13 tras la digestión gástrica, incluso algunas desaparecen por completo. Mientras que la Ab9 se mantiene.

Como puede apreciarse las proteínas mayoritarias detectadas en *Agaricus bisporus* son Ab5, Ab7, Ab9.

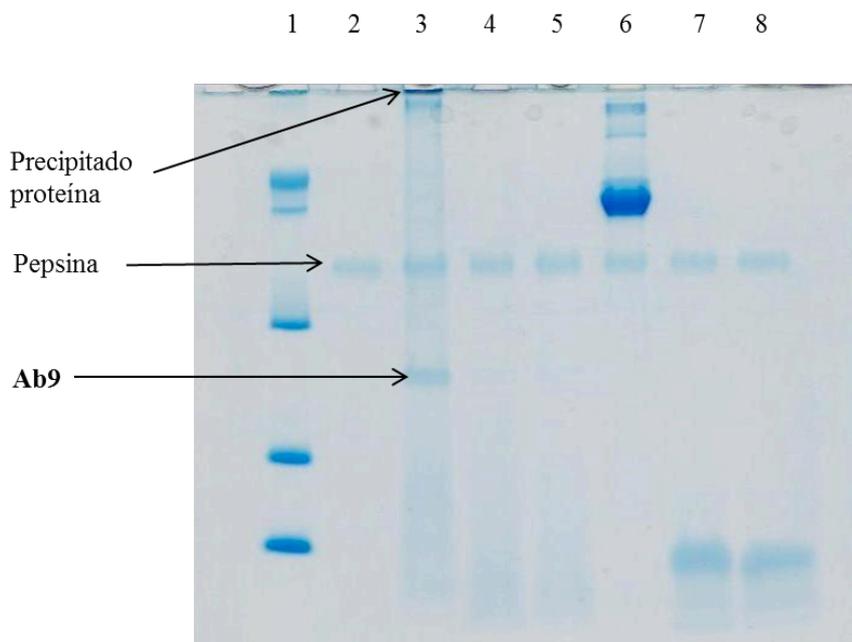
Las proteínas Ab1, Ab3, Ab4, Ab5 y Ab7 desaparecieron después de 30 minutos de incubación a 37 °C. Sin embargo, Ab9 se hizo progresivamente más débil, pero todavía era visible a los 60 minutos.

#### 5.4. Efecto del tratamiento térmico sobre la digestibilidad de las proteínas del extracto acuoso del sombrero de *Agaricus bisporus* con fluido gástrico simulado.

Llevamos a ebullición el extracto de *Agaricus bisporus* 10 minutos antes de la digestión con pepsina y realizamos una electroforesis SDS-PAGE y el resultado es el siguiente (figura R4).

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la digestibilidad de las proteínas de la seta en presencia de un fluido gástrico simulado, se somete el extracto a ebullición durante 10 minutos y después se analiza el contenido proteico con electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Como puede verse en la figura R4, el tratamiento térmico sensibiliza a la proteína Ab9 a la degradación por pepsina. La albúmina utilizada como control se degrada rápidamente y totalmente a los 5 minutos.



**Fig R4. Digestibilidad de las proteínas de *Agaricus bisporus* tratadas con calor. 1)** Marcadores: Seldf, ebulina, SNAII, inhibidor de tripsina y lactoalbúmina. **2)** Pepsina. A tiempo 0 min. **3)** *Agaricus bisporus* + pepsina. A tiempo 0 min. **4)** *Agaricus bisporus* + pepsina. Durante 30 minutos. **5)** *Agaricus bisporus* + pepsina. Durante 60 minutos. **6)** BSA + pepsina. A tiempo 0. **7)** BSA+ pepsina. Durante 5 minutos. **8)** BSA + pepsina. Durante 15 minutos.

El tratamiento a ebullición del extracto de la seta provoca la precipitación de distintas proteínas y posiblemente polisacáridos también presentes como vemos en el microtubo de la figura R5.



**FigR5. Proteína precipitada** tras su incubación a ebullición durante 10 minutos.

Estos agregados se solubilizan en su mayor parte en la incubación del tampón de muestra que contiene SDS.

El material no disuelto se quedó en el pocillo, y se tiñe con gran intensidad como puede apreciarse en la figura R5.

