

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



**“REVALORIZACIÓN DE LOS SUBPRODUCTOS DE  
LA INDUSTRIA DE HONGOS Y SETAS  
COMESTIBLES. Aplicación a la obtención de  
productos de alto valor añadido.”**

**Memoria presentada para optar por el grado de Doctor en  
Farmacia por:**

**ALBERTO RENATO INCA TORRES**

**Sevilla, 2019**





**Prof. Dr. José Luis Venero Recio**

C / Profesor García González, 2.

41012 Sevilla (España)

Teléfono: 954 55 3803

e-mail: [jlvenero@us.es](mailto:jlvenero@us.es)

**José Luis Venero Recio**, Catedrático de Universidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla (NRP: A0500-0880376924), Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla.

Informa:

Que la tesis doctoral titulada **“REVALORIZACIÓN DE LOS SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA DE HONGOS Y SETAS COMESTIBLES. Aplicación a la obtención de productos de alto valor añadido”**, presentada por el doctorando **Alberto Renato Inca Torres**, para optar por el título de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Drs.: Juan Dionisio Bautista Palomas y Juan Parrado Rubio, reuniendo todo los requisitos necesarios para presentarse a su defensa.

Fdo: José Luis Venero Recio  
(Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular).





**Juan Dionisio Bautista Palomas**, Catedrático de Universidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla (NRP: A055-5159678268), y **Juan Parrado Rubio**, Catedrático de Universidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla (NRP: A0500-2729451168), adscritos al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla.

**Informan:**

Que la Tesis Doctoral titulada **“REVALORIZACIÓN DE LOS SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA DE HONGOS Y SETAS COMESTIBLES. Aplicación a la obtención de productos de alto valor añadido.”**, realizada por **Alberto Renato Inca Torres** para optar al título de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Facultad de Farmacia), Universidad de Sevilla. Y que dicha tesis reúne todos los requisitos académicos y experimentales necesarios para proceder a su presentación y defensa.

**Fdo.: Dr. Juan D. Bautista Palomas**  
(Director de Tesis)

**Fdo.: Dr. Juan Parrado Rubio**  
(Director de Tesis)



## ***PUBLICACIONES***

Parte de los resultados presentados en esta Tesis doctoral, han sido publicados en los siguientes artículos:

**Inca-Torres A.R.**, Urbina-Salazar A.R., Falcón-García G., Carbonero-Aguilar P., Rodríguez-Morgado B., Parrado J., Bautista J., (2018). Hydrolytic enzymes production by *Bacillus licheniformis* growth on fermentation media formulated with sewage sludge. *Journal of Biotech Research*, 9:14-26.

**Nota:** *Parte de las enzimas hidrolíticas producidas en este trabajo han sido utilizadas para llevar a cabo la hidrólisis de las proteínas de la harina de tallos de champiñón.*

Urbina-Salazar A.R., **Inca-Torres A.R.**, Falcón-García G., Carbonero-Aguilar P., Rodríguez-Morgado B., del Campo J.A., Parrado J., Bautista J., (2018). Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0328-4>.

**Nota:** *En este trabajo se ha contribuido a la caracterización de los subproductos procedentes de la industria del champiñón como etapa previa a su utilización como fuente de cultivo para la producción de enzimas hidrolíticas fundamentalmente quitinasas.*

Parte de los resultados presentados en esta tesis doctoral han sido presentados en los siguientes Congresos y Jornadas:

**Inca-Torres A.R.**, Urbina-Salazar A.R., Falcón-García G., Carbonero-Aguilar P. and Bautista J., (2017). Preparation of fungal chitin from agroindustrial by-products: Application to edible mushrooms (*Agaricus bisporus*) by-products. Póster en Congreso. XIII EUCHIS & VIII SIAQ. Sevilla, Mayo 2017.

**Inca-Torres A.R.**, Urbina-Salazar A.R., Falcón-García G., Cremades O. and Bautista J., (2018) “*In vitro*” study of mushroom ergothioneine enriched aqueous extracts (M-ERG-EAE) against oxygen activated substances. Póster en Congreso. IV JORNADAS DOCTORALES DE LA UNIVERSIDAD DE

MURCIA. Murcia, Mayo 2018.

**Inca-Torres A.R.**, (2018). Revalorización de los subproductos de la industria de hongos y setas comestibles. Aplicación a la obtención del antioxidante natural Ergotioneina y de Biofertilizantes ricos en aminoácidos y oligopéptidos. Comunicación Oral. III JORNADAS DOCTORALES DE FARMACIA. Sevilla, Julio 2018.

**Inca-Torres A.R.**, Urbina-Salazar A.R., and Bautista J., (2018). Preparation of nanochitin from crawfish (*Procambarus clarkii*) by-products. Póster en Congreso. IPAP18 INNOVATIONS IN PHARMACY (ADVANCES & PERSPECTIVES). Salamanca, Septiembre 2018.

Urbina-Salazar A.R., **Inca-Torres A.R.**, Carbonero-Aguilar P., Falcón-García G., and Bautista J., (2017). Production of chitinases by submerged fermentation in media formulated with colloidal chitin of fungi. Póster en Congreso. XIII EUCHIS & VIII SIAQ. Sevilla, Mayo 2017.

Urbina-Salazar A.R., **Inca-Torres A.R.**, Carbonero-Aguilar P., Cremades O., and Bautista J., (2018). Mushroom ergothioneine enriched aqueous extracts (M-ERG-EAE) suppress TNF- $\alpha$  and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. Póster en Congreso. IV JORNADAS DOCTORALES DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA. Murcia, Mayo 2018.

Urbina-Salazar A.R., **Inca-Torres A.R.**, and Bautista J., (2018). Preparation of fungal- nano chitin crystals: application to mushroom (*Agaricus bisporus*) by-products. Póster en Congreso. IPAP18 INNOVATIONS IN PHARMACY (ADVANCES & PERSPECTIVES). Salamanca, Septiembre 2018.

Carbonero-Aguilar P., Falcón-García G., Urbina-Salazar A.R., **Inca-Torres A.R.**, and Bautista J., (2017). Use of crayfish (*Procambarus clarkii*) chitin as carbon source for the production of chitinases by submerged fermentation. Póster en Congreso. XIII EUCHIS & VIII SIAQ. Sevilla, Mayo 2017.

Falcón-García G., Carbonero-Aguilar P., **Inca-Torres A.R.**, Urbina-Salazar A.R., and Bautista J., (2017). Production of Crawfish (*Procambarus clarkii*) chitin enriched fractions by enzymatic procedures for fermentation uses and chitin-oligosaccharides production. Póster en Congreso. XIII EUCHIS & VIII SIAQ. Sevilla, Mayo 2017.



Rodríguez-Morgado B., Caballero Jiménez P., **Inca-Torres A.R.**, Urbina-Salazar A.R., Parrado J., Tejada M., (2016). Obtaining a soil biostimulant from sewage sludge: Effect on soil biochemistry. Póster en Congreso. *5th International Conference Enzymes in the Environment. Ecology, Activity and Application*. Bangor, Gales, Reino Unido. 2016.





Esta Tesis se ha realizado gracias a la financiación de los siguientes Proyectos de Investigación:

Proyecto: **Aumento del contenido de vitamina D en champiñón fresco (CHAMPI-D)**. (Ref.: RTC2015-4039-2), Ministerio de Economía y Competitividad, del gobierno de España.

Proyecto: **Valorización de fibras celulósicas y de quitina obtenidas de subproductos de la industria agroalimentaria mediante el desarrollo de biocomposites poliméricos (VALORIZAGRO)**. (Ref.: PRJ201702958), FIUS, Universidad de Sevilla



***“Da tu primer paso con fe, no es necesario que veas toda la escalera completa, solo da tu primer paso”.***

Martin Luther King

## **El Gran Viaje**

¿Quién será, en un futuro no lejano, el Cristóbal Colón  
de algún planeta?

¿Quién logrará, con máquina potente sondear el océano  
del éter, y llevarnos de la mano allí donde llegaran  
solamente los osados ensueños del poeta?

Espíritus a quienes las edades en su fluir robusto  
mostraron ya la clave portentosa de lo Bello y lo Justo,  
¿Cuál será la cosecha de verdades que deis al hombre,  
tras el viaje augusto?

¿Con qué nueva luz escrutará el arcano?

¡Oh la esencial revelación completa que fije un nuevo  
molde al barro humano!

**Amado Nervo**

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de enseñanzas, experiencia y sobre todo felicidad.

A mi esposa Anabell por ser parte importante de mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, por su paciencia, comprensión y sobre todo por su amor.

Le doy gracias a mis padres Walter y Myriam, que han sido mis amigos, mis aliados, mi ejemplo, que siempre me han apoyado en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. El logro también es de ellos.

A mi hermana Valeria por ser parte de mi vida y que junto a Renata han llenado mi vida de alegría y amor logrando una mayor unión familiar.

Gracias a toda mi familia por todo su cariño, amor e inmensa bondad que a la distancia ha permitido que lo complicado de lograr este proyecto se note menos.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Juan Dionisio Bautista Palomas por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Por haber compartido conmigo sus conocimientos y sobre todo su amistad. Sin su apoyo incondicional y sus consejos este trabajo no habría podido hacerse realidad.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Bruno, Pablo, Wili, Angel, Sandra Macias, Angelica, Juan Parrado, Gonzalo, Pili, Paula, Sandra Robles, Marina... por toda la ayuda prestada y buenos momentos compartidos. Aprender con y de ustedes ha sido muy gratificante y entretenido.

A todos mis amigos, colegas técnicos, personal y maestros de la Universidad de Sevilla que formaron parte de esta aventura, un trabajo de investigación es

también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales, siempre se quedarán en mis recuerdos.

Por último, gracias a todas y cada una de las personas que me han animado durante este camino, que junto a su apoyo moral y humano en los momentos difíciles hicieron posible este proyecto.

La vida siempre te lleva al final de un camino, y este es el mio, el final de un camino que me propuse sin pensarlo, el final de un camino lleno de muchas emociones, el final de un camino de experiencia y aprendizaje pero la vida es así las historias terminan para que otras mejores puedan empezar.

Un volver a empezar porque volver a empezar es volver a soñar, es volver a vivir, es insistir cuantas veces sea necesario ese algo, que permita que el camino por esta vida haya valido la pena por el solo hecho de ser feliz.

Sevilla tiene un color especial, y quedará impregnada en mi piel, porque Sevilla es una de esas ciudades a las que siempre volverás porque ya lo decía Antonio Gala "lo malo no es que los sevillanos piensen que tienen la ciudad mas bonita del mundo... lo peor es que puede que tengan razón".

Renato.



**“En la investigación es incluso más importante el proceso que el logro mismo”.**

**Emilio Muñoz**



## ÍNDICE

---



# Índice

•	<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
•	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
	<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
	<i>1.1 Historia de los Hongos comestibles.....</i>	<i>11</i>
	<i>1.2 Cultivo de Hongos comestibles.....</i>	<i>15</i>
	1.2.1 Diferentes sistemas de cultivo .....	22
-	<i>Sistema francés .....</i>	<i>23</i>
-	<i>Sistema holandés.....</i>	<i>23</i>
-	<i>Sistema americano .....</i>	<i>23</i>
	1.2.2 Cultivo del champiñón.....	24
-	<i>Obtención de micelio (semilla) .....</i>	<i>25</i>
-	<i>Preparación del compost .....</i>	<i>25</i>
-	<i>Siembra del inóculo (inoculación).....</i>	<i>27</i>
-	<i>Producción .....</i>	<i>27</i>
-	<i>Cosecha.....</i>	<i>29</i>
-	<i>Manejo Post-Cosecha .....</i>	<i>29</i>

<b>1.3 Interés Económico del cultivo de hongos comestibles.....</b>	<b>30</b>
1.3.1 Consumo en Fresco.....	33
1.3.2 Consumo en Conserva .....	35
<b>1.4 Generación de subproductos en la industria del champiñón.....</b>	<b>37</b>
<b>1.5 Los subproductos de champiñón como fuente de productos de alto valor añadido.....</b>	<b>39</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
<b>2.1 Objetivo General .....</b>	<b>44</b>
<b>2.2    Objetivos Específicos.....</b>	<b>44</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1    Aparatos, Materiales y Reactivos.....</b>	<b>48</b>
3.1.1 Aparatos .....	48
3.1.2 Materiales.....	50
3.1.3 Reactivos.....	53
<b>3.2 Material de Partida: Subproductos .....</b>	<b>55</b>
3.2.1 Estabilización del material de partida .....	56
– <i>Secado y molienda de TCH</i> .....	56
– <i>Concentración del LE</i> .....	57
i) <i>Concentración en Rotavapor</i> .....	58
ii) <i>Concentración por osmosis inversa</i> .....	59

3.2.2 Caracterización química del material de partida.....	60
• <i>Humedad-Peso seco</i> .....	60
• <i>Cenizas</i> .....	60
• <i>Hidratos de Carbono totales</i> .....	61
• <i>Grasa cruda</i> .....	63
• <i>Nitrógeno total</i> .....	63
• <i>Cuantificación de Proteínas</i> .....	63
• <i>pH</i> .....	69
<b>3.3 Diseño de procesos biotecnológicos para la valorización de la HTCH ....</b>	<b>70</b>
• <i>Tratamiento térmico</i> .....	71
• <i>Tratamiento Enzimático</i> .....	71
<b>3.4 Obtención de hidrolizados .....</b>	<b>73</b>
3.4.1 Hidrólisis Simple .....	74
3.4.2 Hidrólisis Secuencial .....	78
3.4.3 Determinación del Grado de Hidrólisis .....	78
<b>3.5 Análisis electroforético .....</b>	<b>79</b>
3.5.1 Electroforesis Unidimensional, PAGE-SDS.....	79
3.5.2 Electroforesis de Péptidos, Tricina –PAGE- SDS .....	79

<b>3.6 Cromatografía de Exclusión.....</b>	<b>81</b>
<b>3.7 Análisis de Aminoácidos.....</b>	<b>82</b>
<b>3.8 Cuantificación de Ergotioneina .....</b>	<b>84</b>
<b>3.9 Actividades biológicas.....</b>	<b>84</b>
3.9.1 Actividad antioxidante .....	84
– Capacidad secuestradora del radical ABTS <sup>•+</sup> .....	85
– Capacidad secuestradora del radical DPPH <sup>•</sup> .....	87
– Actividad quelante de metales .....	89
– Poder reductor férrico o Ensayo FRAP .....	90
– Inhibición de la oxidación del ácido linoleico o Inhibición peroxidación lipídica. ....	92
3.9.2 Actividad antidiabética .....	93
– Inhibición de la actividad $\alpha$ -Glucosidasa .....	93
– Inhibición de la actividad $\alpha$ -Amilasa .....	94
3.9.3 Inhibición de la actividad tirosinasa .....	95
<b>3.10 Aplicación Agronómica: Evaluación de los Hidrolizados de HTCH como Biofertilizantes .....</b>	<b>96</b>
a) Preparación de las Semillas.....	96
- Desinfección.....	96
- Viabilidad.....	97



b) Siembra y Germinación de las Semillas .....	98
- <i>Siembra</i> .....	98
- <i>Condiciones de Germinación</i> .....	99
c) Evaluación de la Germinación .....	99
▪ <i>Longitud de la Raíz</i> .....	100
▪ <i>Longitud del Tallo</i> .....	100
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>104</b>
<b><i>4.1 Descripción general</i> .....</b>	<b><i>106</i></b>
<b><i>4.2 Estabilización de subproductos</i> .....</b>	<b><i>109</i></b>
4.2.1 Estabilización de tallos y champiñones defectuosos (Obtención de HTCH).....	109
4.2.2 Estabilización del líquido de escaldado (LE10X).....	110
<b><i>4.3 Composición básica de los subproductos estabilizados</i> .....</b>	<b><i>111</i></b>
4.3.1 Composición básica de la HTCH.....	111
4.3.2 Composición básica del LE10X.....	113
<b><i>4.4 Diseño de procesos biotecnológicos para la valorización de subproductos de la industria de los hongos y setas comestibles: Aplicación al champiñón</i> .....</b>	<b><i>116</i></b>
4.4.1 Valorización de la HTCH .....	117
4.4.1.1 Obtención de hidrolizados proteicos a partir de la HTCH .	118

a) <i>Hidrólisis enzimáticas</i> .....	121
b) <i>Caracterización de los Hidrolizados</i> .....	126
▪ <i>Caracterización básica</i> .....	126
▪ <i>Caracterización electroforética</i> .....	128
▪ <i>Caracterización cromatográfica (Cromatografía de Exclusión)</i> .....	131
▪ <i>Composición aminoacídica de los HPTCH</i> .....	136
<b>4.5 Estudios de potenciales actividades biológicas en los HPTCH.....</b>	<b>141</b>
4.5.1 <i>Actividad antioxidante</i> .....	141
4.5.1.1 <i>Capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup></i> .....	141
4.5.1.2 <i>Capacidad secuestradora del radical DPPH<sup>•</sup></i> .....	143
4.5.1.3 <i>Actividad quelante de metales</i> .....	146
4.5.1.4 <i>Poder reductor férrico (Ferric reducing activity power: FRAP)</i> .....	149
4.5.1.5 <i>Inhibición de la oxidación del ácido linoleico (Inhibición peroxidación lipídica)</i> .....	152
4.5.2 <i>Actividad antidiabética</i> .....	157
4.5.3 <i>Inhibición de la actividad tirosinasa</i> .....	160
<b>4.6 Aplicación como Biofertilizante .....</b>	<b>163</b>

4.6.1	Uso de HTCH <sub>H2O</sub> y HPTCH como biofertilizantes. ....	164
-	Evaluación de la viabilidad de las semillas.....	164
-	Germinación de las Semillas con HTCH <sub>H2O</sub> y HPTCHs .....	164
4.6.2	Uso del LE como biofertilizante (Valorización del LE).....	169
-	Germinación de las Semillas con LE .....	170
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>178</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>182</b>
<b>•</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>196</b>

## INDICE DE FIGURAS

**Figura I.1** Petroglifos hallados en las orillas del río Pegtymel (Rusia). Los alucinógenos en el mito. Relatos sobre el origen de las plantas psicoactivas (Tomado de **Samorini y Zanarini, 2001**).

**Figura I.2** Escultura de barro en forma de hongo de origen precolombino (**Lowi, 1974**).

**Figura I.3** a) *Agaricus bisporus*; b) *Pleurotus ostreatus*.

**Figura I.4** Diferentes partes del hongo.

**Figura I.5** Fases del proceso de producción de *A. bisporus* (champiñón).

**Figura I.6** Producción de Hongos y Setas comestibles a nivel mundial. (Adaptado de datos **FAOSTAT, 2016**).

**Figura I.7** Producción de Hongos y setas comestibles por continentes en el 2016. (Adaptado de datos **FAOSTAT, 2016**).

**Figura I.8** Producción de hongos y setas comestibles en Europa en el 2016. (Adaptado de datos **FAOSTAT, 2016**).

**Figura I.9** Producción de hongos y setas comestibles en España. (Adaptado de datos **FAOSTAT, 2016**).

**Figura I.10** A) Champiñones enteros, B) Champiñones laminados.

**Figura I.11** Principales formas de Consumo de Hongos comestibles en España en el 2016.

**Figura I.12** Esquema general de la producción de *Agaricus bisporus* (Champiñón): Productos y subproductos.

**Figura M&M.1** a) Tallos y champiñones defectuosos, b) LE.

**Figura M&M.2** a) Estufa de secado estático y con flujo de aire caliente, b) Molino.

**Figura M&M.3** Rotavapor (Büchi, Suiza).

**Figura M&M.4** Equipo de osmosis inversa (OI).

**Figura M&M.5** Espectrofotómetro.

**Figura M&M.6** Curva patrón de Glucosa.

**Figura M&M.7** Curva de Calibración con BSA (Método de Biuret).

**Figura M&M.8** Curva de Calibración con BSA (Método de Lowry).

**Figura M&M.9** Curva de Calibración con BSA (Método Bradford).

**Figura M&M.10** pH-metro.

**Figura M&M.11** Diseños Biotecnológicos para la obtención de compuestos de interés.

**Figura M&M.12** Reactor utilizado para la realización de las hidrólisis de las proteínas de la HTCH.

**Figura M&M.13** Sistema de hidrólisis de construcción propia 1. Baño de agua termostatzado, 2. Medidor/Controlador de pH (pH-metro), 3. Medidor/Controlador de temperatura (Termopar), 4. Agitador mecánico, 5. Dosificador de NaOH.

**Figura M&M.14** HPLC (Jasco, Tokio, Japón) equipado con una bomba semipreparativa PU-4086-Binary Semipreparative Pump (Jasco, Japón).

**Figura M&M.15** Equipo Biochrom/30 utilizado para el análisis de aminoácidos y diagrama del sistema.

**Figura M&M.16** Reacción de derivatización con ninhidrina.

**Figura M&M.17** Reacción de oxidación-reducción para la formación del radical ABTS<sup>•+</sup> y de su forma reducida ABTS-H.

**Figura M&M.18** Reacción coloreada del radical DPPH• (color púrpura) en presencia de un antioxidante para producir DPPH-H reducido (color amarillo).

**Figura M&M.19** Reacción del complejo Fe<sup>3+</sup> con un antioxidante.

**Figura M&M.20** Proceso de desinfección de Semillas.

**Figura M&M.21** Oxidación del 2,3,5-trifenil-tetrazolio.

**Figura R.1** Economía lineal versus economía circular.

**Figura R.2** Generación de subproductos en el cultivo y procesamiento del champiñón.

**Figura R.3** A) Tallos y residuos de champiñones frescos, B) Harina de tallos y residuos de champiñón (HTCH).

**Figura R.4** A): Líquido de escaldado (LE), B): Líquido de escaldado concentrado 10 veces en RotaVapor (LE10X<sub>RV</sub>), C): Líquido de escaldado concentrado 10 veces por ósmosis inversa (LE10X<sub>OI</sub>).

**Figura R.5** Cromatograma del LE10X obtenido por cromatografía de exclusión en una columna Superdex™Peptide 10/300 GL.

**Figura R.6** Productos de interés industrial que se podrían obtener de: a) Tallos y champiñones no comercializables, b) Líquido de escaldado.

**Figura R.7** Proceso Biotecnológico desarrollado para la obtención de compuestos de interés.

**Figura R.8** Hidrólisis enzimática de la HTCH con las proteasas: Alcalase®, Flavourzyme®, Bioprotease LA-450 y Papaína.

**Figura R.9** Hidrólisis enzimática secuencial vs hidrólisis enzimática simple: A) Alcalase® vs “Alcalase® + Flavourzyme®” y B) Bioprotease LA-450 vs “Bioprotease LA-450 + Flavourzyme®”.

**Figura R.10** Gel de electroforesis en geles para péptidos, (según Schägger) de los diferentes hidrolizados proteicos y del extracto acuoso de la HTCH.

(M: marcadores de peso molecular; 1: **HTCH**<sub>H<sub>2</sub>O</sub>; 2: **HPTCH**<sub>A</sub>; 3: **HPTCH**<sub>P</sub>; 4: **HPTCH**<sub>LA450</sub>; 5: **HPTCH**<sub>F</sub>; 6: **HPTCH**<sub>A+F</sub>; 7: **HPTCH**<sub>LA450+F</sub>).

**Figura R.11** Caracterización de los hidrolizados enzimáticos por Cromatografía de Exclusión (215nm).

**Figura R.12** Porcentaje de proteína hidrolizada en cada muestra (Cromatografía de Exclusión \*215nm).

**Figura R.13** Caracterización de los hidrolizados enzimáticos por Cromatografía de Exclusión (280nm).

**Figura R.14** Porcentaje de proteína hidrolizada en cada muestra (Cromatografía de Exclusión \*280nm).

**Figura R.15** Contenido en aminoácidos hidrofóbicos (AAH), aminoácidos con carga positiva (AAsCP), aminoácidos con carga negativa (AAsCN), aminoácidos aromáticos (AAA) y aminoácidos esenciales (AAEs) para cada uno de los HPTCH.

**Figura R.16** Contenido individual de cada uno de los grupos aminoacídicos en los HPTCH.

**Figura R.17** Capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup> por los diferentes HPTCH.

**Figura R.18** Capacidad secuestradora del radical DPPH<sup>•</sup> por los diferentes HPTCH.

**Figura R.19** Capacidad quelante de los diferentes HPTCH.

**Figura R.20** Poder reductor férrico (FRAP) de los diferentes HPTCH (a tres concentraciones: 0,1, 0,2 y 0,3 mg/mL) y del control positivo, GSH a 0,1 mg/mL.

**Figura R.21** Auto-oxidación del ácido linoleico en ausencia de inhibidor (control -) y en presencia de inhibidores de la auto-oxidación.

**Figura R.22** a) Inhibición de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa, b) Inhibición de la actividad  $\alpha$ -amilasa del Extracto acuoso y los HPTCH.

**Figura R.23** a) Inhibición de la actividad Tirosinasa del Extracto acuoso y los HPTCH.

**Figura R.24** Porcentaje de germinación del ensayo con HTCH<sub>H2O</sub> y HPTCH.

**Figura R.25** Número de semillas que germinaron al sexto día.

**Figura R.26** Raíces, tallos y vellosidades de plántulas crecidas en los diferentes

ensayos al finalizar del mismo.

**Figura R.27** Porcentaje de germinación en el ensayo con LE.

**Figura R.28** Tiempo necesario para la germinación y desarrollo de la planta en el día seis.

**Figura R.29** Plántulas obtenidas al finalizar el ensayo con LE preparados a distintas concentraciones.

**Figura R.30** Ensayo de germinación de semillas de pimiento tratadas con LE, a distintas concentraciones, en tierra en el día 30

**Figura R.31** Plántulas obtenidas en el día 30 al finalizar el ensayo mediante el tratamiento con LE a distintas concentraciones.



## INDICE DE TABLAS

**Tabla I.1** Composición básica de *Agaricus bisporus* (Tomado de **Reis y col., 2012**)

**Tabla I.2** Condiciones ambientales de las cámaras de cultivo del champiñón.

**Tabla M&M.1** Aparatos.

**Tabla M&M.2** Materiales.

**Tabla M&M.3** Reactivos utilizados.

**Tabla M&M.4** Enzimas utilizadas en la hidrólisis de la HTCH.

**Tabla R.1** Composición básica de las HTCH procedentes de tres orígenes distintos: Autol (La Rioja), Hellin (La Manchuela) y Los Palacios (Sevilla).

**Tabla R.2** Composición básica del LE10X procedente de dos plantas diferentes.

**Tabla R.3** Balance de masas para la vía A) y B) del proceso biotecnológico utilizado para la recuperación de material hidrosoluble de la HTCH.

**Tabla R.4** Enzimas utilizadas en la hidrólisis de la HTCH.

**Tabla R.5** Balance de masas, referido al peso seco recuperado en el precipitado y en el sobrenadante, tras la hidrólisis enzimática simple de la HTCH.

**Tabla R.6** Balance de masas, referido al peso seco recuperado en el precipitado y en el sobrenadante, tras la hidrólisis enzimática secuencial de la HTCH.

**Tabla R.7** Composición básica de los hidrolizados proteicos de la HTCH (HPTCH<sub>X</sub>) en comparación con el extracto acuoso de la HTCH (HTCH<sub>H<sub>2</sub>O</sub>).

**Tabla R.8** Contribución porcentual para cada una de las zonas seleccionadas en los cromatogramas (215 nm).

**Tabla R.9** Contribución porcentual para cada una de las zonas seleccionadas en los cromatogramas (280 nm).

**Tabla R.10** Composición aminoacídica de la HTCH<sub>H2O</sub> y de los diferentes HPTCH (mg/g proteína).

**Tabla R.11** Capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup> por los diferentes HPTCH.

**Tabla R.12** Capacidad secuestradora del radical DPPH<sup>•</sup> por los diferentes HPTCH.

**Tabla R. 13** Capacidad quelante de los diferentes HPTCH.

**Tabla R.14** Poder reductor férrico (FRAP) de los diferentes HPTCH (a tres concentraciones: 0,1, 0,2 y 0,3 mg/mL) y del control positivo, GSH a 0,1 mg/mL.

**Tabla R.15** Resultados obtenidos para la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico.

**Tabla R.16** Inhibición porcentual de la peroxidación lipídica (ácido linoleico) por parte de los HPTCH y HTCH<sub>H2O</sub>.

**Tabla R.17** Inhibición de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa por los hidrolizados de la HTCH (HPTCH).

**Tabla R.18** Inhibición de la actividad  $\alpha$ -amilasa por los hidrolizados de la HTCH (HPTCH).

**Tabla R.19** Inhibición de la actividad Tirosinasa del extracto acuoso y los HPTCH.

## GLOSARIO

**AA:** Ácido Ascórbico.

**AAA:** Aminoácidos Aromáticos.

**AAEs:** Aminoácidos Esenciales.

**AAH:** Aminoácidos Hidrofóbicos.

**AAcCN:** Aminoácidos con Carga Negativa.

**AAcCP:** Aminoácidos con Carga Positiva.

**ABTS<sup>+</sup>:** 2,2'-azino-bis.

**Ala:** Alanina.

**AOAC:** Association of Official Analytical Chemists.

**APS:** Persulfato amónico

**Arg:** Arginina.

**Asx:** Acido Aspártico.

**BSA:** Albúmina de Suero Bovino.

**CaCO<sub>3</sub>:** Carbonato de Calcio.

**CTT:** Cloruro de 2,3,5-Trifenil Tetrazolio.

**Cys:** Cisteína.

**DH:** Hydrolysis Degree.

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

**DS:** Desviación Estándar.

**E/S:** Enzima/Sustrato.

**EC<sub>50</sub>:** Concentración de una sustancia en un medio que se espera que produzca un cierto efecto en el 50% de los organismos testeados de una población bajo ciertas condiciones.

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético.

**FAOSTAT:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, División de Estadística.

**FRAP:** Potencia de actividad reductora de Hierro.

**g:** ges o fuerza centrífuga relativa (RCF).

**Gln:** Acido Glutámico.

**Gly:** Glicina.

**GSH:** Glutación.

**GSSG:** Glutación Oxidado.

**H<sub>2</sub>Od:** Agua Destilada.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Acido Sulfúrico.

**HC:** Hidratos de Carbono.

**His:** Histidina.

**HPTCH:** Hidrolizados Proteicos de Tallos de Champiñón.

**HPTCH<sub>A</sub>:** Hidrolizado Proteico de Tallos de Champiñón con Alcalasa.

**HPTCH<sub>A+F</sub>:** Hidrolizado Proteico de Tallos de Champiñón con Alcalasa+Flavourzyme.

**HPTCH<sub>F</sub>:** Hidrolizado Proteico de Tallos de Champiñón con Flavourzyme.

**HPTCH<sub>LA450</sub>:** Hidrolizado Proteico de Tallos de Champiñón con Bioproteasa LA-450.

**HPTCH<sub>LA450+F</sub>:** Hidrolizado Proteico de Tallos de Champiñón con Bioproteasa LA-450+Flavourzyme.

**HPTCH<sub>P</sub>:** Hidrolizado Proteico de Tallos de Champiñón con Papaína.

**HTCH:** Harina de Tallos de Champiñón.

**HTCH<sub>H2O</sub>:** Extracto acuoso de Harina de Tallos de Champiñón.

**Ile:** Isoleucina.

**ISTA:** International Seed Testing Association.

**JECFA:** Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios.

**K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Sulfato de Potasio.  
**KBr:** Bromuro de Potasio.  
**KCl:** Cloruro de Potasio.  
**kDa:** KiloDaltons.  
**LAPU/g:** Unidades Leucina  
Aminopectidasa/gramo.  
**LE:** Líquido de Escaldado.  
**LE10X:** Líquido de Escaldado  
Concentrado 10 Veces.  
**LE10X<sub>or</sub>:** Líquido de escaldado  
concentrado 10 veces por ósmosis  
inversa.  
**LE10X<sub>rv</sub>:** Líquido de escaldado  
concentrado 10 veces en Rotavapor.  
**LE1X:** Líquido de Escaldado  
concentrado una vez.  
**LE6X:** Líquido de Escaldado  
concentrado 6 veces.  
**Leu:** Leucina.  
**Lys:** Lisina.  
**mA:** Miliamperios.  
**meqv/g:** Miliequivalente/gramo.  
**Met:** Metionina.  
**MO:** Materia Orgánica.  
**N:** Nitrógeno.  
**nm:** nanómetros.  
**NaOCl:** Hipoclorito de Sodio.  
**NaOH:** Hidróxido de Sodio.  
**N<sub>t</sub>:** Nitrógeno Total.  
**OMS:** Organización Mundial de la  
Salud.  
**PAGE:** Polyacrilamide gel  
electroporesis.  
**PM:** Peso Molecular.  
**p.s.:** Peso Seco.  
**p/v:** Peso/Volumen.  
**Phe:** Fenilalanina.  
**Pro:** Prolina.

**rpm:** revoluciones por minuto.  
**SDS:** Dodecilsulfato Sódico.  
**Ser:** Serina.  
**TCA:** Ácido Tícloroacético.  
**TCH:** Tallo de Champiñón  
**TEMED:** Tetrametiletildimina.  
**Thr:** Treonina.  
**Tm:** Toneladas métricas.  
**Trp:** Triptófano.  
**Tyr:** Tirosina.  
**UA/g:** Unidades Anson/gramo.  
**U<sub>Absorbancia</sub>:** Unidades de Absorbancia.  
**UV:** Luz Ultravioleta.  
**v/v:** Volumen/Volumen.  
**Val:** Valina.





# **TESIS DOCTORAL RESUMEN**





- **RESUMEN**

La producción de setas comestibles en España, destinadas al consumo en fresco o en forma de conservas, representa entre el 7 y el 8% de la producción mundial, estimada para el año 2017 en 10.317.092 Tm. Este gran volumen de producto genera entre el 25 y el 30% de subproductos, constituido fundamentalmente por tallos y setas no comercializables, que o no se usan o mal usan, dando lugar al sistema denominado sistema lineal que se basa en la extracción de materia prima, la producción de bienes, el consumo y la generación de residuos, y como consecuencia de ello la destrucción/contaminación del medioambiente, es por ello que actualmente se está intentando cambiar este sistema de producción y consumo, adaptándolo al nuevo sistema de economía circular, el cual está enfocado hacia un sistema regenerativo desde su diseño, para mantener el valor de los recursos (materiales, agua, suelo y energía), de los productos y limitando los insumos de materias primas y energía, evitando, en lo posible, al máximo, la acumulación de residuos y sus impactos negativos sobre el medioambiente, el clima y la salud humana.

Por lo que en el presente trabajo nos hemos centrado en la revaloración de los subproductos provenientes de la industria de setas y hongos comestibles, concretamente del champiñón (*Agaricus bisporus*) como materia prima valorizable para la obtención de productos de alto valor para varias industrias: medico-farmacéutica, alimentaria, cosmética, química, agronómica, etc., y contribuir a la mejora y protección del medioambiente, a través de un sistema de economía circular.

La industria de las setas y hongos comestibles, generan tres tipos de subproductos: i) el compost agotado, ii) los tallos y piezas no comercializables, y iii) el líquido de escaldado en el caso de las conservas. En el presente trabajo nos hemos centrado en la revalorización de los dos últimos: tallos y elementos no comercializables, y líquido de escaldado. Tanto los tallos como el líquido de escaldado, debido a su composición [23-32% p.s., en proteínas, 65-72%, p.s., en carbohidratos, y diversas sustancias beneficiosas para la salud como ergotioneina, ergosterol (precursor de la vitamina-D2), péptidos antioxidantes, etc.], pueden constituir unas excelentes fuentes de partida para la obtención de diferentes productos potencialmente utilizables en la industria médico-farmacéutica y alimentaria como nutracéuticos, en la industria cosmética como nutricosméticos o en agronomía como biofertilizantes, e incluso pueden constituir una excelente fuente para fines biotecnológicos, tales como fuente de fermentación para la producción de quitinasas, o fuente de partida para la obtención de nano-quitina, siempre y cuando se desarrollen los procesos adecuados.

Por lo que los objetivos del presente trabajo han sido:

1. Preparación y caracterización de diferentes hidrolizados de las proteínas presentes en los subproductos del champiñón.
2. Diseño general de procesos biotecnológicos encaminados a la revalorización de subproductos derivados de la industria agroalimentaria.
3. Preparación de hidrolizados proteicos de la harina de tallos de champiñón.

4. Caracterización de los hidrolizados proteicos.
  - Caracterización electroforética
  - Caracterización cromatográfica
  - Composición aminoacídica
  
5. Estudio de las actividades biológicas
  - Actividad Antioxidante (Industria Nutraceutica)
  - Actividad Antidiabética (Industria Nutraceutica)
  - Inhibición de la actividad tirosinasa (Industria Alimentaria)
  
6. Aplicaciones
  - En la industria agronómica (como biofertilizante).

Para utilizar estos subproductos de una manera efectiva, es necesario, en una primera etapa estabilizarlos en una forma fácilmente almacenable y segura, por lo que los tallos y piezas no comercializables de champiñón se ha estabilizado preparando una harina de tallo de champiñón (HTCH), mediante el secado con aire caliente (50 °C) y molino para obtener un polvo fino al que hemos almacenado en bolsas de plástico herméticamente cerradas, a 18 - 20 °C en almacén, permaneciendo de esta manera estable al menos durante un año. El líquido de escaldado que representa un gran volumen, del orden de los 10.000 litros al día para una planta de tamaño pequeño/medio, y que habitualmente se vierte directamente a la red o a balsas para depuración, debido al elevado volumen es necesario reducirlo, lo que se logra mediante su concentración al vacío y a temperatura entre 65-70 °C, o mejor aún mediante osmosis inversa para evitar, en lo posible, la formación de productos de Amadori, obteniéndose un líquido de escaldado concentrado unas 10 veces (LE10X) donde los

componentes están concentrados y es fácilmente almacenable a 4 °C, en cámara fría, durante al menos 3 meses. Una vez estabilizados estos subproductos se ha procedido a la obtención de productos de alto valor añadido como:

La obtención de hidrolizados a partir de la HTCH para ello se prepararon mediante hidrólisis enzimática. El 10% de HTCH resuspendido en agua y se ha hidrolizado en un pH-stat con control de pH, temperatura y agitación, utilizando una relación de E/S de 0.3%, con cuatro enzimas diferentes: Alcalase®, Flavourzyme®, Papaína y Bioprotease LA-450, obteniendo hidrolizados, que debido a su composición ricos en aminoácidos, oligopéptidos y péptidos potencialmente utilizables como biofertilizantes en agronomía, o como nutracéuticos en alimentación o en cosmética. Las endoenzimas, procedentes de *Bacillus licheniformis*: Alcalase® y Bioprotease LA-450, son las que mayor cantidad de producto solubilizan,  $41,7\pm 3,0\%$  y  $46,3\pm 3,6\%$ , respectivamente, mientras que la Papaína y la Flavourzyme®, mezcla predominante de exoproteasas bacterianas, presentan un rendimiento solubilizador más bajo,  $26,3\pm 2,3\%$  y  $23,0\pm 1,7\%$ , respectivamente. Con el fin de incrementar, en lo posible, el grado de hidrólisis, y por tanto la cantidad de material solubilizado se procedió a la realización de hidrólisis secuenciales, utilizando primero una endoproteasa y seguidamente una exoproteasa. Las hidrólisis secuenciales realizadas han sido las siguientes dos combinaciones: “Alcalase® + Flavourzyme®” y “Bioprotease LA-450 + Flavourzyme®”,  $79,6\pm 2,9\%$  y  $81,4\pm 3,3\%$ , respectivamente.

Para obtener información más detallada sobre la distribución del tamaño de las proteínas, péptidos, oligopéptidos y aminoácidos presentes en los hidrolizados, se procedió a su estudio por cromatografía de exclusión molecular

en una columna Superdex™peptide 10/300 GL, que tiene un rango de resolución de 7000 a 100 kDa, los mayores porcentajes de dipéptidos y aminoácidos libres se encuentran para los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis secuencial con Alcalase®+Flavourzyme® y Bioproteasa+Flavourzyme®, 42,13% - 37,94% respectivamente.

El análisis aminoacídico muestra el contenido de los diferentes aminoácidos presentes en el hidrolizado obteniéndose que los mayores contenidos en AAH están presentes en HPTCH<sub>LA450</sub>, mientras que la mayor concentración de AAsCP y AAsCN se obtienen en HPTCH<sub>A+F</sub>, el mayor contenido de AAA se obtiene en HPTCH<sub>A</sub> y el mayor contenido de AAes se encuentra en HPTCH<sub>LA450</sub>.

Estos resultados también muestran que la capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup> por los HPTCH depende del tipo de proteasa utilizado para la obtención de los hidrolizados en las hidrólisis simples, obteniéndose la mayor capacidad secuestradora (menor EC<sub>50</sub>) cuando se utiliza la exoproteasa Flavourzyme® (EC<sub>50</sub> = 0,13±0,02 mg/mL), y cuando se utiliza en combinación de las endoproteasas Alcalase® y Bioproteasa L450 (0,15±0,05 y 0,14±0,04, respectivamente), no observándose diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las dos combinaciones estudiadas.

Estos resultados, al igual que para el radical ABTS<sup>•+</sup>, también muestran que la capacidad secuestradora del radical DPPH<sup>•</sup> de los HPTCH depende del tipo de proteasa utilizado en las hidrólisis simples, obteniéndose la mayor capacidad secuestradora (menor EC<sub>50</sub>) en el caso de utilizar la exoproteasa Flavourzyme® (EC<sub>50</sub> = 0,33±0,02 mg/mL). En el caso de las hidrólisis secuenciales, al igual que anteriormente, no se observan diferencias estadísticamente significativas

para ninguna de las dos combinaciones de endoproteasa + exoproteasa estudiadas, obteniéndose valor de  $EC_{50}$ ,  $0,47 \pm 0,05$  y  $0,44 \pm 0,06$  g/mL para HPTCH<sub>A+F</sub> y HPTCH<sub>LA450+F</sub>, muy similares al obtenido para la hidrólisis simple con la endoproteasa.

Los HPTCH muestran una ligera actividad inhibidora de las dos hidrolasas, puede reducir eficazmente la absorción de glucosa e inhibiendo el aumento de la concentración de glucosa sanguínea postprandial, como actividad antidiabética. No observándose diferencias estadísticamente significativas entre los distintos HPTCH y el HTCH<sub>H2O</sub>. Si bien, estas inhibiciones son significativamente muy inferiores a la observada para el control positivo (Acarbosa). Por lo que se puede concluir que los HPTCH no presentan ventaja alguna a la hora de intentar reducir los niveles postprandiales de glucosa. Nuestros resultados son contrarios a los reportados por otros autores que sí encuentran una inhibición apreciable de estas hidrolasas utilizando hidrolizados de otros hongos comestibles enriquecidos en selenio, por lo que la mejora de la actividad antidiabética de los hidrolizados de las proteínas de hongos enriquecidos en selenio podría atribuirse a la incorporación de selenio en los péptidos integrantes de los hidrolizados y a posibles cambios conformacionales de estos inducidos por el selenio, que favorecería la interacción con la  $\alpha$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -amilasa limitando su acción.