## 6. DISCUSIÓN

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

En el presente trabajo experimental se realizaron ensayos de digestibilidad *in vitro* con un fluido gástrico simulado de los extractos acuosos de la seta a tiempos variables y posteriormente se empleó electroforesis SDS-PAGE imitando las condiciones gástricas, para identificar los productos de la digestión. Con el fin de vigilar el grado de digestión con pepsina, el proceso se detuvo en puntos de tiempo específicos.

En este trabajo se ha obtenido un perfil proteínico de la especie de hongo *Agaricus bisporus* y se ha evaluado la digestibilidad de las proteínas de esta seta, con el objetivo de identificar y caracterizar las distintas proteínas y su sensibilidad a los enzimas proteolíticos. El análisis electroforético de los extractos de la seta ha permitido identificar las proteínas solubles en agua que contiene esta seta. Analizando las figuras R1, R3 y R4 se determina que existen proteínas de diversos pesos moleculares. Las proteínas Ab5 (56.000 Da), Ab7 (44.000 Da) y Ab9 (34.000 Da) son las proteínas predominantes en el perfil proteínico del extracto acuoso de *Agaricus bisporus*.

En el perfil proteínico destacan proteínas de elevado peso molecular como Ab1 (90.000 Da) y Ab2 (78.000 Da), proteínas de peso molecular medio como Ab5(56.000 Da), Ab6 (47.000 Da) y Ab7 (44.000 Da), y de

bajo peso molecular como Ab9 (34.000 Da), Ab12 y Ab13 (19.000 Da y 15.000 Da), todas ellas aparecen en el sombrero.

El único estudio que se ha encontrado en la literatura científica sobre la digestibilidad de proteínas *in vitro* de *Agaricus bisporus* ha sido “Nutritional attributes of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor caju* mushrooms”, en el cual no se especifica los métodos empleados para su evaluación. Únicamente aparecen los resultados comparativos con otra seta. Por lo tanto este trabajo realizado es novedoso para comparar la estabilidad digestiva de proteínas alimentarias en la seta, ya que sólo hemos encontrado un único estudio.

Con la electroforesis lo que conseguimos es una separación de proteínas por tamaño, son tratadas con SDS (dodecil sulfato sódico) para que su carga sea negativa y todas migren hacia el ánodo. Esta separación se ha realizado en una matriz, que hace que las proteínas más pequeñas corran más que las grandes. Cuanto mayor sea la masa molecular de la proteína, mayor será la movilidad de la misma, y viceversa. Una vez que se han separado las proteínas para ser visualizadas deben teñirse.

Las proteínas Ab1, Ab3, Ab4, Ab7, Ab11, Ab12 y Ab13 de *Agaricus bisporus* se degradan por completo a los 30 minutos de su tratamiento con pepsina, sin embargo la banda Ab9 resiste el ataque enzimático hasta los 60 minutos. Por lo tanto, podría ser una proteína alergénica.

La mayoría de proteínas son sensibles a la pepsina y acaban por degradarse completamente a los 60 minutos. Por otro lado, la banda Ab11 no es afectada por la pepsina y no llega a desaparecer totalmente a los 60 minutos. Sin embargo la Ab9 presenta resistencia total a la acción de la pepsina.

Por tanto, las proteínas que no se degradan por acción de la pepsina son candidatas a interactuar con la mucosa intestinal (Astwood y cols., 1996), y estimular el sistema inmune gastrointestinal de manera que muy probablemente dichas proteínas podrían presentar características alergénicas. Astwood y cols.(1996) estudiaron la estabilidad digestiva de un grupo importante de alérgenos alimentarios y enzimas no alergénicas. Encontraron que las proteínas alergénicas eran más estables que las no alergénicas y concluyeron que la digestibilidad podría ser un buen medio para distinguirlas. Sin embargo Koppelman y cols. (2010) han informado de que la baja digestibilidad no es un criterio para determinar los alérgenos proteicos de los alimentos, ya que muestran diferentes patrones de estabilidad en la digestión con pepsina.

Muchos de los principales alérgenos alimentarios son relativamente resistentes a la digestión, se han identificado péptidos resistentes a la digestión y esta característica general ha sido considerada como un medio para distinguir entre proteínas potencialmente alergénicas y no alergénicas (Koopelman y cols., 2010).