La inhibición de la actividad tirosinasa por los diferentes HPTCH, el HTCH<sub>H2O</sub> y un control positivo (ácido ascórbico). Todos los HPTCH inhiben claramente la actividad tirosinasa de una manera dosis dependiente, dentro del rango 0,5-3,0 mg/mL. Esta inhibición es mayor, estadísticamente significativa  $p < 0,05$ , que la presentada por el HTCH<sub>H2O</sub>, pero claramente menor que el

control positivo. A pesar de ello, a concentraciones del orden de 1,5 g/mL y mayores la inhibición es del orden del 40%.

Los HPTCH, debido a las actividades biológicas descritas serían claramente aplicables como nutracéuticas o complementos nutricionales en el tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, y en la industria alimentaria en la prevención de la oxidación de los alimentos evitando su deterioro y/o pardeamiento, estos hidrolizados, debido a su composición, también podrían encontrar aplicación en la agronomía moderna como biofertilizantes.

Una vez realizados estos ensayos de germinación se puede concluir que el LE al igual que los hidrolizados de la HTCH pueden ser utilizados como biofertilizantes. Pero al hacer la comparación entre estos dos, observamos que el LE preparado a concentraciones entre 5 y 10% es la mejor opción debido a que requiere de menos procesos y por lo tanto el costo es menor. Luego, teniendo en cuenta que estamos trabajando con un subproducto, esta sería una buena manera para su valorización, produciendo un producto de alto valor añadido, y contribuyendo al mantenimiento del medioambiente.

# **ABSTRACT**





- **ABSTRACT**

(Pendiente de Traducción)

# **INTRODUCCIÓN**



### 1. INTRODUCCIÓN

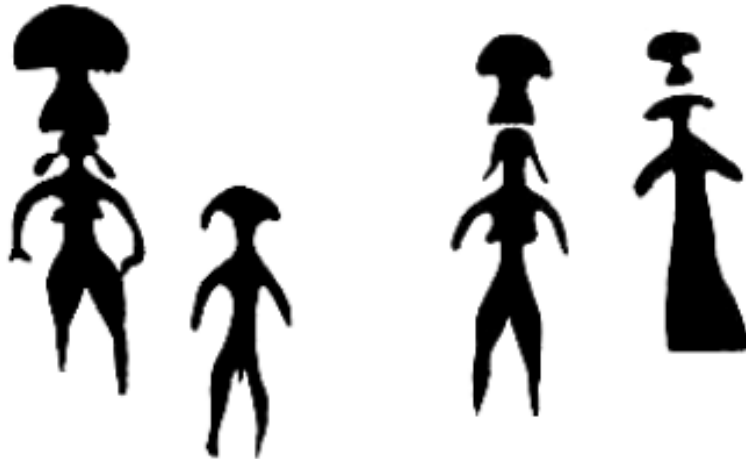
#### *1.1 Historia de los Hongos comestibles*

Los Hongos se definen como organismos vivos que se reproducen por esporas, con cuerpos fructíferos visibles que crecen en una variedad de ecosistemas y de gran importancia dentro del mantenimiento del medioambiente (**Miles y Chang, 1997; García y Sánchez, 2009**). Desde hace miles de años los seres humanos han utilizado los hongos como alimento y como medicina debido a las propiedades beneficiosas para la salud, de algunos de ellos (**Calonge, 2011**). Esto sigue siendo vigente hoy en día, donde los hongos además de seguir siendo utilizados como alimento, se contemplan como fuente de productos naturales tanto para la obtención de productos beneficiosos para la salud como de aplicación industrial (cosmética, agronomía, etc.) (**Boa, 2005**).

Actualmente se han descrito unas 80.000 especies de hongos, pero se estima que su existencia sea del orden de 1,5 millones (**Hawksworth, 2001**). De estas 80.000 especies se considera que unas 2000 son aptas para el consumo humano, y debido a sus propiedades unas 700 son de interés para la industria farmacéutica (**Chang y Wasser, 2012**).

En cuanto a la constatación del uso de los hongos por el hombre, diferentes expediciones arqueológicas han permitido encontrar restos de hongos dentro de la ropa del hombre primitivo, corroborando de esta manera que nuestros antepasados ya hacían uso de antibióticos naturales que se obtenían de los hongos (**Capasso, 1999; Campos y Arregui, 2014**). En zonas inhóspitas del planeta han sido encontrados un sin número de petroglifos que datan de miles de años de antigüedad, donde se puede observar figuras antropomorfas junto a

formas de hongos (ver Figura-I.1) (Wasson, 1957).



**Figura I.1** Petroglifos hallados en las orillas del río Pegtymel (Rusia). Los alucinógenos en el mito. Relatos sobre el origen de las plantas psicoactivas (Tomado de **Samorini y Zanarini, 2001**).

En Grecia también se han encontrado restos de la presencia de hongos así como de sus usos. Así Teofrasto en su famoso escrito “*Sistema Naturae*” da a conocer una clasificación de las plantas basada en propiedades médicas, que define a los hongos como plantas que no poseen raíces, hojas, flores y frutos. Mientras que Dioscórides Anazarbeo médico, farmacólogo y botánico, propone una clasificación entre “*Fungi esculenti*” y “*Fungi perniciosi*” (**González, 2002; Quer y Davit, 1962**). Sin embargo, es en la época de Roma cuando se empieza a conocer los hongos, a cómo utilizarlos y a la vez a como consumirlos, debido a que era muy común que los esclavos realizaran tareas de recolección de hongos por su exquisito sabor (**Edwards, 1984**). Plinio el Viejo considerado uno de los científicos naturalistas más prestigiosos de la época, en uno de sus escritos (**Historia natural, libros XII-XVI**), da a conocer cómo distinguir hongos comestibles de hongos venenosos. Por otro lado en el norte de Europa,

diferentes tribus hacían uso de hongos alucinógenos para sus ritos religiosos y fiestas (Fericgla y col., 2000; Samorini y Zanarini, 2001).

En la edad media las creencias populares y conocimientos de origen griego y romano fueron quedando atrás, mucho más con el paso al Renacimiento, donde la creación de la imprenta y los nuevos enfoques en el campo de la ciencia, permitieron el progreso y difusión de mayores conocimientos sobre los hongos. Así Johannes Franciscus Van Sterbeeck (1630-1693) sacerdote, botánico y boticario alemán, publicó su obra denominada "*Theatrum fungurum*", cuyo fin era la identificación de variedades comestibles de hongos (Mehrotra y Aneja, 1990). Fray Bernardino de Sahagún en su obra "*Los Códices Matritenses*" detalla la historia general de las cosas de la Nueva España (México) y de acuerdo a fragmentos del Popol Vuh y el Chilam Balam se sabe que en la cultura mesoamericana prehispánica los hongos eran considerados alimento de dioses y reyes, probablemente por su carácter alucinógeno, debido a que esa era la forma en que ellos creían que lograban comunicarse con sus divinidades (Tudela, 1952).



**Figura I.2** Escultura de barro en forma de hongo de origen precolombino (Lowi, 1974).

Carlos Linneo (1753), científico, naturalista, botánico y zoólogo sueco clasificó a los seres vivos, de acuerdo al nivel jerárquico según su género, especie, y las agrupó en familias, estas en clases y las clases en Reinos, y creó un Reino específico para los hongos, que posteriormente Whittaker lo denominaría “*Reino fungi*”. Durante el siglo XVII los hongos, pasaron de ser un alimento básico para los pobres a un alimento consumido por la nobleza. Anton van Leeuwenhoek, al perfeccionar la fabricación del microscopio, y al realizar varias observaciones, permitieron el conocimiento de los hongos microscópicos y el desarrollo de un estudio sistemático. Durante los siglos XVIII y XIX la Micología es considerada disciplina científica dedicada al estudio de los hongos, apareciendo sistemas de clasificación, clasificando los hongos en: *Basidiomycetos* y *Ascomycetos*. Se logra identificar las esporas y definir las. En 1801 Christiaan Hendrik Persoon botánico y micólogo sudafricano considerado el padre de la “micología sistemática” en su publicación “*Synopsis Methodica Fungorum*” agrupa a los hongos por géneros, es por esto que fue considerado como el libro de oro de su tiempo (Mehrotra y Aneja, 1990). Elias Magnus Fries (1794-1878) micólogo y botánico sueco, autor de varias publicaciones de las que destacan *Systema mycologicum* y *Elenchus fungorum* (1818-1828). Gracias a dichas publicaciones se le reconoce como el padre fundador de la taxonomía moderna de los hongos, siendo el primero en describir para su clasificación, el color de las esporas, junto al tipo de himenóforo: láminas, poros, pliegues y aguijones como principales características taxonómicas. Magnus Fries llegó a caracterizar alrededor de 2700 especies, por ello, y en su honor, a la hora de nombrar un hongo, éste suele iniciarse con las dos primeras letras de su apellido, “Fr” seguidas del nombre del género y especie (Deacon, 1990).



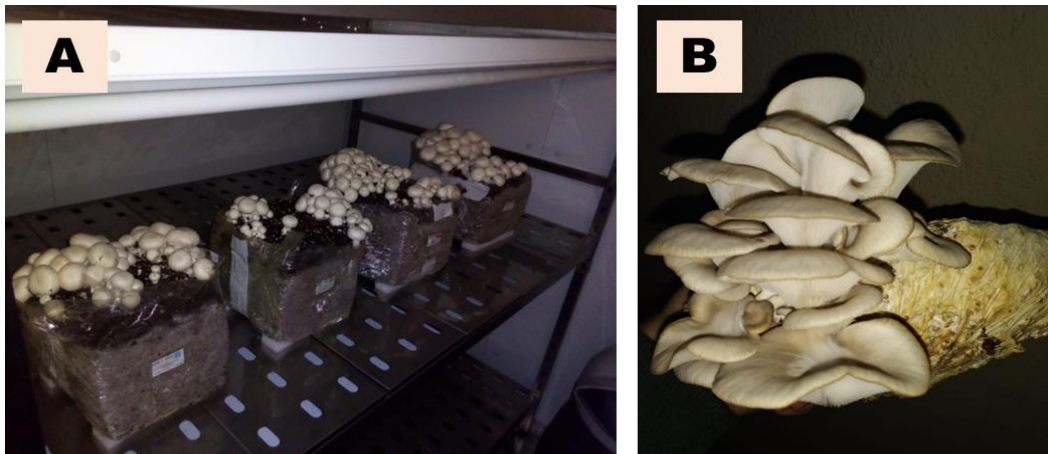
En el año 1969 Robert Harding Whittaker clasificó a los seres vivos en cinco reinos y a los hongos dentro del “*Reino fungi*”. Enminentes micólogos clasifican a especies mediante conceptos de toxicidad y eliminan creencias populares erróneas que permitían identificar un hongo comestible de un no comestible. Es a partir de aquí cuando comienza el estudio de principios activos provenientes de hongos con fines medicinales e industriales (Deacon, 1990).

### ***1.2 Cultivo de Hongos comestibles***

El cultivo de algunos hongos comestibles, viene desde aproximadamente 2 mil años atrás, se cree que fue en China donde se realizan los primeros cultivos de hongos (Boa, 2005).

Los hongos se distinguen por poseer un cuerpo fructífero lo suficientemente grande para ser visto a simple vista y ser recolectado a mano. La mayoría de hongos pertenecen a la clase *Basidiomycetes*, es decir hongos que producen basidiosporas, mientras que otros hongos son pertenecientes a la clase *Ascomycetes* es decir que poseen ascosporas (Chang y Miles, 1992).

Dentro de los hongos comestibles más populares tenemos *Agaricus bisporus* (*A. bisporus*), *Pleurotus ostreatus* (*P. ostreatus*), (ver Figura-I.3), siendo *A. bisporus* (Champiñón) el más ampliamente cultivado alrededor del mundo. *A. bisporus* representa del orden del 40% de la producción y consumo mundial de hongos y setas comestibles. Representando un negocio importante y de gran interés comercial, debido a su textura, sabor, aroma, valores nutricionales y últimamente efectos saludables tanto preventivos como curativos (Aguilera, 2003; McGee, 2018; Chang, 2005).



**Figura I.3** a) *Agaricus bisporus*; b) *Pleurotus ostreatus*.

El botánico inglés Mordecai Cubitt Cooke describió por primera vez a *A. bisporus* como una variedad de *Agaricus campestris*, posteriormente el micólogo Danés Jakob Emanuel Lange en 1926 la denominó *Psalliota hortensis* var. *bispora* (Lange, 1926). Schäffer y Møller 1939 la consideraron como una especie denominándola *Psalliota bispora* (Schäffer y Møller, 1939).

En 1946 el género *Psalliota* fue renombrado como *Agaricus*, hasta hoy, en que es conocido como *A. bisporus* nombrado así por Emil Imbach (Cappelli, 1984). Con lo que la clasificación de *Agaricus bisporus* es como sigue:

**Reino:** Fungi

**División:** Basidiomycota

**Clase:** Agaricomycetes

**Subclase:** Agaricomycetidae

**Orden:** Agaricales

**Familia:** Agaricaceae

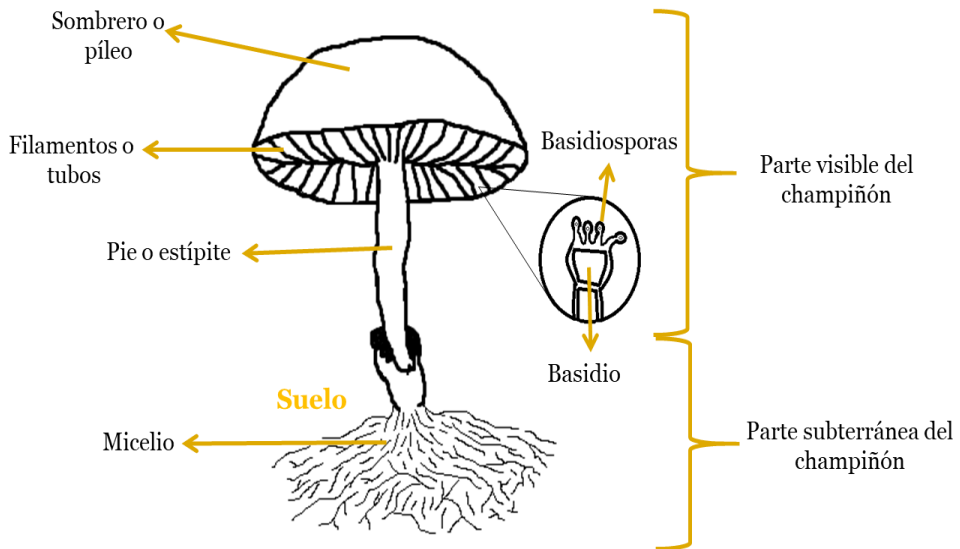
**Género:** *Agaricus*

**Especie:** *Agaricus bisporus* (Lange, 1926; Imbach, 1946).

En cuanto a las actividades metabólicas *A. bisporus* (champiñón) éstas son diferentes de las de los vegetales superiores, no puede realizar la fotosíntesis como las plantas ya que *A. bisporus* carece de clorofila, y al ser un organismo saprofito necesita nutrirse de un medio adecuado, denominado genéricamente compost (**Vedder, 1996; Basso, 1980**).

Como se observa en la Figura-I.4, en la morfología de *A. bisporus* podemos distinguir 4 partes principales, el sombrero, el estípite, los filamentos y el micelio.

El sombrero o píleo es la parte redondeada, en forma de globo y carnosa del hongo. Éste puede llegar a medir de 1,6 a 15 centímetros de ancho/diámetro. El himenio o filamentos, en hongos del género *Agaricus bisporus*, se encuentra desde la parte inferior del sombrero, otros autores también lo denominan laminillas. Estas laminillas en un principio son de color rosado que con el paso del tiempo se tornan de color pardo e incluso algunas veces de color negro. El pie o estípite es la parte en forma cilíndrica que sostiene al sombrero, es liso, blanco y se encuentra unido tanto al micelio como a los filamentos. El micelio es la parte adentrada en el sustrato o compost, conformada por un sistema de hilos y ramificaciones capaces de producir el hongo en condiciones óptimas (**Atkins, 1964; Chang, 2008**).



**Figura I.4** Diferentes partes del hongo.

En el desarrollo de *A. bisporus* pueden observarse varias etapas: etapa juvenil o de primordio, etapa adulta y etapa senescente.

En la **etapa juvenil** o de primordio, el sombrero se encuentra cerrado y las laminillas no son visibles, es la etapa preferida para su comercialización en forma de conserva o salmuera, ya sea entero o laminado. En la **etapa adulta** el sombrero está abierto y las laminillas son visibles, estos hongos tras ser troceado, posteriormente son sometidos a un tratamiento de deshidratación para su comercialización. Y finalmente en la **etapa senescente** el hongo ha alcanzado su mayor punto de maduración, el sombrero está completamente abierto y las laminillas también, perdiendo su característica física y su valor comercial (**Donoso, 1989**).

El champiñón al ser un organismo heterótrofo y a la vez saprofito, necesita de medio de crecimiento adecuado. A este medio se le denomina sustrato o

compost, que está formado por diferentes materias primas mezcladas, humectadas y fermentadas, que tiene como finalidad lograr extraer el máximo de nutrientes, entre éstos carbohidratos, proteínas, y minerales que van a ser utilizados por el champiñón para su desarrollo. Dicho sustrato necesita poseer ciertas condiciones, así debe contener una humedad entre el 62 y el 68% durante su crecimiento, ya que esto influye directamente sobre la aireación del sustrato, y la mayor parte de la humedad del champiñón es proveniente del agua contenido en el sustrato (**López Contini, 1990; Toovey, 1963; Vedder, 1978**), el pH debe ser ligeramente básico, entre 7 y 8. Otra condición es la temperatura, ya que ésta permitirá el óptimo crecimiento y por tanto un mejor rendimiento. Se considera que la temperatura adecuada para el desarrollo del champiñón se encuentra en el intervalo de 22 a 30 °C, si la temperatura supera los 35 °C se detiene el desarrollo (**Vedder, 1978**).

*A. bisporus* (Champiñón) se encuentra entre los hongos comestibles más populares en el mundo, se cultiva en más de 70 países, ya que son considerados altamente nutritivos. Conteniendo minerales, vitaminas, fibra, gran cantidad de proteína y entre el 5-15% de materia seca. Además son bajos en calorías debido a que contienen carbohidratos digeribles y una baja cantidad de grasa (**Mattila y col., 2002**).

**Tabla I.1** Composición básica de *Agaricus bisporus* (Tomado de **Reis y col., 2012**)

Componente	Contenido
Humedad	90 - 93%
Materia seca	7 - 10%
Cenizas	8,5 - 9,7%
Proteína	21,1 - 32,5%
Carbohidratos	65,4 - 74,0%
Grasa cruda	2,2 - 3,5%
Fibra	17,5 - 23,1%
Ergotioneina	0,20 - 0,31 mg/g
Polifenoles	3,7 - 4,1 mg/g
Ergosterol	4,3 - 6,4 mg/g

El análisis de la composición básica de *A. bisporus* indica un alto contenido de proteínas (21,1 - 32,5%, p.s.), alto contenido de carbohidratos (65,4 - 74%, p.s.), bajo contenido de grasa (2,2 - 3,5%, p.s.), alto contenido de fibra cruda (17,5 - 23,1%, p.s.), y humedad (90 - 93% p.s.). Además, *A. bisporus* es rico en otros componentes beneficiosos para la salud, como ergotioneina, ergosterol (pre-vitamina-D2), polifenoles, vitaminas y minerales (**Barros y col., 2008; Cremades y col., 2012; Cremades y col., 2015**).

Debido al alto contenido de proteínas, el champiñón es un buen sustrato para la preparación de concentrados y aislados proteicos, que podrían representar una alternativa eficiente para la sustitución de proteínas animales en la dieta del hombre y en la alimentación animal (**Salas y Drager, 1981**), pero debido a que las proteínas de *A. bisporus*, y otros hongos, están, en su mayoría,

unidas a hidratos de carbono, su solubilidad y digestibilidad es baja (**Lebeque y col., 2018**). Por ello su solubilización podría contribuir a una mejora de la calidad y funcionabilidad de estas proteínas. Así, su hidrólisis, obteniendo hidrolizados proteicos, mejoraría significativamente su solubilidad y digestibilidad.

Por otro lado, estos hidrolizados debido a su alto contenido proteico (péptidos y aminoácidos) constituyen un producto de gran interés, no solo nutricional si no también industrial (médico-farmacéutica, cosmética y agronómica).

En cuanto a los componentes beneficiosos para la salud, objeto del interés de la industria médico-farmacéutica cabe señalar, que se han descrito la presencia de componentes en *A. bisporus* con propiedades antimicrobiana, antitumoral, anticancerígeno, antioxidante, antiinflamatoria, hipocolesterolémicas, antidiabéticas, inmunosupresoras, antialérgicas, antivirales y hepatoprotectoras, lo que podría ser de interés para tratar diferentes enfermedades crónicas, como el cáncer, la diabetes, enfermedades hepáticas, etc. (**Özçelik y Pekşen, 2007; Xu y col., 2012**).

Es por todo esto que el cultivo de *A. bisporus* (champiñón) es muy importante si se quiere aprovechar todas sus ventajas y riquezas nutricionales-culinarias, medicinales y funcionales, que a su vez pueden ser explotadas por un número importante de industrias, como químico-farmacéuticas, medico-farmacéuticas, cosméticas, agrícolas y ambientales (**Chang y Buswell, 1996; Gopalakrishnan y col., 2003**).

El cultivo de champiñón en general ha experimentado una evolución desde sus inicios hasta el día de hoy, es por eso necesario, aunque sólo sea de manera breve, precisar los distintos procesos para su producción. El champiñón se cultivó por primera vez de casualidad y se hace mención a unos franceses quienes vieron que los champiñones crecían sobre el estiércol acumulado donde se vertían residuos de otras especies de hongos silvestres y el agua con la que se lavaban estos (Steineck, 1972; Vedder, 1978). El cultivo al principio siempre fue al aire libre, pero a finales del siglo XVIII se los realizaba en bodegas y minas donde se pudo obtener mejores resultados. Poco a poco se fue extendiendo el cultivo del champiñón desde París a otras ciudades de Francia y América (Atkins, 1964). Se dice que el micelio del hongo probablemente se obtuvo de caminos y pastizales con estiércol de caballo, pero este champiñón en un principio era capaz de propagar enfermedades debido a que el compost no era tratado adecuadamente y podía contener otro tipo de bacterias (Quintard, 1977; López Contini, 1990). Posteriormente se logró obtener cultivos puros libres de microorganismos, a partir de tejidos y esporas del hongo, que luego se multiplicaría en estiércol esterilizado obteniendo de esta forma una manera exitosa de cultivo de champiñón (Fernández, 2005).

### 1.2.1 Diferentes sistemas de cultivo

Actualmente el cultivo de champiñón está completamente mecanizado y automatizado. Desarrollándose el proceso en grandes naves que contienen diversas cámaras con control de temperatura, humedad, aireación, niveles de CO<sub>2</sub>, y asepsia, cuyos parámetros varían según la etapa de desarrollo del champiñón (siembra, desarrollo miceliar, fructificación y cosecha). Si bien cada gran fabricante mantiene en secreto las condiciones exactas de su cultivo y



composición del compost, básicamente el cultivo de champiñón se lleva a cabo de acuerdo con alguno de los tres sistemas de cultivo siguientes: francés, holandés o americano.

### - *Sistema francés*

A este sistema se lo conoce como sistema de bolsa plástica, es el más utilizado debido a que es más práctico y no requiere de tanta inversión (**Fletcher y col., 1991**). Con este tipo de sistema la producción del champiñón disminuye debido al espacio existente entre una bolsa y otra, pero a pesar de ello se obtiene mayor cantidad de cosecha ya que existe más cantidad de compost en cada bolsa lo que es beneficioso para el desarrollo del champiñón (**Salas y Drager, 1981**). Además las bolsas son desechadas una vez realizada la cosecha, lo que significaría un ahorro en el tiempo y costo que se destina para la desinfección del lugar de producción (**Quintard, 1977**).

### - *Sistema holandés*

Este sistema fue creado en Holanda, país que actualmente tiene la mejor tecnología para la producción de champiñón, este sistema es conocido como sistema de bandejas (**Fernández, 2005**). En este sistema las bandejas son armadas al momento de realizar la siembra, luego de la cosecha estas son vaciadas y desinfectadas al igual que el lugar donde se realizó el cultivo (**Toovey, 1987**).

### - *Sistema americano*

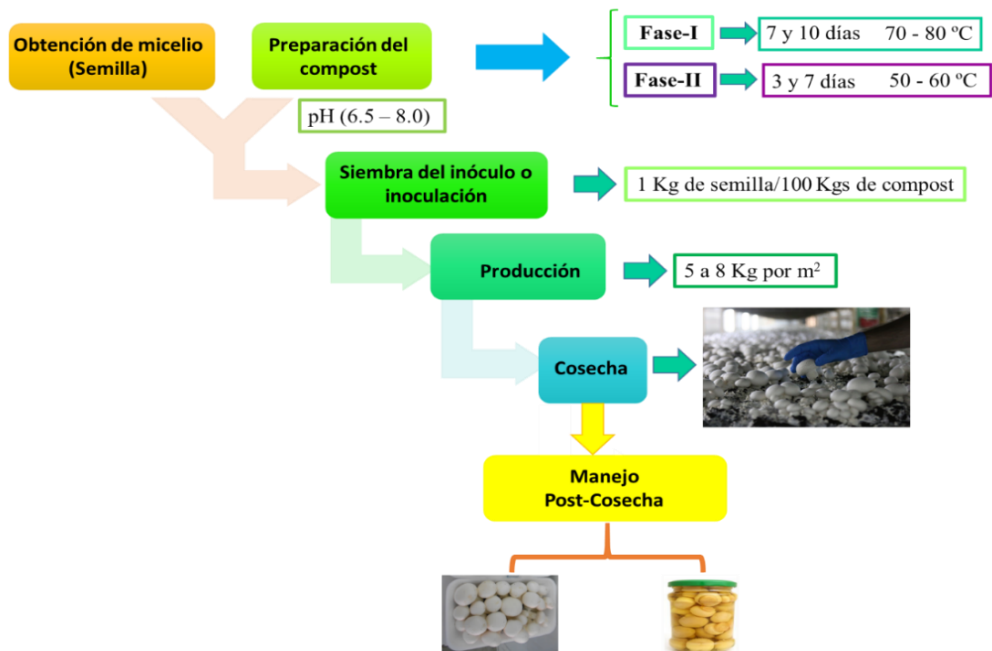
Este sistema es utilizado comúnmente en Estados Unidos, también se lo

conoce como “sistema de camas” la característica principal de este sistema es el empleo de un tipo de base de cama de madera invertida donde se coloca el compost. El peso promedio de cada cama va entre los 250 y 280 kilogramos, por lo que es necesaria la utilización de montacargas para el transporte hasta el cuarto de producción (**Fernández, 2005**).

Si bien, actualmente el cultivo del champiñón se realiza de manera híbrida, utilizando los mejores procedimientos de cada sistema, guardando cada productor como secreto de fabricación sus modificaciones.

### 1.2.2 Cultivo del champiñón

El cultivo y explotación de *A. bisporus* comprende varias fases, tal y como se muestra resumidamente en la Figura-I.5.



**Figura I.5** Fases del proceso de producción de *A. bisporus* (champiñón).

### - *Obtención de micelio (semilla)*

Para llevar a cabo la producción de champiñones lo primero que necesitamos es tener el micelio apropiado. Por ello el primer paso lo constituye la obtención de micelio puro. Una vez logrado el cultivo puro del hongo, se le replica en semillas esterilizadas (generalmente sorgo o trigo) (**Khanna, 2003**). Brevemente, los granos se hierven durante unos veinte minutos (1 Kg en 1,5 L de agua), se escurren y mezclan con  $\text{CaCO}_3$  y yeso (3,5 g y 13 g respectivamente por cada Kg de grano cocido), se ponen en frascos de 1 ó 2 L y se esterilizan en autoclave (121 °C, 20 min). Una vez fríos, en cabina de flujo laminar, se inoculan estérilmente con micelio puro y se incuban a unos 25 °C hasta que todo el contenido del frasco se ha invadido por el mismo. Para mantener los granos separados se agitan con frecuencia los frascos (diariamente, p. ej.). El micelio así crecido o semilla se puede mantener a 4 °C, durante 1 ó 2 meses.

### - *Preparación del compost*

Una vez que se dispone de la semilla, es necesario disponer de un medio de cultivo adecuado, el compost. La obtención de este sustrato o medio adecuado es una de las fases más críticas en la producción de champiñón. Tradicionalmente se prepara a partir de paja de trigo y estiércol de caballo, pero se pueden usar también otros residuos, generalmente, agroindustriales (**Colmenares-Cruz y col., 2017**). Debido al bajo contenido en N de estos sustratos lignocelulósicos, se agrega un suplemento rico en N con el fin de alcanzar unos niveles del 2 al 2,5% de nitrógeno. Además como la paja de trigo, y otros medios lignocelulósicos, son deficientes en potasio (K) se añade KCl o  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Para mejorar la textura final del compost y evitar la compactación se

añade yeso que contribuye a mantener el pH (6,5 - 8,0) (Beyer, 2017).

El objetivo del compostado o compostaje es la transformación selectiva de un sustrato no específico en uno altamente selectivo conveniente para la proliferación o desarrollo de *A. bisporus* y otros agárlicos. El proceso se divide en dos fases:

La **Fase-I** del compostaje tiene lugar al aire libre, o bajo un techo/cobertizo para protegerlo de la lluvia, en largas pilas de aproximadamente un metro de alto y dos de ancho. Durante esta fase que dura entre 7 y 10 días, se produce la termogénesis microbiana alcanzando una temperatura interna de 70 - 80 °C. Las condiciones aeróbicas se mantienen volteando el compost a intervalos regulares. La importancia de esta primera fase es lograr que el sustrato sea inadecuado para el crecimiento de mohos que podrían afectar a la producción del champiñón (Beyer, 2017). La cantidad de agua añadida debe ser tal que humedezca el material en compostaje, pero que no escurra líquido al tomarlo en la mano (Toovey, 1987).

La **Fase-II** del compostaje ocurre dentro de un recinto techado. El compost es colocado en cajones, en capas de 15 a 20 cm de altura, y se apilan dejando huecos entre ellos para permitir el paso y liberación de los gases. Durante esta fase continúa la actividad microbiana, alcanzándose temperaturas de 50 - 60 °C, con una adecuada ventilación. Esta fase dura de 3 a 7 días, y durante ella se producen nutrientes por la actividad microbiana, especialmente proteínas, y se eliminan los restos de amonio y/o aminos producidos durante la primera fase (Beyer, 2017). Durante el compostado se pasteuriza el interior del compost matando esporas fúngicas, ácaros, insectos, y nematodos. La

temperatura del compost en la segunda fase no debe pasar de los 60 °C (**Toovey, 1987**).

### - *Siembra del inóculo (inoculación)*

Una vez disponible la semilla y preparado el compost, el siguiente paso es la siembra o inoculación del mismo. Para ello una vez crecido el micelio sobre granos esterilizados, éstos se mezclan con el compost (1 Kg de semilla/100 Kg de compost) (**Beyer, 2017**) y se dejan desarrollar, como seguidamente describiremos.

### - *Producción*

Durante el primer periodo o periodo de crecimiento invasivo el micelio del inóculo invade el compost, la temperatura de las cámaras de cultivo se mantienen a 21 - 28 °C. Cuando el micelio coloniza todo el sustrato, tras unos 10 - 12 días, éste se cubre con una capa delgada de turba (tierra de cobertura) sin esterilizar mezclada con tiza (pH 7 - 8) para evitar la desecación (**Beyer, 2017**) y la temperatura ambiente se reduce a 18 °C. Cuando aparecen los primeros botones de *A. bisporus*, se baja a 15 °C. La humedad del ambiente se mantiene por encima del 70% (**Toovey, 1987**). Las bacterias de la turba liberan iones ferrosos esenciales para el desarrollo de los basidiomicetos (**Beyer, 2017**). Durante el periodo de crecimiento/ desarrollo del micelio se requiere una buena aireación de la cámara de cultivo (de 1 a 2 veces por día), pero tras la adición de la tierra de cobertura (turba) la aireación ha de ser mucho mayor (de 2 a 3 veces por hora), para evitar la concentración de CO<sub>2</sub>, ya que una concentración de CO<sub>2</sub> del 1% provoca la deformación de los champiñones (**Toovey, 1987**). Para que la aireación sea eficiente, el aire ha de pasar sobre las bateas de cultivo a una

velocidad de 100 - 250 mm<sup>3</sup>/min.

Además el micelio que está creciendo produce metabolitos volátiles tales como etanol, aldehído acético, acetato de etilo y dióxido de carbono (**Beyer, 2017**). Para mantener la humedad se riega con frecuencia mediante un rociado de niebla sin empapar la tierra de cobertura.

Los primeros basidiomas o cuerpos fructíferos se recogen a los 15 - 25 días después de la adición de la tierra de cobertura. La producción depende de numerosos factores y oscila de 5 a 8 Kg por m<sup>2</sup> y la conversión biológica es del orden de 50 Kg de champiñones frescos por 100 Kg de paja seca (**Colmenares-Cruz y col., 2017**). El periodo de cosecha es de unas seis semanas, al final del cual se vacían las bandejas o bateas y el compost usado (compost agotado) se desecha destruyéndose o utilizándose como abono en el campo (**Toovey, 1987**). Sin embargo, actualmente este subproducto ha despertado un gran interés entre los investigadores, ya que constituye, potencialmente, una importante fuente para la obtención de biofertilizantes y enzimas hidrolíticas (celulasas, hemicelulasas, lacasas, etc.) (**Schimpf y Schulz, 2016**).

Esquemáticamente el cultivo y producción de champiñón podemos resumirlo en la siguiente Tabla.

**Tabla I.2** Condiciones ambientales de las cámaras de cultivo del champiñón.

<b>Fase del cultivo</b>	<b>Duración</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Humedad</b>	<b>Ventilación</b>
<b>Desarrollo del micelio</b>	10 - 12 días	21 – 24 °C	70 – 85 %	Escasa
<b>Cobertura</b>	15 - 25 días	18 °C	70 – 85 %	Media
<b>1ª Floración</b>		13 – 15 °C	70 – 85 %	Intensa
<b>2ª Floración</b>		13 – 15 °C	70 – 85 %	Intensa
<b>3ª Floración</b>		13 – 15 °C	70 – 85 %	Intensa

- *Cosecha*

Para la cosecha del champiñón se tienen en cuenta varios aspectos, tales como la madurez, la calidad y el tamaño, ya que estos tres aspectos son de una gran importancia para el consumidor. El champiñón se cosecha bien manualmente o mecánicamente mediante el uso de rodillos de espuma que no dañen el sombrero. Una vez separados del compost se corta la parte del tallo próxima a la raíz, procurando que esté lo más limpio posible (**Sánchez y Royse, 2001**).

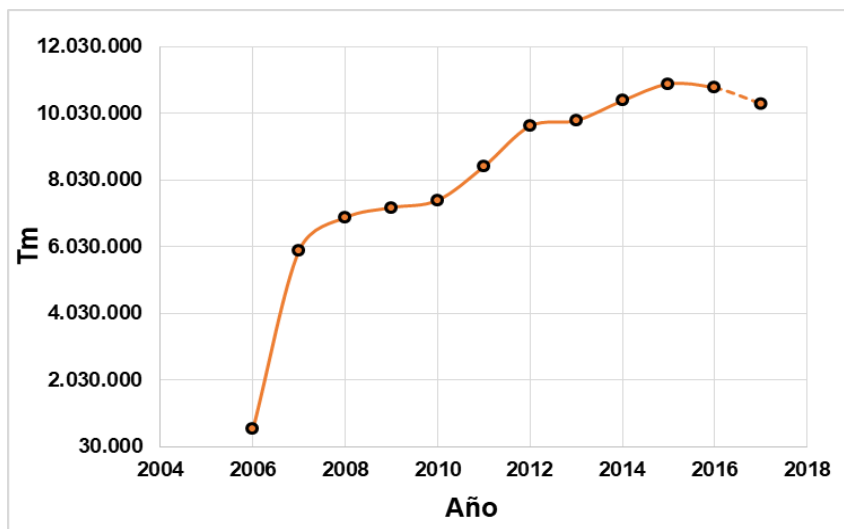
- *Manejo Post-Cosecha*

Una vez cosechados los champiñones se mantienen en cadena de frío (refrigeración de 2 - 4 °C) hasta ser derivados para su consumo en fresco o procesados a conserva (**García y Muñoz, 2002**). Esta fase, debido a la labilidad del producto, no suele prolongarse en el tiempo más de dos días. Y actualmente,

el alargamiento de la vida media del champiñón fresco, es otra línea de gran interés en este campo, por el gran beneficio económico que podría aportar.

### 1.3 Interés Económico del cultivo de hongos comestibles

El cultivo de champiñón en España comenzó a principio de los años cincuenta de forma artesanal, en cuevas y bodegas en la Rioja. Aunque actualmente se cultiva prácticamente en toda España, su producción se concentra en dos grandes zonas, donde se produce más del 80% de la producción nacional, La Rioja y La Manchuela (Castilla-La Mancha) (Información suministrada por Grupo Riberebro).

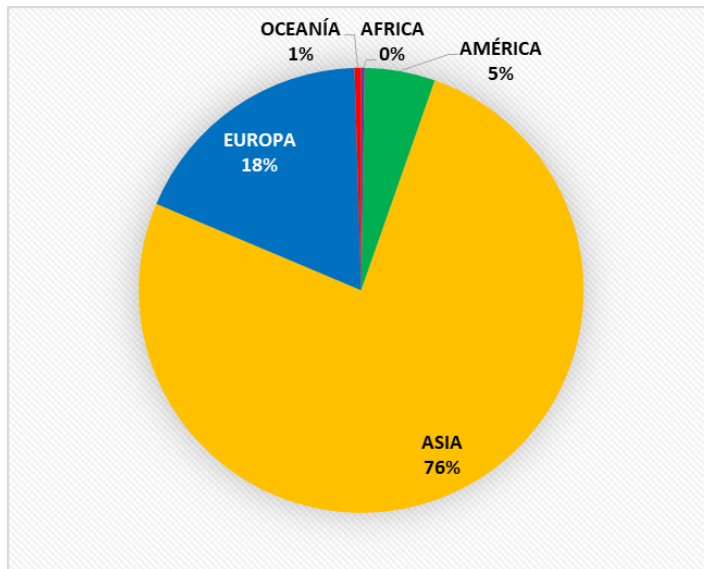


**Figura I.6** Producción de Hongos y Setas comestibles a nivel mundial. (Adaptado de datos FAOSTAT, 2016).



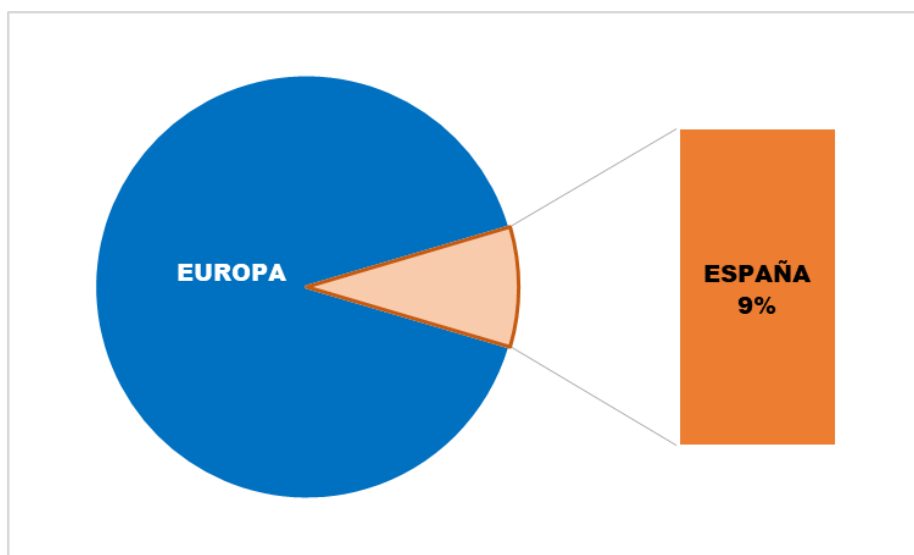
El consumo de hongos y setas comestibles en la última década ha ido en aumento, todo esto debido a nuevos hábitos alimenticios cada vez más saludables y naturales, se prevé que para los próximos años siga esta tendencia.

Los datos obtenidos de la FAO nos indican que la producción de hongos y setas comestibles a nivel mundial en el año 2016 fue de 10.790.859 Tm. De estos el mayor productor es Asia con un 76% de producción seguido por Europa que produce el 18%, América con un 5%, Oceanía y África con menos del 1%.

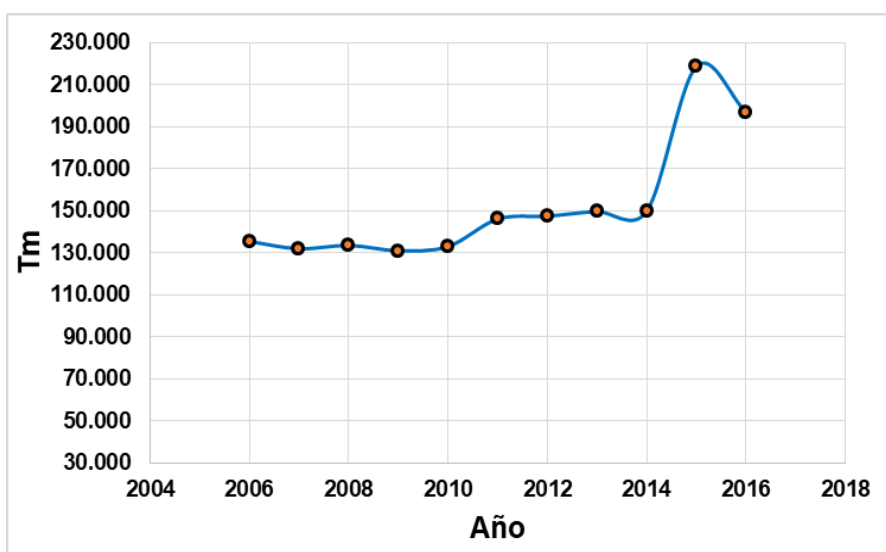


**Figura I.7** Producción de Hongos y setas comestibles por continentes en el 2016. (Adaptado de datos FAOSTAT, 2016).

De la producción total de Europa el 9% corresponde a la producción de hongos y setas comestibles en España siendo en el 2016 de 197.010 Tm



**Figura I.8** Producción de hongos y setas comestibles en Europa en el 2016. (Adaptado de datos FAOSTAT, 2016).



**Figura I.9** Producción de hongos y setas comestibles en España. (Adaptado de datos FAOSTAT, 2016).

De igual manera se puede observar que en los últimos años la producción de hongos y setas comestibles ha aumentado en un 68.73% aproximadamente (FAO, 2018a; FAO, 2018b).