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

Generalmente el calentamiento disminuye la alergenicidad de proteínas mediante la destrucción de epítopos conformacionales. Las proteínas de los alimentos procesados térmicamente muestran un comportamiento diferente en los fluidos digestivos: interacciones de proteínas de los alimentos con el tejido linfoide asociado al intestino, la

capacidad de inducir la sensibilización de IgE, el potencial de desencadenar las reacciones de hipersensibilidad, entre otros. Proporcionando una posible persistencia de proteínas intactas y péptidos más grandes en el tracto gastrointestinal (Radosavljevic y cols., 2014); (Thomas y cols., 2004); (Monogioudi et al., 2011).

El procesamiento de alimentos puede disminuir la alergenicidad de proteínas de varias maneras incluyendo la destrucción de los epítomos conformacionales, con efecto limitado en epítomos secuenciales, y las reacciones químicas entre las proteínas y la grasa y los azúcares en la matriz alimentaria que dan cuenta de la limitada disponibilidad de proteína para el sistema inmune (Nowak-Wegrzyn y Fiocchi, 2009).

## 7. CONCLUSIONES

En conclusión, en este estudio hemos demostrado que las proteínas de la seta *Agaricus bisporus* se digieren con el tratamiento enzimático. Sin embargo se observa una banda en la electroforesis SDS PAGE que conserva sus características, por lo que tiene la posibilidad de ser alergénica, en una dosis baja de tolerancia oral.

Los resultados del estudio revelaron que las proteínas propensas a no degradarse mediante la digestión *in vitro* con pepsina pueden ser perjudiciales ya que podrían ser alergénicas. Y que tras su procesamiento con calor se modifican la mayoría a excepción de Ab9.

Sobre la base de los resultados obtenidos en el estudio con distintos métodos de análisis se puede concluir que:

1. Las proteínas mayoritarias de *Agaricus bisporus*, Ab1, Ab3, Ab4, Ab5, Ab7, Ab11, Ab12, Ab13 son extremadamente sensibles a la digestión en fluido gástrico simulado. En contraste Ab9 es resistente.

2. La incubación a ebullición de los extractos de *Agaricus bisporus* sensibiliza a las proteínas resistentes a la acción de la pepsina, en particular Ab9.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Astwood, JD., Leach, JN., Fuchs, RL. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology*. 14(10):1269-73.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ES/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*. 47:1076-1079.
- Chang, ST., Wasser, SP. (2012) The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 14(2): 95-134.
- Cox, PW., Hooley, P. (2009). Hydrophobins: New prospects for biotechnology. *Fungal Biology*. 23: 40-47.
- Dabbour, IR., Takruti, HR. (2002a). Protein quality of four types of edible mushrooms found in Jordan. *Plant Foods for Human Nutrition*. 57 (1):1-11.
- Dabbour, I.R., Takruri, H.R. (2002b). Protein Digestibility using Corrected Amino Acid Score method (PDCAAS) of four types of mushrooms grown in Jordan. *Plant Foods for Human Nutrition*. 57: 13-24.
- Desprez-Loustau, ML., Robin, C., Buée, M., Courtecuisse, R., Garbaye, J., Suffert, F., Satche, I., Rizzo, DM. (2007). The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution*. 22(9):472-80
- Erjavec, J., Kos, J., Ravnihar, M., Dreo, T., Sabotic, J. (2012). Proteins of higher fungi—from forest to application. *Trends in Ecology and Evolution*. 30(5):259-73.

- García Blanco, A., y Sánchez, Rodríguez J.A. (2009). Setas de la Península Ibérica y de Europa. Ed. Everest.
- Faria, RO., Moure, RV., Almeida, MA., Krieger, N., Alexander, M.D. (2007). The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technology and Biotechnology*. 45 (3): 287-294.
- Goyal, R., Grewal, RB., Goyal, RK (2006). Nutritional attributes of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor caju* mushrooms. *Nutrition and Health*. 18(2): 179-184.
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, MA., Villares, A., Martínez, JA. (2010). Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*. 81(7):715-23.
- Guarnizo Franco, A., Martínez Yepes, P.N. (2009). *Experimentos de Química Orgánica*. Ed. Elizcom.
- Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, JC., Hamdi, M., Lomascolo, A. (2006). Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*. 100 (2): 219-32.
- Hawksworth, D.L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*. 95: 641-655.
- Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 109: 1422-1432.
- Hektor, HJ., Scholtmeijer, K. (2005). Hydrophobins: proteins with potential. *Current Opinion in Biotechnology*. 16 (4): 434-9.