En España el máximo productor y líder en cuanto al champiñón es La Rioja. Esta posee 215 hectáreas del total de 497 hectáreas que son dedicadas al cultivo del champiñón (Ministerio de Agricultura, 2014).

A nivel mundial los hongos comestibles se comercializan en diversas formas, pero el mercado de hongos comestibles basado en su consumo nos lleva a dos formas principales de comercialización.

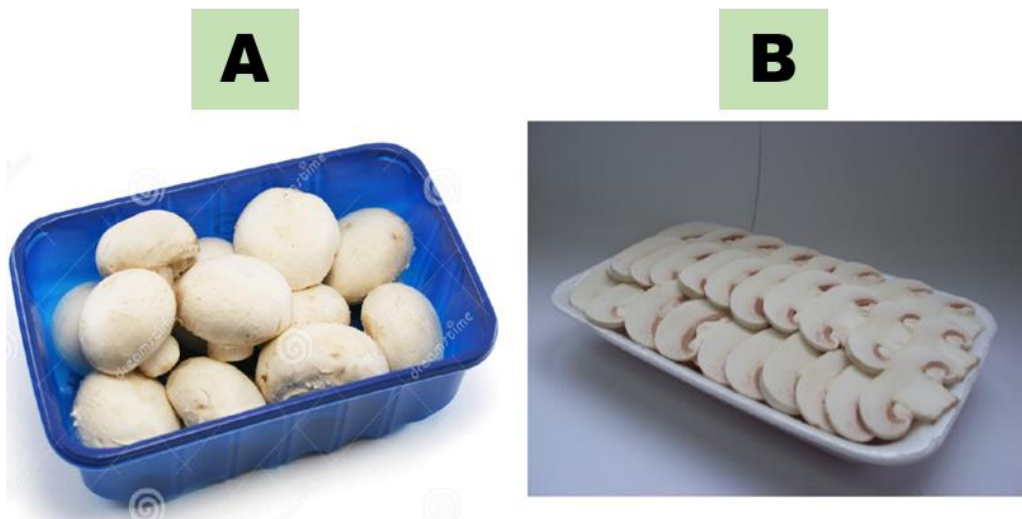
### 1.3.1 Consumo en Fresco

Los hongos y setas comestibles en fresco son muy apreciados por el consumidor debido a su agradable sabor y valor culinario-alimenticio, pero tienen como desventaja que su vida útil o vida media es muy corta una vez cosechado, lo que no permite que sean exportados a lugares que se encuentran a larga distancia, limitando así su consumo a puntos cercanos y al consumo interno (Burton y Noble, 1993). *A. bisporus* puede llegar a conservarse en refrigeración (2 - 4 °C) hasta 13 días empleando películas plásticas de polietileno y otros recubrimientos comestibles a base de alginatos, permitiendo de esta manera alargar su periodo de vida útil, y por lo tanto aumenta su vida comercial (Beelman y col., 1989; Burlo y col., 2004). Los champiñones al mantenerse en cadena de frío reducen la actividad microbiana responsable principal de su deterioro y la pérdida de calidad (Aguirre y col., 2008). Tanto el

pH como la humedad relativa y el tiempo transcurrido desde su recolección influyen en la estabilidad del alimento (**De Pradena, 1996**).

En España la producción de hongos y setas comestibles en fresco en el año 2016 fue de 147.757 Tm, lo que corresponde al 75% de la producción total de setas y hongos comestibles (197.010 Tm), teniendo previsto que estas cifras aumenten para los próximos años (**Roncero, 2015**). De las 147.757 Tm de hongos y setas comestibles producidas en el 2016 y destinadas al consumo en fresco, el 70 - 90% corresponde a *A. bisporus* (champiñón) (**Royse, 2007**).

El champiñón fresco se comercializa en dos formas: champiñones enteros y champiñones laminados (ver Figura-I.10).



**Figura I.10** A) Champiñones enteros, B) Champiñones laminados.

En la elaboración del champiñón en fresco se generan principalmente dos subproducto: los tallos de champiñón y los champiñones no comercializables (defectuosos, abiertos, etc.), y el compost agotado.

### 1.3.2 Consumo en Conserva

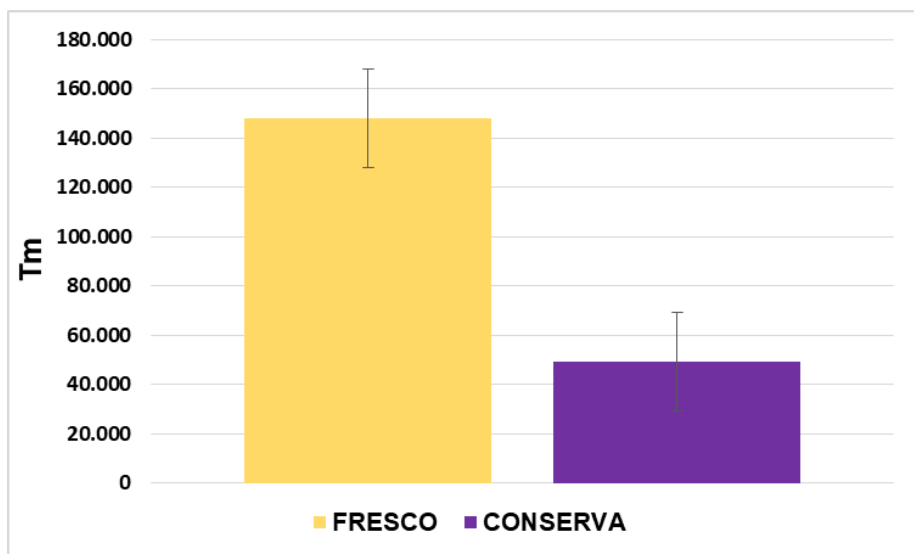
El champiñón es un producto altamente perecedero, su deterioro comienza inmediatamente después de su cosecha (**Kotwaliwale y col., 2007**), lo cual es causado por una reacción de pardeamiento siendo la principal responsable la enzima polifenoloxidasasa (EC. 1.14.18.1) (**Devece y col., 1999**). Es por ello que las industrias alimenticias para extender su periodo de vida útil utilizan procesos tecnológicos como la elaboración de conservas, para ello los hongos son llevados a un tratamiento térmico con la finalidad de inactivar ciertas enzimas, eliminar microorganismos y otros componentes antinutricionales no deseables (**Toth y col., 1981**).

En 1790 Nicolas Appert logró mantener la calidad de los alimentos durante largos periodos de tiempo tras su tratamiento con calor húmedo y conservación en latas con bajo contenido de aire, dando paso de esta manera a un nuevo método de conservación, que permitió colocar una barrera entre el champiñón y los factores de degradación, aumentando su período de vida útil (**Vedder, 1978**). La Comercialización actual del champiñón en conserva responde a la alta demanda de productos listos para ser usados, que permitan una mayor comodidad y a la vez contengan un gran valor añadido.

El método del champiñón en conserva consiste en envasar los champiñones en un recipiente de hojalata, para luego proceder a su cerrado hermético y a la vez a su esterilización con el objetivo de eliminar todos los microorganismos que se encuentran presentes. Todo ello con el fin de mantener el producto lo más adecuadamente posible hasta que este sea consumido (**Anonimo, 2004**).

En lo referente a la producción de champiñón en conserva el escaldado es la parte principal ya que tiene por objeto reducir el pardeamiento enzimático mediante tratamiento térmico, inducir la contracción del champiñón para que no se produzca esto durante la esterilización, y lograr que el producto sea flexible para favorecer el llenado (**Biekman y col., 1997**).

En España, en 2016, el 25% de la producción total de hongos y setas comestibles (197.010 Tm) fue destinado a la conserva, es decir, aproximadamente 49.253 Tm (**Roncero, 2015**).



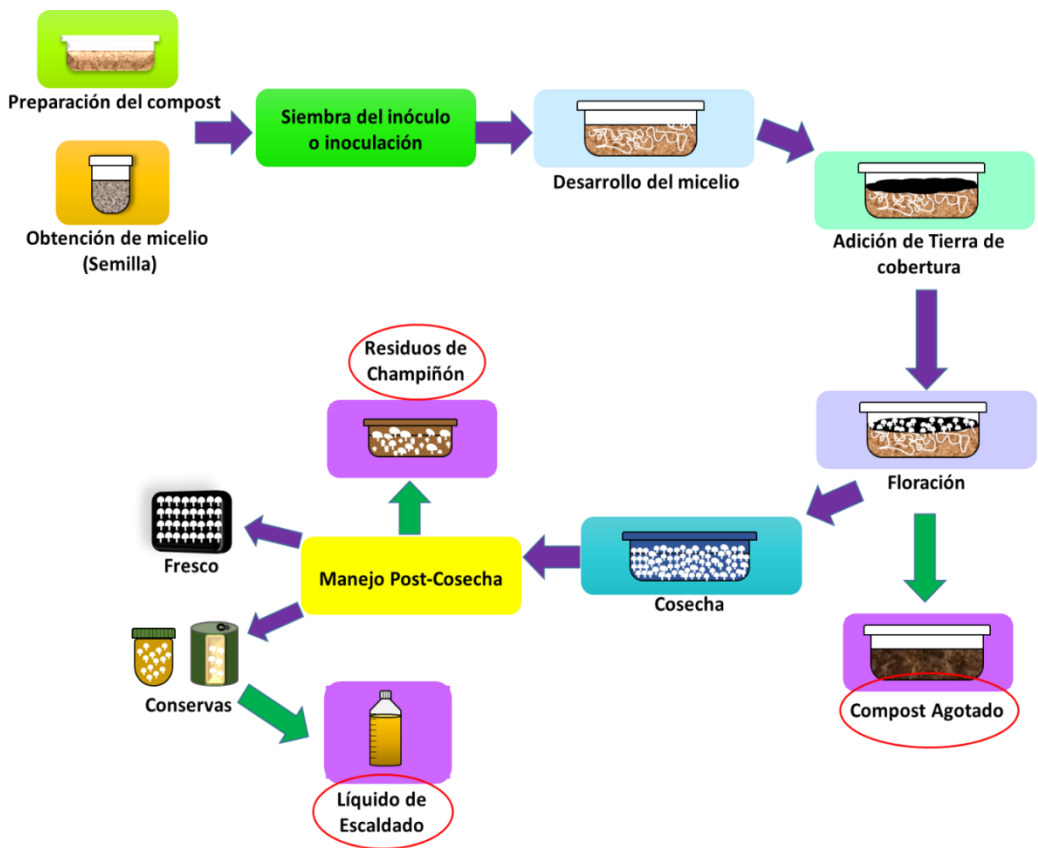
**Figura I.11** Principales formas de Consumo de Hongos comestibles en España en el 2016.

La elaboración de champiñones en conserva genera una importante cantidad de subproducto, el líquido de escaldado (LE).

### 1.4 Generación de subproductos en la industria del champiñón

La producción de hongos y setas comestibles en España, destinadas al consumo en fresco o en forma de conservas, representa entre el 7 y el 8% de la producción mundial (Royse y col., 2017).

Esta producción, como se muestra esquemáticamente en la Figura-I.12, genera tres tipos de subproductos: i) el compost agotado, ii) residuos de champiñón (tallos y champiñones no comercializables) y iii) el líquido de escaldado.



**Figura I.12** Esquema general de la producción de *Agaricus bisporus* (Champiñón): Productos y subproductos.

Cada semana se generan unas 50.000 toneladas de residuos de champiñón en Europa, representando un importante desafío medioambiental por parte de las industrias del champiñón. Por lo que darle una utilización práctica al uso de estos subproductos, además de solucionar un problema medioambiental, contribuiría a la valorización de los mismos obteniendo a partir de ello productos bioactivos beneficiosos para la salud y/o de uso industrial (**Buruleanu y col., 2018**).

Se consideran como residuos de champiñón a tallos y champiñones no comercializables, debido a que se encuentran defectuosos, muy abiertos o dañados. Actualmente, este subproducto no se utiliza o mal utiliza como alimento animal o abono para el campo. Sin embargo, debido a su composición (ricos en proteínas, hidratos de carbono, y metabolitos beneficiosos para la salud), podrían ser materia prima para la obtención de diversos productos de alto valor añadido, potencialmente utilizables en la industria químico-farmacéutica, alimentaria, cosmética, biotecnológica o en la moderna agronomía (**Uzun, 2004; Polat y col., 2009**).

Por esta razón los residuos de champiñón (tallos y champiñones no comercializables) son de un gran interés, ya que de esta manera podrían generar beneficios económicos y medioambientales (**Sánchez, 2010**). Con este fin, se está investigando la elaboración de diferentes productos de alto valor añadido, tales como antimicrobianos, bioplásticos, complementos alimenticios, nutraceuticos, etc., a partir de estos residuos de champiñón (**Buruleanu y col., 2018**).



### ***1.5 Los subproductos de champiñón como fuente de productos de alto valor añadido.***

Se le denomina alimento funcional a aquel que es capaz de proporcionar beneficios para la salud independiente del contenido nutricional requerido, es decir que contiene ingredientes que han sido probados y testeados anteriormente que permiten la mejora de la salud humana, ya que permiten reducir el riesgo de contraer enfermedades y tener una mejor salud. Dichos alimentos pueden ser alimentos en su estado natural o alimentos que han sido suplementados con otros componentes para aportar en la salud física o mental del consumidor **(Hicks y Moreau, 2001)**.

La búsqueda de sustancias o métodos que permitan aumentar o potenciar al sistema inmunológico induciendo resistencia y sin causar efectos secundarios al organismo ha hecho que los subproductos de hongos y setas comestibles pasen a ser de gran importancia para las industrias ya que debido a su composición pueden ser utilizados como fuente de alimentos funcionales, además de lograr de esta forma abaratar los costos de producción y darle un valor agregado a lo que antes era considerado como residuo.

A partir de los subproductos provenientes de hongos y setas comestibles se obtuvieron extractos acuosos que contienen Ergotioneina que es un antioxidante muy potente que puede ser utilizado en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y que puede inhibir enfermedades autoinmunes de tipo reumáticas, artritis, etc.

La Ergotioneina al ser incorporado en alimentos, se convierte en un suplemento alimenticio. Además sin mencionar que la Ergotioneina al ser

añadido a un alimento permite que este se conserve durante mucho más tiempo, actuando como conservante natural (**Cremades y col., 2015**).

El extracto acuoso de *Agaricus bisporus* además de estar constituido por compuestos antioxidantes contiene compuestos antimicrobianos, que inhiben el crecimiento de bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, incluso contiene otros compuestos con propiedades antivirales logrando de esta manera ser muy apreciado por la industria farmacéutica (**Santoyo y col., 2009; Eo y col., 2000**).

El extracto acuoso de *Agaricus bisporus* obtenido mediante proceso enzimático al ser probado en células hepáticas permitió comprobar que suprimía la acumulación de lípidos y triglicéridos en dichas células (**Rojas y col., 2018**).

El extracto obtenido a partir de *Agaricus bisporus* enriquecidos con selenio, podría ayudar al tratamiento de enfermedades ocasionadas por las bajas concentraciones de selenio, como el envejecimiento, y enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, e inmunológicas. Este producto enriquecido podría ser incorporado en alimento sólido o líquido, ya que no alteraría sus propiedades organolépticas (**Cremades y col., 2012**).

*Agaricus bisporus* al ser expuesto a la luz UV y bajo determinadas condiciones produce una mayor cantidad de vitamina D<sub>2</sub> en relación a la ingesta diaria, lo que podría mejorar el estado de personas con deficiencia de vitamina D (**Roberts y col., 2008; Koyyalamudi y col., 2009; Koyyalamudi y col., 2011**).

*Agaricus bisporus* al ser una fuente rica en quitina es decir rico en fibra insoluble o fibra dietética es considerado como alimento prebiótico al igual que los yogures debido a que provocan el mismo efecto, los compuestos prebióticos son aquellos compuestos no digeribles que estimulan el crecimiento y/o actividad de algunos microorganismos probióticos que se encuentran en el intestino (Gonzaga y col., 2005; Kim y col., 2005; Zheng y col., 2005).

# OBJETIVOS



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo General*

El principal objetivo del presente trabajo ha sido diseñar procesos biotecnológicos destinados a la producción y obtención de compuestos de interés para la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética, agronómica y biotecnológica, a partir de subproductos de la industria del champiñón, como vía de revalorización de estos subproductos y reducir la contaminación medioambiental.

Mediante el presente estudio se pretende valorizar los componentes presentes en los subproductos de la industria del champiñón, tanto los generados en la preparación de champiñones para el consumo en fresco (tallos y champiñones no comercializables) como los generados en la preparación de champiñones en conserva (tallos y líquido de escaldado).

### 2.2 *Objetivos Específicos*

5. Preparación y caracterización de diferentes hidrolizados de las proteínas presentes en los subproductos del champiñón.
6. Diseño general de procesos biotecnológicos encaminados a la revalorización de sub-productos derivados de la industria agroalimentaria.
7. Preparación de hidrolizados proteicos de la harina de tallos de champiñón.

8. Caracterización de los hidrolizados proteicos.
  - Caracterización electroforética
  - Caracterización cromatografica
  - Composición aminoacídica
  
7. Estudio de las actividades biológicas
  - Actividad Antioxidante (Industria Nutraceutica)
  - Actividad Antidiabética (Industria Nutraceutica)
  - Inhibición de la actividad tirosinasa (Industria Alimentaria)
  
8. Aplicaciones
  - En la industria agronomía (como biofertilizante),

# **MATERIALES Y MÉTODOS**





### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Aparatos, Materiales y Reactivos

##### 3.1.1 Aparatos

Todos los aparatos utilizados en esta investigación han sido detallados en la Tabla-M&M.1.

Tabla M&M.1 Aparatos.

Nombre	Casa Comercial
<b>Agitador Magnético</b> ( <i>Snaker</i> )	ARE Heating magnetic stirrer, Singapore
<b>Agitador Vortex</b> ( <i>Mezclador vórtex</i> )	Fisherbrand, Madrid-España
<b>Analizador de Aminoácidos</b> ( <i>Analizador de aminoácidos de mesa Biochrom 30+</i> )	Biochrom, Cambridge-Reino Unido
<b>Analizador de Imágenes Quimioluminiscencia (Equipo Imager 600)</b> ( <i>Amersham Imager 600</i> )	GE Healthcare, España
<b>Autoclave 75 L</b> ( <i>Presoclave II 80</i> )	JP Selecta, Barcelona-España
<b>Balanza de Precisión</b> ( <i>Balanza de precisión modelo BD BC 200</i> )	Denver Instrument, NY-USA
<b>Balanza Analítica</b> ( <i>Balanza Analítica modelo BC BC 100</i> )	Denver Instrument, NY-USA
<b>Baño de Agua</b> ( <i>Baño Termostático Analógico 5 L</i> )	Nahita, La Rioja-España
<b>Barra de Agitación</b> ( <i>Microbarra agitadora magnética de PTFE</i> )	Fisher scientific, Madrid-España
<b>Campana de Flujo Laminar</b> ( <i>Cabina de flujo laminar modelo mini H</i> )	Telstar, Madrid-España
<b>Campana de Gases</b> ( <i>Ductless Fume Hood CRUMA 870</i> )	CRUMA, Barcelona-España

<b>Centrífuga</b> ( <i>Eppendorf centrifuges</i> )	Eppendorf, Madrid-España
<b>Centrífuga Diferencial</b> ( <i>Avanti J-26 X</i> ) ( <b>JLA-10500, JLA-8100</b> )	Beckman Coulter, Nyon-Switzerland
<b>Congelador</b> (-40 °C, -80 °C)	New Brunswick Scientific, Fisher scientific, Madrid-España
<b>Cubeta de Electroforesis</b> ( <i>Celda de electrophoresis Criterion</i> )	Bio-Rad, California-USA
<b>Desecador de Vidrio</b> ( <i>Desecador de vidrio pyrex con tapa y disco de porcelana, diámetro 100 mm y capacidad 1 L</i> )	QuercusLab, España
<b>Equipo de Osmosis Inversa Sistema de Filtración de Líquidos Escala Laboratorio</b> ( <i>Triple System</i> )	MMS, Madrid-España
<b>Espectrofotómetro</b> ( <i>Ultrospec 2100pro UV/Visible</i> )	GE Healthcare, España
<b>Espectrometro</b> ( <i>FT/IR-460 Spectrometer</i> )	Nirvis, Madrid-España
<b>Estufa Secado Estático</b> ( <i>Desecador de vidrio pyrex con tapa y disco de porcelana, diámetro 100 mm y capacidad 1 L</i> )	Indelab, España
<b>Estufa de Secado con Aire Forzado</b> ( <i>Estufa de aire forzado modelo UF 260</i> )	Memmert, Schwabach-Alemania
<b>Extractor de Grasa</b> ( <b>Soxhlet</b> ) ( <i>Extractor ser 148/3</i> )	Labolan, Navarra-España
<b>Frigorífico</b> ( <i>Frigorífico LKUv 1610</i> )	Liebherr, España
<b>Fuente de Alimentación</b> ( <i>Electrophoresis power supply EPS 500/400</i> )	Pharmacia, LabTrader Inc., California-USA
<b>HPLC</b> ( <i>HPLC de columna Superdex™</i> )	Jasco, Madrid-España
<b>Kjeltec™ 840</b> ( <i>Kjeltec™ 840 equipado con digestor y destilador.</i> )	Foss Iberica S.A., Barcelona
<b>Liofilizador</b> ( <i>Cryodos -80 °C</i> )	Telstar, Madrid-España
<b>Lupa Binocular C-PS</b> ( <i>Estereomicroscopio</i> )	Nikon, Huesca-España
<b>Molino de Fresado</b> ( <i>Molino de Fresado SM 100</i> )	Retsch SM 100, Alemania

<b>Microscopio</b> ( <i>Microscopio ZEISS Modelo Axioskop 40</i> )	Zeiss, Alemania
<b>Mufla de Incineración</b> ( <i>Modelo Termocontroller ST</i> )	Nannetti, Faenza-Italia
<b>pHmetro</b> ( <i>pH-meter BasiC20</i> )	Crison, Barcelona-España
<b>Pipetas Automáticas</b> ( <i>Pipeta volumen variable labmate pro</i> )	HTL Lab Solutions, Marszawa-Polonia
<b>Reactor</b> ( <i>Reactor Biostat A</i> )	Sartorius Stedium, Goettingen-Alemania
<b>Rotavapor</b> ( <i>Rotavapor R-200</i> )	Büchi, Barcelona-España

### 3.1.2 Materiales

Todos los Materiales utilizados en esta investigación se han detallado en la Tabla-M&M.2.

**Tabla M&M.2** Materiales.

<b>Nombre</b>	<b>Casa Comercial</b>
<b>Botellas de Vidrio de diferentes volúmenes</b> ( <i>Frasco de laboratorio de vidrio transparente con tapón de rosca</i> )	Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Bureta</b> ( <i>Bureta con recto NS de grifo, clase B, volumen 10 mL</i> )	DURAN, Main-Alemania
<b>Pinza de Bureta</b> ( <i>Cole-Parmer™ 08021-34</i> )	Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Cápsulas de Porcelana</b> ( <i>Haldenwanger™</i> )	Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Crisol</b> ( <i>Crisol de porcelana forma media</i> )	QuercusLab, España
<b>Cubetas de Poliestireno</b> ( <i>Cubetas de poliestireno para espectrofotometría visible 2 y 3 mL</i> )	Deltalab, Barcelona-España

<b>Cubetas de Electroforesis</b> ( <i>Cubetas MultiSUB Midi , 10 x 7cm &amp; 10 x 10cm UV tray, 2 x 16 sample combs</i> )	Cleaver Scientific LTD, Warwickshire-Reino Unido
<b>Embudos</b> ( <i>Brand™ Embudo de vidrio de borosilicato</i> )	Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Matraces Erlenmeyers de Vidrio de diferentes Volúmenes</b> ( <i>Policarbonato cuello estrecho Nalgene</i> )	Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Matraces Erlenmeyers de Vidrio de 2 L</b> ( <i>Policarbonato boca ancha</i> )	DURAN, Main-Alemania
<b>Espátula</b> ( <i>Espátula cuchara plana, longitud 120 mm, SPSS-120-005</i> )	Labbox, Barcelona-España
<b>Gradillas de Eppendorf</b> ( <i>Bastidores Labcon 96-Place Storage System 2500-229-000</i> )	Labcon, California-USA
<b>Gradillas para tubos Falcon</b> ( <i>Gradilla rectangular para tubos Falcon, chapa acero inoxidable AISI 304, 24(8 x 3)</i> )	I.C.T, S.L. Instrumentación Científica Técnica, S.L., San Sebastian- España
<b>Gautes de Nitrilo</b> ( <i>Gautes para examinación sin polvo, Ref. 4020NP calidad estándar</i> )	Deltalab, Barcelona-España
<b>Microtubos de 1,5 y 2 mL</b> ( <i>np Safelock-Cap microcentrifuge tube PP, 1,5/2 mL, attached cap, boil-proof, transparent, graduated</i> )	Nerbe plus, Winsen (Luhe)- Alemania
<b>Papel Filtro Convencional</b> ( <i>Papel de filtro, hojas de 50 x 50 cm, tamaño de poro ± 30-40 micras</i> )	Deltalab, Barcelona-España
<b>Parafilm M</b> ( <i>Laboratory Film</i> )	Bemis, Wisconsin-USA
<b>Pipeta P10/P100/ P1000</b> ( <i>PIPETMAN Neo® 1-10 µL / 10-100 µL / 100-1000 µL</i> )	GILSON®, Wisconsin-USA
<b>Pipeta Serológica</b> ( <i>Pipeta serológica de 5/10/25 mL, poliestireno transparente con escala impresa positiva y negativa, envasadas de forma estéril unitaria</i> )	SARSTEDT, Nümbrecht-Alemania
<b>Piseta</b> ( <i>Frasco lavador 1000 mL</i> )	ENDO Plasticware, TecnyLab, Valencia-España

<b>Probetas de Vidrio de diferentes Volúmenes</b> ( <i>Probeta graduada base hexagonal, clase a, glassco</i> )	Labbox, Barcelona-España
<b>Probetas de Plástico de diferentes Volúmenes</b> ( <i>Probeta graduada PP, 1000 mL ENDO</i> )	TecnyLab, Valencia-España
<b>Puntas de Pipeta Automática</b> ( <i>Pipette Tips</i> )	Thermo Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Puntas de Pipeta P10/P100/P1000</b> ( <i>Filter Tip PP natural 0,5–10 µL/10-100 µL/100-1000 µL, short, graduated 96 tips/rack, Gilson type, premium surface, RNase/DNase/DNA/pyrogenfree, sterile RCE/IVD</i> )	Nerbe plus, Winsen (Luhe)-Alemania
<b>Placa de Petri</b> ( <i>Petri dish 60x15 mm with cams</i> )	SARSTEDT, Nümbrecht-Alemania
<b>Tamiz</b> ( <i>Tamiz 355 µm</i> )	Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Termómetro</b> ( <i>Termómetro amarillo - 10/150 °C</i> )	QuercusLab, España
<b>Tripode</b> ( <i>Soporte Universal</i> )	QuercusLab, España
<b>Tubo de Ensayo PE</b> ( <i>Resistente al calor 12 mL</i> )	Labbox, Barcelona-España
<b>Tubo de Ensayo</b> ( <i>Vidrio Pyrex de 15 mL</i> )	Laboquimia
<b>Tubos Falcon de 15 y 50 mL</b> ( <i>Centrifuge tube PP with screw cap PE, 15/50 mL, Ø17x120 mm, conical bottom, tube transparent, cap</i> )	Nerbe plus, Winsen (Luhe)-Alemania
<b>Vasos de Precipitados de diferentes Volúmenes</b> ( <i>Duran™ Vaso de precipitados de vidrio de perfil bajo con boquilla</i> )	Fisher Scientific, Madrid-España

### 3.1.3 Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo han sido reactivos de calidad analítica, adquiridos de las siguientes casas comerciales: Sigma-Aldrich, Healthcare-Merck, Panreac, Biorad, Thermo Fisher Scientific, que se detallan en la Tabla-M&M.3

Tabla M&M.3 Reactivos utilizados.

Reactivo	Casa comercial
Acarbosa $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich, España
Acetato de Sodio Trihidratado ( $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ )	Merck, Darmstadt-Alemania
Ácido Acético ( $CH_3-COOH$ )	Sigma-Aldrich, España
Ácido Ascórbico $C_6H_8O_6$	Sigma-Aldrich, España
Ácido Citrico ( $C_6H_8O_7$ )	Sigma-Aldrich, España
Ácido Clorhídrico (HCl)	Panreac, Barcelona-España
Ácido Fosfórico ( $H_3PO_4$ )	Sigma-Aldrich, España
Ácido 3,5-Dinitrosalicílico ( $C_7H_4N_2O_7$ )	Sigma-Aldrich, España
Ácido Linoleico $\geq 99\%$ ( $C_{18}H_{32}O_2$ )	Sigma-Aldrich, España
Ácido Sulfúrico conc. ( $H_2SO_4$ )	Sigma-Aldrich, España
Acrilamida ( $C_3H_5NO$ )	Bio-Rad, California-USA
APS (Persulfato Amónico) ( $(NH_4)_2S_2O_8$ )	Merck, Darmstadt-Alemania
Azul de Bromofenol ( $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ )	Sigma-Aldrich, España
Bisacrilamida ( $C_7H_{10}N_2O_2$ )	Bio-Rad, California-USA
Bromuro de Potasio (KBr)	Sigma-Aldrich, España
BSA (Seroalbúmina bovina)	Thermo Fisher Scientific, Madrid-España
Carbonato de Sodio ( $Na_2CO_3$ )	Sigma-Aldrich, España
Cloruro de Hierro (II) Tetrahidratado ( $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ )	Merck, Darmstadt-Alemania

Cloruro de Hierro (III) ( $\text{FeCl}_3$ )	Merck, Darmstadt-Alemania
Cloruro de Potasio (KCl)	Panreac, Barcelona-España
Cloruro de Sodio (NaCl)	Panreac, Barcelona-España
Cloruro Trifenil Tetrazolio	Sigma-Aldrich, España
Coomasie Plus - the better Bradford assay reagent	Thermo Fisher Scientific, Madrid-España
Coomassie G-250	Bio-Rad, California-USA
EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ )	Sigma-Aldrich, España
Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )	Panreac, Barcelona-España
Fenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ )	Sigma-Aldrich, España
Fosfato Di Sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Panreac, Barcelona-España
Glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ )	Panreac, Barcelona-España
Glicina ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ )	Sigma-Aldrich, España
Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	Sigma-Aldrich, España
Glutación ( $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ )	Sigma-Aldrich, España
Hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ )	Labbox, Barcelona-España
Hidróxido de Potasio (KOH)	Sigma-Aldrich, España
Hidróxido de Sodio (NaOH)	Panreac, Barcelona-España
Hipoclorito de Sodio ( $\text{NaClO}$ )	Panreac, Barcelona-España
L-Histidina ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ )	Sigma-Aldrich, España
L-DOPA (Levodopa) (3,4-Dihidroxi-L-fenilalanina)	Sigma-Aldrich, España
Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	Panreac, Barcelona-España
Molibdato Sódico en $\text{PO}_4\text{H}_3$	Merck, Darmstadt-Alemania
Ninhidrina ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ )	Sigma-Aldrich, España
Potasio y Sodio Tartrato Tetrahidratado ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma-Aldrich, España
SDS ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ )	Sigma-Aldrich, España
Serva Blue G Dye	Sigma-Aldrich, España

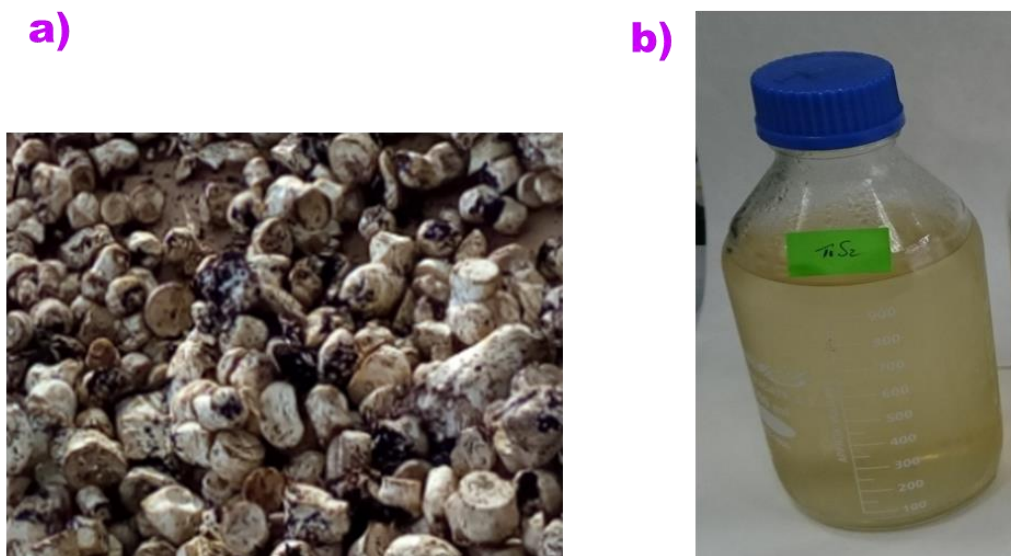


Sodium Hydro/Oxid Buffer 2, pH 4.25	Biochrom
Sodium Hydrolysate Buffer 1, pH 3.20	Biochrom
Sodium Hydrolysate Buffer 5, pH 6.45	Biochrom
Sodium Regeneration Buffer 6	Biochrom
Sodium Loading Buffer, pH 2.20	Biochrom
Tiocianato de Amonio (NH <sub>4</sub> SCN)	Merck, Darmstadt-Alemania
TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-triazine) (C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub> )	Sigma-Aldrich, España
Tripsina	Sigma-Aldrich, España
Tris (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, España
Tris/HCl (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> . HCl)	Sigma-Aldrich, España
Tungstato Sódico (Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt-Alemania
Yoduro de Potasio (KI)	Merck, Darmstadt-Alemania
β-Mercaptoetanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Panreac, Barcelona-España
2,2'-Azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) (C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, España
2,2-Difenil-1-picrilhidrazilohidrato	Sigma-Aldrich, España
α-amilasa	Sigma-Aldrich, España
p-Nitrofenil-α-D-glucopiranososa (C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>8</sub> )	Sigma-Aldrich, España

### 3.2 Material de Partida: Subproductos

En este trabajo se han utilizado como materia prima residuos o subproductos de champiñón (*Agaricus bisporus*) provenientes de la industria de hongos comestibles, proporcionado por el Grupo Riberebro (Haro, La Rioja). Se han considerado como residuos a los tallos y champiñones defectuosos que no pueden ser comercializados, generados durante la preparación del champiñón

para el consumo en fresco y el destinado a conservas, así como el líquido de escaldado (LE) generado en la preparación de conservas de champiñón.



**Figura M&M.1** a) Tallos y champiñones defectuosos, b) LE.

### 3.2.1 Estabilización del material de partida

Teniendo en cuenta el alto contenido de agua y la abundancia de nutrientes, tanto de los tallos de champiñón como los champiñones no comercializables y del LE se hace necesario un tratamiento previo, con el fin de estabilizarlos y evitar su deterioro. En el caso de los tallos esto se ha realizado mediante el secado, y en el caso del LE mediante una reducción del volumen por concentración al vacío o por osmosis inversa.

#### – *Secado y molienda de TCH*

Una vez obtenido los residuos del champiñón (tallos y champiñones defectuosos o no comercializables), estos se han lavado con abundante agua fría, eliminando de esta manera restos de compost y tierra presentes. Teniendo en

cuenta el contenido de agua y la abundancia de nutrientes, seguidamente, para evitar su deterioro, se procedió a su secado en una estufa con ventilación forzada a 50 °C (Figura-M&M.2a). Posteriormente el producto seco se molió en un molino de pistón equipado con una malla de 0,5 mm (Fresado: Retsch SM 100) (Figura-M&M.2b), y luego tamizado en un tamiz de 355 µm para obtener un polvo mas fino. Al producto resultante se le denominó harina de tallos de champiñón (HTCH).



**Figura M&M.2** a) Estufa de secado estático y con flujo de aire caliente, b) Molino.

### – *Concentración del LE*

El LE al tener una baja concentración de compuestos solubles y ocupar un volumen grande, es necesario reducir su volumen. Para ello se ha procedido a su

concentración. La concentración se ha llevado a cabo de dos maneras: i) por concentración al vacío en rotavapor y ii) por osmosis inversa, hasta alcanzar una concentración de unas 10 veces. Al producto obtenido se le ha denominado “líquido de escaldado concentrado 10 veces” (LE10X).

### *i) Concentración en Rotavapor*

El LE se ha concentrado unas 10 veces mediante concentración al vacío en un Rotavapor (Büchi, Suiza) (Figura-M&M.3), a una temperatura de 65-70 °C, y un vacío de 30-40 kPa. Una vez concentrado el LE, y al que hemos denominado LE10X<sub>RV</sub>, se ha almacenado a 4 °C o a -20 °C, según se fuera a utilizar en un periodo corto de tiempo (15 días a un mes) o un tiempo más largo, respectivamente.



**Figura M&M.3** Rotavapor (Büchi, Suiza).

### *ii) Concentración por osmosis inversa*

El LE se ha concentrado unas 10 veces mediante osmosis inversa, utilizando para ello un equipo MMS (Figura-M&M.4), que consiste de las siguientes partes: módulo de filtración, equipado con una membrana (AFC99, PCI Membrane, France), bomba de alimentación de tipo trilobular, controladores de presión y temperatura, sistemas de recirculación y recogida de filtrado y concentrado. Los experimentos se realizaron a una presión de 25-30 bar y a  $25 \pm 1$  °C de temperatura, de acuerdo con las condiciones sugeridas por el fabricante. El producto así obtenido se ha denominado LE10X<sub>OI</sub>, y se ha almacenado a 4 °C o a -20 °C, según se fuera a utilizar en un periodo corto de tiempo (15 días a un mes) o un tiempo más largo, respectivamente. La limpieza y mantenimiento de las membranas se ha llevado a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.



**Figura M&M.4** Equipo de osmosis inversa (OI).

### 3.2.2 Caracterización química del material de partida

- **Humedad-Peso seco**

La humedad se ha determinado gravimétricamente de acuerdo con el procedimiento estándar de la AOAC (A.O.A.C., 1995). Brevemente, se pesa una cápsula vacía, se añade 2 g de muestra y se coloca en la estufa a secar a 100 °C durante 24 horas, una vez transcurrido este tiempo se saca la muestra de la estufa y se pone a enfriar en un desecador. Se pesa la muestra seca y se calcula el contenido de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100$$

En donde:  $P_i$  es el peso inicial y  $P_f$  es el peso final

La diferencia entre el peso inicial ( $P_i$ ) menos la humedad nos da el peso seco.

- **Cenizas**

El contenido en cenizas se ha determinado gravimétricamente de acuerdo con el procedimiento estándar de la AOAC (A.O.A.C., 1995). Brevemente, se tara el crisol a peso constante, se dejan en la mufla por 15-30 min a temperatura entre 550-600 °C. Dejar enfriar el crisol en un desecador durante 15-20 min, y pesar el crisol. Colocar 2 g de muestra en el crisol e incinerar la muestra en la mufla durante 8 horas a temperatura entre 550-600 °C, posteriormente se coloca en un desecador hasta que se enfríe y finalmente se pesa el crisol con las cenizas.

El contenido en cenizas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Ceniza} = \frac{\text{Peso de Cenizas}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

- ***Hidratos de Carbono totales***

El contenido en hidratos de carbono totales se determinó mediante el método colorimétrico de Dubois, usando un reactivo de ácido sulfúrico-fenol (**Dubois y col., 1956**). Brevemente, los carbohidratos totales fueron medidos partiendo de 0,5 g de muestra que se resuspendió en 10 mL de una mezcla H<sub>2</sub>O/fenol (80% v:v)/ácido sulfúrico concentrado (2:1:40). La muestra resuspendida se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (22-23 °C) y se calentó lentamente hasta 95 °C, manteniendo esta temperatura durante 60 min, seguidamente se enfrió lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se tomó una muestra, se centrifugó a 6000 x g y se midió la absorbancia a 575 nm utilizando un espectrofotómetro Ultrospec 2100pro UV/Visible (GE Healthcare, Barcelona, Spain) (Figura-M&M.5). La concentración de hidratos de carbono totales se determinó por interpolación en una curva patrón trazada con glucosa (Figura-M&M.6).

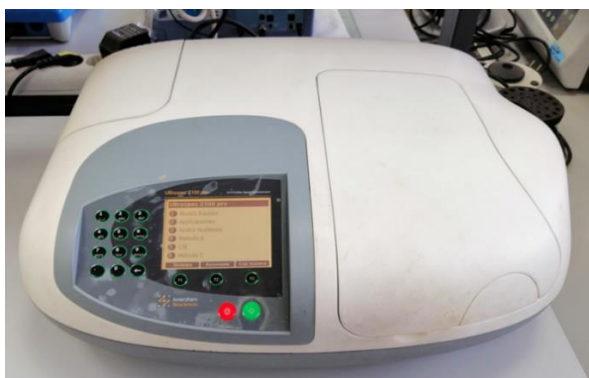


Figura M&M.5 Espectrofotómetro.

TUBO	Concentración GLUCOSA (mg/mL)	Absorbancia 575 nm
1	0	0,435
2	0,1	0,464
3	0,2	0,537
4	0,3	0,747
5	0,4	0,854
6	0,5	0,847
7	0,6	1,038
8	0,7	1,118
9	0,8	1,171
10	0,9	1,283
11	1	1,394

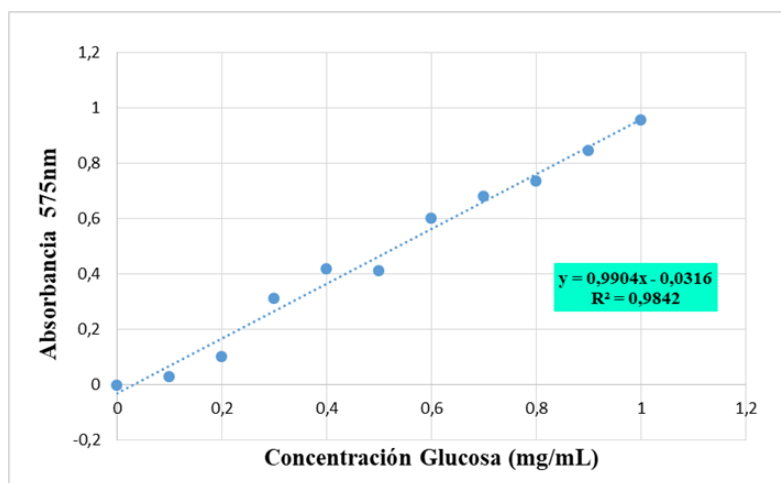


Figura M&M.6 Curva patrón de Glucosa.



- **Grasa cruda**

El contenido en grasa total se determinó por gravimetría tras la extracción de la muestra con hexano durante 12 horas en un extractor Soxhlet de acuerdo con el procedimiento estándar de la AOAC (A.O.A.C., 1995). Una vez terminada la extracción, el solvente se destila y el residuo graso se pesa [Clemente y col., 1997].