- Jeon, JR., Baldrian, P., Murugesan, K., Chang, YS. (2012). Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to Green synthetic applications. *Microbial Biotechnology*. 5(3), 318-332.
- Jimenez, P., Tejero, J., Cabrero, P., Cordoba-Diaz, D., Girbés, T. (2013). Differential sensitivity of D-galactose-binding lectins from fruits of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) to a simulated gastric fluid. *Food Chemistry*. 136(2): 794-802.
- Kalac, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*. 113: 9-16.
- Khan, F., Islam, MK. (2011). Fungal lectins: current molecular and biochemical perspectives. *International Journal of Biological Chemistry*. 5 (1):1-20.
- Koopelman, SJ., Hefle, SL., Taylor, SL., de Jong, GA. (2010). Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6: a comparative in vitro study and partial characterization of digestion-resistant peptides. *Molecular Nutrition and Food Research*. 54 (12):1711-21.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lelley, J.I. (1999). From edible to useful mushrooms--an attempt for the new economical assessment of large fungi. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 46(2-3): 205-13.
- Lindequist, U., Niedermeyer, THJ., Jülich, W-D. (2005). The Pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2(3):285-299.

- Mattinen, M.L., Lantto, R., Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J. (2008). Oxidation of peptides and proteins by *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus* tyrosinases. *Journal of Biotechnology*. 133(3): 395-402.
- Monogioudi, E., Faccio, G., Lille, M., Poutanen, K., B, Johanna., Mattinen, M-L. (2011). Effect of enzymatic cross-linking of beta-casein on proteolysis by pepsin. *Food Hydrocolloids*. 25 (1) : 71-81.
- Nowak-Wegrzyn, A, Fiocchi, A. (2009). Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 9(3): 234-7.
- Radosavljevic, J., Nordlnd, E., Mihajlovic, L., Krstic, M., Bohn, T., Buchert, J., Velickovic, TC., Smit, J. (2014). Sensitizing potential of enzymatically cross-linked peanut proteins in a mouse model of peanut allergy. *Molecular Nutrition & Food Research*. 58(3): 635-46.
- Reis, F.S., Martins, A., Barros, L., Ferreira, I. (2012). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology*. 50(5): 1201-1207.
- Reis, F. S., Pereira, E., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., Ferreira, I. C. F. R. (2011). Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. *Molecules*, 16(6): 4328–38.
- Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, GA., Bartels, M., Dearman, RJ., Esdaile, DJ., Fu, TJ., Glatt, CM., Hadfield, N., Hatzos, C., Hefle, SL., Heylings, JR., Goodman, RE., Henry, B., Herouet, C., Holsapple, M.,Ladics, Gs., Landry, TD., Macintosh, SC., Rice, EA., Privalle, LS., Steiner, HY., Teshima, R., Van Ree, R., Woolhiser, M., Zawodny, J. (2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin

- digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 39(2):87-89.
- Venturini, M.E., Reyes, J.E., Rivera, C.S., Oria, R., Blanco, D. (2011). Microbiological quality and safety of fresh cultivated and wild mushrooms commercialized in Spain. *Food Microbiology*. 28: 1492-1498.
- Vieths, S., Scheurer, S., Ballmer-Weber, B.K. (2002). Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 964: 47-68.
- Wasser, SP. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60 (3):258-74
- Wasser, SP. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89 (5): 1323-1332.
- Wong, JH., Ng, TB., Cheung, RC., Ye, XJ., Wang, HX., Lam, SK., Lin, P., Chan, YS., Fang, EF., Ngai, PH., Xia, LX., Ye, XY., Jiang, Y., Liu, F. (2010). Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(4):1221-35.
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*. 29 (6): 667-74.
- Zhao, S., Guo, YX., Liu, QH., Wang, HX., Ng, TB. (2009). Lectins but not antifungal proteins exhibit anti-nematode activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28(2):265-8.