- **Nitrógeno total**

El nitrógeno total ( $N_t$ ) se determinó mediante el método Kjeldahl de acuerdo con el procedimiento establecido por la A.O.A.C. 1995 (A.O.A.C., 1995), en un equipo automático Kjeltex™ 840 (Foss Iberica S.A., Barcelona) equipado con digestor y destilador.

- **Cuantificación de Proteínas**

### A partir del $N_t$

Las proteínas en muestras sólidas se han calculado multiplicando el valor de nitrógeno total por 5,45 (factor corregido para los hongos) (A.O.A.C., 2006; Mattila y col., 2002).

La concentración de proteínas solubles en medios acuosos se ha determinado por varios métodos: método de Biuret (de 1 a 10 mg/mL) (Sapan y col., 1999), método de Lowry (de 0,1 a 1 mg/mL) (Lowry y col., 1951) o método de Bradford (de 0,01 a 0,1 mg/mL) (Bradford, 1976), según la concentración de proteína de las muestras.

### Método de Biuret

#### **Materiales y Reactivos**

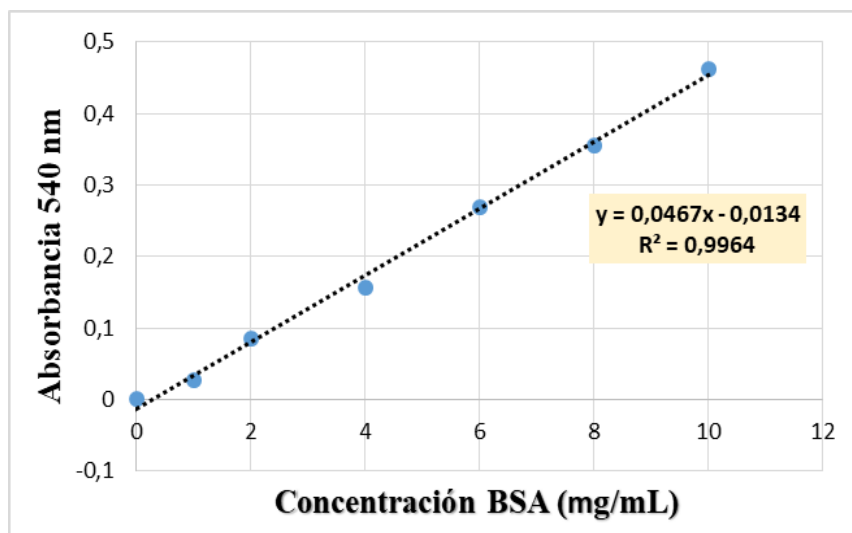
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado
- Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado
- Yoduro de potasio
- Hidróxido de Sodio
- Solucion estándar de proteína de concentración conocida (hasta 10 mg/mL)

#### **Preparación del Reactivo Biuret**

Disolver 1,5 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado y 6 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado en 500 mL de agua. Añadir 300 mL 10% (p/v) NaOH y llevar hasta un volumen de 1 L con agua. Añadir 1 g de yoduro de potasio para inhibir la reducción del cobre. Almacenar en un recipiente de plástico en la oscuridad. Desechar si se observa algún precipitado negro o rojizo.

Para la cuantificación de proteínas según este método se agrega 0,5 mL de la muestra a 2,5 mL de Reactivo Biuret, se agita y se deja incubar a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación se lee la absorbancia a 540 nm. La concentración de proteína se determina por interpolación sobre una curva patrón realizada con albúmina bovina, que cubre el rango de 1 a 10 mg/mL.

TUBO	Concentración BSA (mg/mL)	Absorbancia 540 nm
1	0	0
2	1	0,026
3	2	0,085
4	4	0,156
5	6	0,268
6	8	0,356
7	10	0,463



**Figura M&M.7** Curva de Calibración con BSA (Método de Biuret).

### Metodo de Lowry

Este método se ha utilizado para determinar proteínas y péptidos solubles a concentraciones moderadas (<1 mg/mL y >0,1 mg/mL). Se determinó según la metodología propuesta por Lowry y col. (**Lowry y col., 1951**), que se basa en que ciertos aminoácidos como tirosina, triptófano y cisteína reaccionan en un medio-alcalino con ácido fosfotúngstico y ácido molíbdico del reactivo de Folin (color amarillo) para dar un complejo incoloro que se puede reducir mediante

una reacción lenta con fenol en un complejo de coloración azul detectable por espectrofotometría a 750 nm.

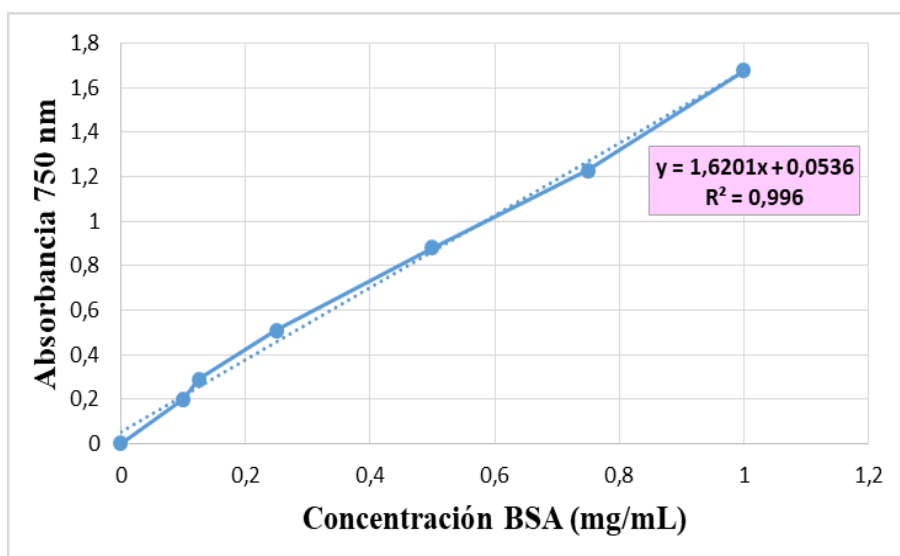
### Material y Reactivos

- Lowry A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2,0% en NaOH 0,1N
- Lowry B:  $\text{CuSO}_4$  al 1%
- Lowry C: tartrato sódico al 2%
- Reactivo de Folin-Ciocalteu: Tungstato sódico y molibdato sódico en  $\text{PO}_4\text{H}_3$  y HCl.
- Albúmina: 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Solución D: (20 mL Lowry A, 0,2 mL Lowry B y 0,2 mL Lowry C)

Se colocan 400  $\mu\text{L}$  de la muestra en cada tubo y se añade 2 mL de la solución D. Se mezcla y se incuba 15 min a temperatura ambiente. A continuación se añade a todos los tubos 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin diluido en agua destilada 1/2 (v/v). Mezclar y esperar 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mide a una densidad óptica de 750 nm ajustando el equipo con el blanco.

La cantidad de proteínas en la muestra se estimó por interpolación sobre una curva estándar de una solución proteica de albúmina sérica bovina (BSA). Los resultados se expresaron en  $\text{mg}/\text{mL}$ .

TUBO	Concentración BSA (mg/mL)	Absorbancia 750 nm
1	0	0
2	0,1	0,2
3	0,125	0,29
4	0,25	0,51
5	0,5	0,882
6	0,75	1,23
7	1	1,678



**Figura M&M.8** Curva de Calibración con BSA (Método de Lowry).

### Método de Bradford

Este método se ha utilizado para determinar la concentración de proteínas solubles presentes a baja concentración (<0,1 mg/mL). Este método permite cuantificar las proteínas totales de la muestra, en un rango comprendido entre 0,1 y 0,001 mg/mL. Se fundamenta en la interacción de las proteínas con determinados colorantes, por lo que la intensidad del color dependerá de la cantidad de proteínas presentes. Se forma un complejo de color azulado con un máximo de absorbancia de 595 nm.

### **Reactivos:**

- Serva Blue G Dye
- BSA (Seroalbúmina bovina) 0,1 mg/mL (100 µg/mL)
- Etanol 96%
- Ácido fosfórico 88%

### **Solución Stock de Bradford:**

- 100 mL Etanol 96%
- 200 mL ácido fosfórico 88%
- 350 mg Serva blue G

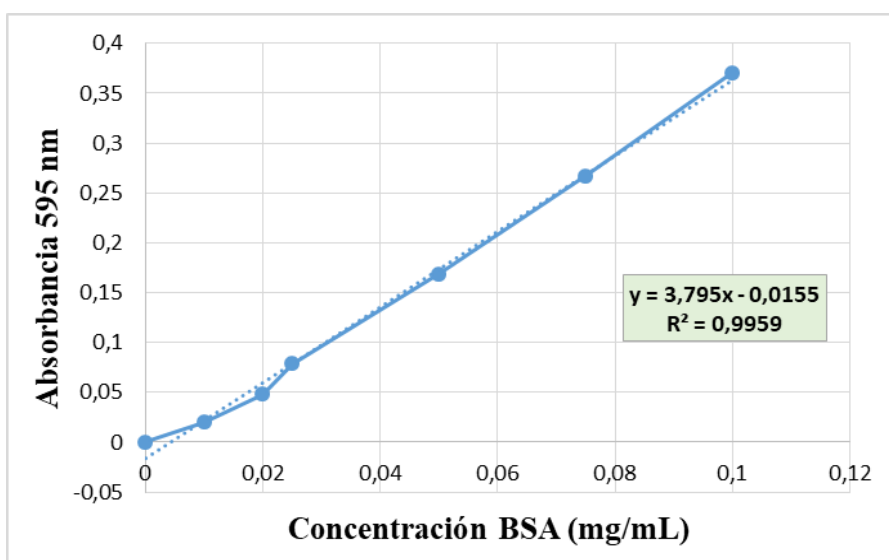
### **Reactivo de Bradford:**

- 425 mL H<sub>2</sub>O Destilada
- 15 mL Etanol 96%
- 30 mL ácido fosfórico 88%
- 30 mL Solución Stock de Bradford

### *Protocolo:*

Se añade 100 µL de muestra con 1 mL de Reactivo de Bradford, se agita y se incuba a temperatura ambiente durante 10-20 min. Se mide la absorbancia del complejo proteína-Coomassie Blue G-250 a 595 nm inmediatamente y se lee las muestras de menor a mayor concentración. A su vez se realiza una curva patrón con 1 mg/mL de Albúmina de suero bovino (BSA) y se interpola las absorbancias de las muestras para obtener la concentración.

TUBO	Concentración BSA (mg/mL)	Absorbancia 595 nm
1	0	0
2	0,01	0,02
3	0,02	0,048
4	0,025	0,079
5	0,05	0,169
6	0,075	0,267
7	0,1	0,371



**Figura M&M.9** Curva de Calibración con BSA (Método Bradford).

- **pH**

En el caso de la HTCH, para determinar el pH, se resuspendieron 5 g de subproducto estabilizado en 10 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, se agitó durante 10 min y se dejó decantar durante 1 h. Transcurrido este tiempo se ha medido el pH del sobrenadante con un pH-metro equipado con un electrodo de tipo combinado, con control de temperatura, a 25 °C (pH-meter BasiC20, Crison, Barcelona) En el caso del LE, al ser este líquido, el pH se ha medido directamente a 25 °C.

El análisis del contenido proteico porcentual, en forma de aminoácidos libres, oligopéptidos+péptidos y proteínas, se describirá más adelante, cuando se desarrolle el apartado correspondiente a cromatografía de filtración molecular. Igualmente la determinación de ergosterol y ergotioneina.



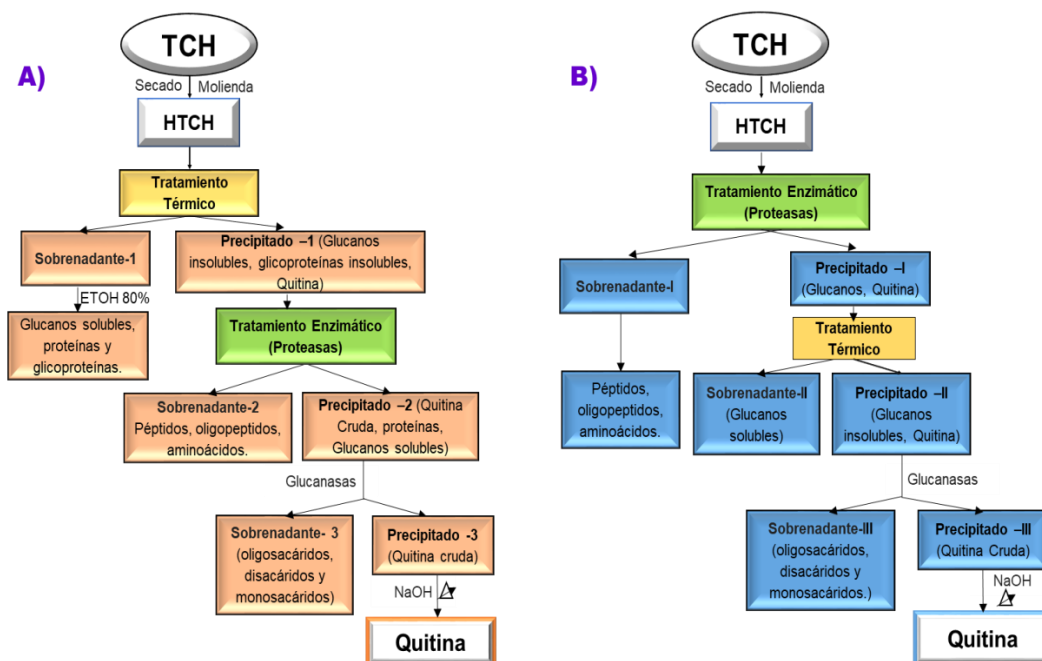
**Figura M&M.10** pH-metro.

### ***3.3 Diseño de procesos biotecnológicos para la valorización de la HTCH***

El procesamiento de la HTCH se ha llevado a cabo de dos maneras o por dos vías, como se muestra esquemáticamente en la Figura-M&M.11. La vía A es un proceso basado en un tratamiento térmico previo seguido de un tratamiento



enzimático, y la vía B es un proceso basado en un tratamiento enzimático como primer paso o etapa seguido de un tratamiento térmico. Ambos procesos se han estudiado en la valorización de la HTCH.



**Figura M&M.11** Diseños Biotecnológicos para la obtención de compuestos de interés.

- **Tratamiento térmico**

El tratamiento térmico se ha llevado a cabo tras la resuspensión en agua de la HTCH al 10% p/v, y autoclavado a 121 °C durante 30 min con el fin de conseguir extraer los compuestos presentes en el sustrato.

- **Tratamiento Enzimático**

El tratamiento enzimático se ha llevado a cabo utilizando las cuatro

proteasas (tres endo-proteasas y una exo-proteasa) que se indican en la Tabla-M&M.2, bien bajo condiciones simple o secuencial. La HTCH resuspendida en agua al 10% (p/v), se calienta a la temperatura óptima de cada proteasa (55-60 °C), se ajusta el pH 8,5 y se añade la enzima a una relación enzima/sustrato (E/S) de 0,3% (p/v) manteniendo el pH a 8,5 con NaOH 1M durante 2 horas hasta su estabilización.

**Tabla M&M.4** Enzimas utilizadas en la hidrólisis de la HTCH.

Nombre Comercial de las Proteasas	Código E.C.	pH	Temperatura (°C)	Microorganismo productor
Alcalase®	3.4.21.62	6,5-8,5	60	<i>Bacillus licheniformis</i>
Bioprotease LA-450	3.4.21.99	7,0-11,0	55-60	<i>Bacillus licheniformis</i>
Papaína	3.4.22.2	5,0-8,0	40-75	<i>Cariaca papaya</i>
Flavourzyme®		5	50	<i>Aspergillus oryzae</i>

Como se observa en la Figura-M&M.11 se ensayaron 2 procesos biotecnológicos para determinar cuál de ellos era el más adecuado para la obtención de productos de alto valor añadido presentes en la HTCH (hidrolizados proteicos, ergotioneina, péptido-glucanos, quitina/nano-quitina).

En el proceso A una vez que los residuos de champiñón han sido secados y molidos se obtiene polvo de champiñón (HTCH), al que se le somete a un tratamiento térmico, una vez finalizado este tratamiento se separan por centrifugación las sustancias solubles (Sobrenadante-1) de las insolubles (Precipitado-1). El sobrenadante-1, constituido mayoritariamente por glucanos

solubles, proteínas, glicoproteínas y/o proteoglucanos, oligosacáridos, péptidos y aminoácidos libres, se precipita con etanol al 80%, obteniéndose un precipitado integrado por glucanos y proteínas. Mientras que el precipitado-1, constituido por glucanos insolubles, glicoproteínas y/o proteoglucanos insolubles, y quitina se sigue desproteinizando mediante el tratamiento con proteasas para obtener un Sobrenadante-2, constituido por péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres, y un Precipitado-2 enriquecido en quitina, y que constituye una buena materia prima para la obtención de quitina y/o nano-quitina fúngica.

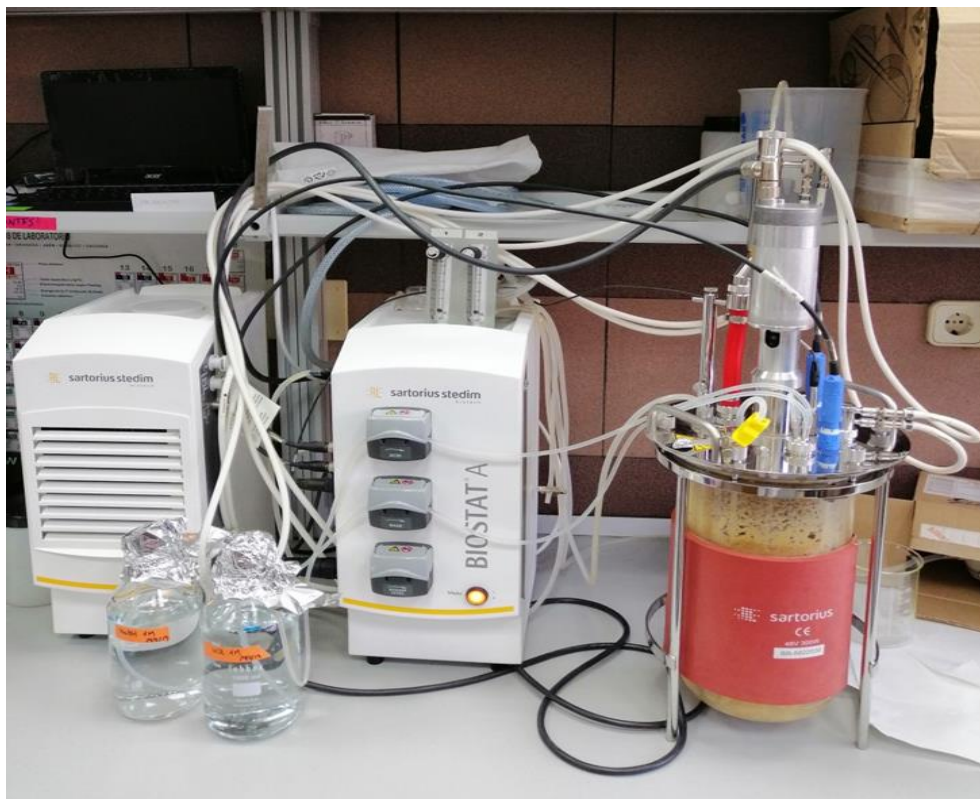
El proceso B se inicia con un tratamiento enzimático con proteasas dando lugar a un Sobrenadante-1, constituido por péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres, que constituye un hidrolizado proteico de potencial aplicación en agronomía (biofertilizante) o como nutracéutico o cosmeceútico, y un Precipitado-1 enriquecido en glucanos y quitina, que tras una desproteinización ligera con NaOH constituya una buena materia prima para la obtención de oligosacáridos (Sobrenadante-III) y/o quitina y nano-quitina fúngica (precipitado-III).

### ***3.4 Obtención de hidrolizados***

Los hidrolizados de las proteínas de la HTCH se ha llevado a cabo de dos maneras: i) utilizando una sola proteasa durante 2 horas (hidrólisis simple) y, ii) utilizando dos proteasas secuencialmente: una endo-proteasa durante una hora + una exo-proteasa durante otra hora (hidrólisis secuencial).

Tanto una como otra se ha llevado a cabo en un reactor tipo Biostat A

(Sartorius Stedim, Goettingen, Alemania) equipado con control de pH, temperatura y agitación (Figura-M&M.12), siguiendo el procedimiento de pH-stat (Adler-Nissen, 1986; Rao y col., 2018) con ligeras modificaciones (Parrado y col., 1993).



**Figura M&M.12** Reactor utilizado para la realización de las hidrólisis de las proteínas de la HTCH.

### 3.4.1 Hidrólisis Simple

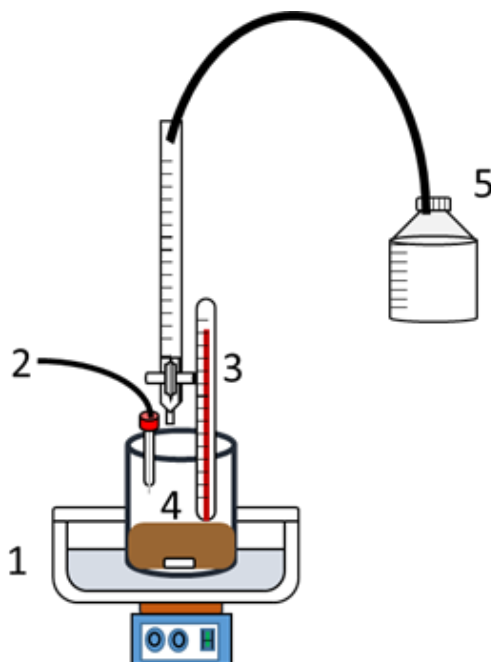
La hidrólisis se realizó bajo condiciones de pH constante 8,5, 55 °C, y 10% de sustrato (HTCH) (p/v), durante 2 horas hasta alcanzar su estabilización (cese del consumo de sosa). Posteriormente se dejó enfriar y se centrifugó a 8.000 x g

## Materiales y Métodos

---

durante 15 min a temperatura ambiente (22-23 °C), obteniéndose un sobrenadante claro rico en material proteico (hidrolizado) y precipitado constituido por el material insoluble.

Los estudios preliminares de hidrólisis se llevaron a cabo en un sistema sencillo de construcción propia cuyo montaje se muestra esquemáticamente en la Figura-M&M.13.



**Figura M&M.13** Sistema de hidrólisis de construcción propia 1. Baño de agua termostatzado, 2. Medidor/Controlador de pH (pH-metro), 3. Medidor/Controlador de temperatura (Termopar), 4. Agitador mecánico, 5. Dosificador de NaOH.

La reacción se llevo a cabo a pH 8,5, durante la reacción de hidrólisis se rompen los enlaces peptídicos lo que hace que varíe su pH teniendo de esta manera que adicionarse una base (NaOH 1M) para controlar el pH de la

reacción, manteniéndolo constante. La relación de E/S utilizada ha sido de 0,3% (**Parrado y col., 1993**). Una vez terminado el proceso de hidrólisis, el hidrolizado se enfrió, se centrifugó a 8.000 x g durante 20 min y el sobrenadante (hidrolizado) se guardó a 4 °C o a -80 °C para su posterior análisis.

Las hidrólisis con volúmenes menores a 2 L se llevaron a cabo como se ha indicado anteriormente (ver Figura-M&M.13), y para volúmenes mayores se ha utilizado un reactor automatizado de 5 L (Biostat A), como se muestra en la Figura-M&M.12, operado bajo las mismas condiciones.

Las enzimas utilizadas para realizar las hidrólisis han sido las siguientes (Tabla-M&M.4):

**Alcalase® 2,4 L FG:** Es una endoproteasa bacteriana (*Bacillus licheniformis*) altamente eficaz, desarrollada especialmente para la hidrólisis de todo tipo de proteínas cuya presentación es como líquido claro y traslucido, de color marrón rojizo, completamente soluble en agua. Tiene una actividad declarada de 2,4 Unidades Anson por gramo (UA/g) y cumple con las especificaciones de pureza recomendadas para enzimas de grado alimenticio, establecidas por la Junta del Comité de expertos de la FAO/OMS JECFA y FCC.

**Flavourzyme® 1000 L:** Es un complejo proteasa/peptidasa predominantemente con actividad exoproteasa (**Merz y col., 2015**), de origen fúngico, desarrollada para la hidrólisis de proteínas bajo condiciones neutras o ligeramente ácidas. La actividad se especifica en unidades Leucina

aminopeptidasa por gramo (LAPU/g). Una LAPU es la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de L-leucina p-nitroanilida por min. Presenta actividad endoproteasa y exoproteasa, es líquida y cumple con las especificaciones de pureza recomendadas para enzimas de grado alimenticio, establecidas por la Junta del Comité de expertos de la FAO/OMS JECFA y FCC.

**Bioproteasa LA-450:** es un preparado enzimático líquido purificado, que presenta una alta actividad proteolítica. Se obtiene a partir de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis* y, por sus características de estabilidad y resistencia al pH y la temperatura, resulta idónea para procesos de hidrólisis enérgicos. Es una enzima de calidad alimentaria. Es un líquido transparente color ámbar, presenta una actividad proteolítica óptima entre pH 7 y 11. La temperatura máxima de utilización es de 60 °C, pero se recomienda el procesado a 55 °C para tiempos mayores de 10 min. Su peso específico se encuentra entre 1,110 - 1,120 g/mL.

**Papaína:** es una tio-proteasa (*thiol proteasa*) que tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos formados por aminoácidos aromáticos unidos a restos de arginina, lisina o glutamina, preferentemente. Es una enzima proteolítica que se obtiene a partir del látex de la fruta verde de la papaya antes que comience su maduración. La papaína, se caracteriza por ser un polvo amorfo, granuloso de color blanco, grisáceo o parduzco; ligeramente higroscópico e insoluble en agua y en la mayoría de solventes orgánicos. Es soluble en alcohol etílico y metílico. Su temperatura óptima es de 65 °C y su rango de pH óptimo está entre 5-8. Tiene un punto isoelectrico de 9,6. El peso molecular es 23,4 kDa.

### 3.4.2 Hidrólisis Secuencial

La hidrólisis secuencial consiste en hidrolizar en una primera etapa con una cierta enzima durante 1 hora y luego agregarle otro tipo de enzima hasta finalizar el proceso que dura 2 horas, todo el proceso se lleva a cabo bajo las mismas condiciones y de acuerdo a los parámetros establecidos de pH, temperatura, agitación y concentración de Enzima/Sustrato.

### 3.4.3 Determinación del Grado de Hidrólisis

El grado de hidrólisis (*Degree of Hydrolysis*, DH) se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos durante la reacción enzimática con relación a los enlaces que se encontraban presentes inicialmente y se puede calcular de acuerdo a la siguiente expresión:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

Donde,  $h$  es el número de equivalentes de enlaces peptídicos rotos por gramo de proteína y  $h_{tot}$  el número total de equivalentes de enlaces peptídicos por gramo en la proteína nativa. Este último se calcula a partir de la composición de aminoácidos en la proteína. En concreto, para las proteínas del champiñón se establece un valor de 5,45 meqv/g.

Para la determinación del DH se ha empleado el método del pH-stat (**Adler-Nissen, 1986**). Esta técnica permite el seguimiento continuo del DH mediante la medida de la cantidad de base añadida para mantener constante el pH durante el proceso. La ecuación que relaciona ambas variables es:



$$DH = \frac{V_B \times N_B}{M_P} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

Donde,  $V_B$  es el volumen de base añadida (mL),  $N_B$  es la normalidad de la base,  $M_P$  es la masa molecular de la proteína (g),  $h_{tot}$  es el número de enlaces peptídicos de la proteína original (meqv/g) y  $\alpha$  es el grado de disociación media de los grupos amino liberados durante la hidrólisis.

### **3.5 Análisis electroforético**

#### **3.5.1 Electroforesis Unidimensional, PAGE-SDS**

El método PAGE-SDS es el más ampliamente utilizado para analizar cualitativa y semi-cuantitativamente mezclas de proteínas separándolas en función de su tamaño (masa molecular). Este método, mediante la utilización de proteínas patrones o estándares, de masa molecular conocida, se puede utilizar para determinar la masa molecular relativa ( $M_r$ ) de las proteínas. El sistema utilizado en el presente trabajo ha sido el de Laemmli (**Laemmli, 1970**), que usa glicina en el tampón de corrido, y es capaz de resolver mezclas de proteínas en el rango de masa molecular de ~200,000 daltons a ~15.000 daltons.

#### **3.5.2 Electroforesis de Péptidos, Tricina –PAGE- SDS**

El análisis de los hidrolizados, fundamentalmente constituidos por péptidos y oligopéptidos se ha llevado a cabo mediante el procedimiento propuesto por Schagger y von Jagow basado en el uso de tricina en el tampón de corrido del compartimento superior, donde la glicina se ha reemplazado por tricina

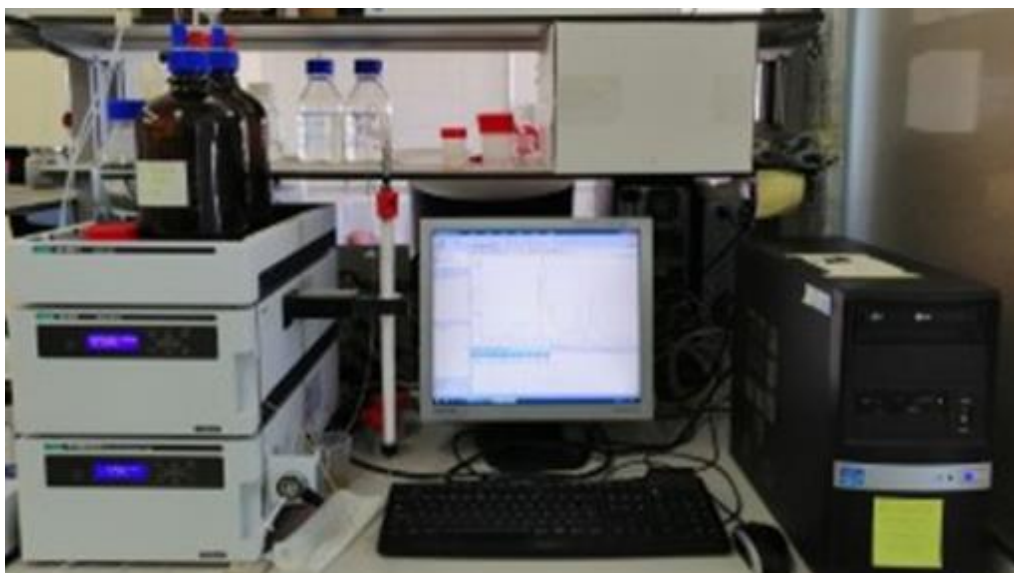
(Schägger y Von Jagow, 1987). Este sistema permite la resolución de péptidos pequeños, hasta 3.000 - 5.000 Da, lo que lo hace adecuado para el mapeo de péptidos por PAGE-SDS.

Brevemente las electroforesis se han corrido en un gel de separación al 10% y un gel de empaque al 4%, tampones en el compartimento superior e inferior diferentes: tampón buffer inferior (0,2 M Tris-HCl, pH 8,9), tampón buffer superior (0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1% (p/v) SDS, pH 8,3 (Schägger y Von Jagow, 1987). Una vez preparadas las muestras en el correspondiente mixer o tampón de muestra 4X (0,02 M Tris-HCl pH 6,8, 20%  $\beta$ -mercaptoetanol, 4,6% SDS, 40% glicerol, 0,01% Azul de Bromofenol, y agua csp.), y cargadas las muestras en sus correspondientes pocillos, las electroforesis se han corrido a intensidad constante, 30 mA/gel hasta que el bromofenol sale por el frente. Terminada la electroforesis y sacado el gel del cassette, las bandas de proteína se fijaron en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 30 min (para geles de 0,7 mm de espesor) o durante 60 min (para geles de 1,6 mm de espesor) antes de teñir con azul de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva blue G) al 0,025% en ácido acético al 10% durante 1 a 2 h, según el grosor y la composición de los geles o *overnight*. La destinción de los geles se ha llevado a cabo en una solución de ácido acético al 10% durante 2 h con agitación suave. La tinción de "fijación" rápida y la de destinción son esenciales en el caso de péptidos para evitar su elución del gel. Con el fin de detectar bandas presentes a muy baja concentración (no detectables por el azul de Coomassie) los geles se han teñido también por plata (GE Healthcare, Barcelona, España). Una vez teñidos, los geles se han digitalizado en el sistema de imágenes Gel Doc™ XR + (Bio-Rad Laboratorios, CA, USA).

### 3.6 Cromatografía de Exclusión

Con el fin de analizar también oligopéptidos (< 1000 Da) y tri-, dipéptidos y aminoácidos libres (no detectables por PAGE-SDS, las muestras se han analizado también por cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel.

La cromatografía de exclusión se ha llevado a cabo en un equipo de HPLC (Jasco, Tokio, Japón) equipado con una bomba semipreparativa PU-4086-Binary Semipreparative Pump (Jasco, Japón), un detector UV/visible UV-4075 (Jasco, Tokio, Japón) y una columna Superdex<sup>TM</sup> Peptide 10/300 GL (GE HealthCare, UK). El volumen de muestra cargado ha sido de 20  $\mu$ L y la elución de las proteínas se ha llevado a cabo con tampón fosfato 100 mM/NaCl 0,25 M a un flujo de 0,5 mL/min.



**Figura M&M.14** HPLC (Jasco, Tokio, Japón) equipado con una bomba semipreparativa PU-4086-Binary Semipreparative Pump (Jasco, Japón).

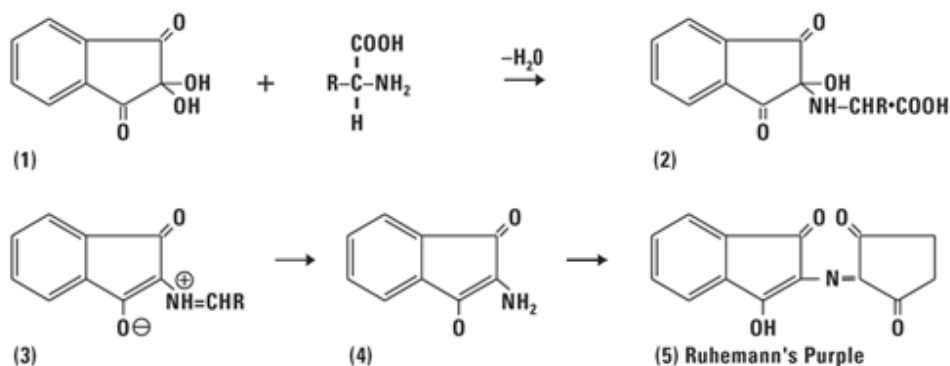
### 3.7 Análisis de Aminoácidos

El análisis de aminoácidos se ha llevado a cabo en el Servicio de Microanálisis de la Universidad de Sevilla (CITIUS), una vez hidrolizadas las muestras con HCl 6 N, a 121 °C durante 20 horas, siguiendo el procedimiento descrito por Stein y More (**Stein y Moore, 1973**).

La tecnología necesaria para llevar a cabo el análisis cuantitativo de aminoácidos fue desarrollada por Stein, Moore y colaboradores en la década de los 50. El análisis de aminoácidos consta de cuatro pasos: i) Hidrólisis de la proteína (HCl 6N, 110 °C durante 20-24 horas); ii) Derivatización de los aminoácidos con un reactivo químico que permita su detección; iii) Separación cromatográfica de los aminoácidos derivatizados; y iv) Interpretación de los resultados.

Para el análisis de aminoácidos se ha utilizado el analizador Biochrom 30 (Biochrom Ltd, UK) (ver Figura-M&M.15) que utiliza la metodología clásica de análisis de aminoácidos basada en cromatografía de intercambio iónico y derivatización postcolumna con ninhidrina. Tras la separación cromatográfica, el derivado ninhidrina-aminoacídico eluido de la columna, conocido como púrpura de Ruhemann, se detecta por absorbancia a 570 y 440 nm (Pro). A partir del cromatograma resultante es posible establecer la identidad, proporción y cantidad de los aminoácidos que conforman la proteína hidrolizada. El límite de detección de la técnica es ~10 pmol (50 pmol para la prolina). La derivatización con ninhidrina presenta la ventaja de ser bastante tolerante frente a la presencia de contaminantes en la muestra como pueden ser sales, urea o pequeñas





- (1) Ninhidrina reacciona con el Aminoácido
- (2) Se forma un primer intermedio
- (3) El Intermedio decarboxila y deshidrata para dar un ión dipolar
- (4) El ión dipolar hidroliza dando la amina
- (5) La amina condensa con otra molécula de ninhidrina para dar el Púrpura de Ruhemann

**Figura M&M.16** Reacción de derivatización con ninhidrina.

### 3.8 Cuantificación de Ergotioneina

La Ergotioneina se ha cuantificado por HPLC de acuerdo con el procedimiento descrito en Cremades y col. (Cremades y col., 2015).

### 3.9 Actividades biológicas

Los hidrolizados de la HTCH se han ensayado frente a diferentes actividades biológicas: i) actividad antioxidante, ii) actividad antidiabética y iii) inhibición de la tirosinasa.

#### 3.9.1 Actividad antioxidante

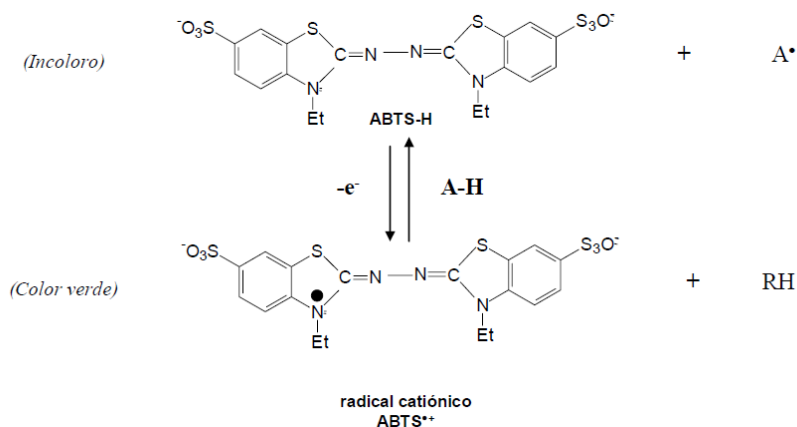
La actividad antioxidante de los hidrolizados se ha evaluado midiendo la actividad secuestradora de los radicales ABTS<sup>•+</sup>, y DPPH<sup>•</sup>, así como a través de su poder reductor y de la inhibición de la oxidación del ácido linoleico.

### – Capacidad secuestradora del radical $ABTS^{\bullet+}$

Este método se ha utilizado para medir la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de la HTCH con las diferentes proteasas, así como del extracto acuoso.

#### i) Preparación del radical $ABTS^{\bullet+}$ a partir de $ABTS-H$

La realización de este ensayo, se ha llevado a cabo de acuerdo con el método de (Rice-Evans y Miller, 1994), generando el radical  $ABTS^{\bullet+}$  (Figura M&M.17) a partir de su forma reducida que es la disponible comercialmente 2,2'-azinobis (3 etil-benzotiazolona-6-sulfonato) ( $ABTS-H$ ). Para ello, se han disueltos 0,2 g de  $ABTS-H$  en 20 mL de agua Milli Q (10 mg/mL). Adicionando a continuación y bajo agitación vigorosa 1 g de óxido de manganeso (50 mg/mL) como agente oxidante. Una vez generado el radical  $ABTS^{\bullet+}$  de color verde intenso (5 minutos aprox.), la preparación se filtra obteniendo una solución sin trazas de  $MnO$ . La absorbancia final de la preparación debe alcanzar valores cercanos a la unidad a una longitud de onda de 414 nm.



**Figura M&M.17** Reacción de oxidación-reducción para la formación del radical  $ABTS^{\bullet+}$  y de su forma reducida  $ABTS-H$ .

### *ii) Medida de la capacidad antioxidante de los hidrolizados*

La determinación de la capacidad captadora del radical ABTS<sup>•+</sup>, se ha llevado a cabo espectrofotométricamente mezclando en cubetas de 3 mL de metacrilato: 100 µL de diferentes concentraciones de hidrolizado (0 - 1 mg/mL) con 2,9 mL de la solución de ABTS<sup>•+</sup>, agitando vigorosamente e incubando a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 15 min. Posteriormente, se ha medido la absorbancia a 414 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 2100pro UV/Visible (GE Healthcare, Barcelona, Spain). El radical ABTS<sup>•+</sup> es estable entre 15 y 60 minutos. Las determinaciones se han realizado por triplicado.

La actividad captadora de ABTS<sup>•+</sup> se expresa de forma porcentual como la cantidad de radical captado por el extracto antioxidante, calculándolo según la ecuación:

$$\% \text{ ABTS}^{\bullet+} = [1 - (A_m/A_c)] \times 100$$

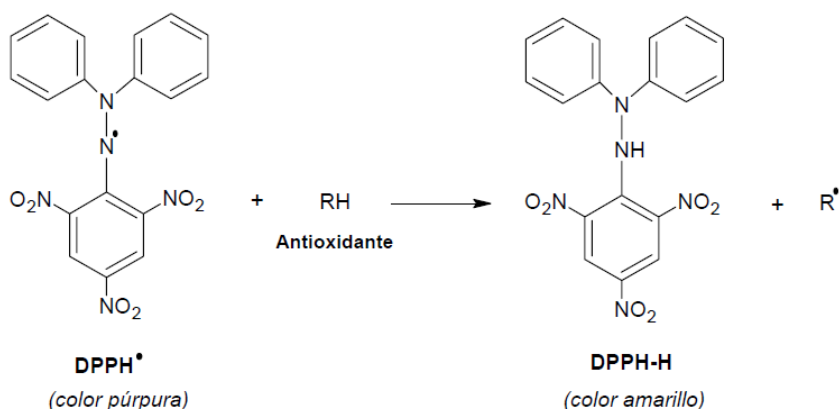
Donde:  $A_c$  es la absorbancia de la disolución control de ABTS<sup>•+</sup> a los 15 min de incubación;  $A_m$  = absorbancia de la muestra a los 15 minutos.

Una vez calculado el porcentaje de ABTS<sup>•+</sup> captado para cada una de las concentraciones de las muestras de hidrolizado utilizadas, se ha representado el % de captación frente a la concentración de cada muestra y se ha calculado el valor de EC<sub>50</sub> para cada muestra. El EC<sub>50</sub> se define como la concentración de muestra a la que se produce el 50% de captación del radical, por lo que los extractos con menor EC<sub>50</sub> son mejores antioxidantes.



### – Capacidad secuestradora del radical DPPH•

La determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados de HTCH se ha evaluado como la capacidad de los mismos para captar radicales libres según el método propuesto por (Sanchez-Moreno y col., 1998). Para dicha determinación se ha utilizado el radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo hidrato), (Figura-M&M.18) ya que su forma como radical presenta un color morado intenso, mientras que su forma reducida tiene un color amarillo.



**Figura M&M.18** Reacción coloreada del radical DPPH• (color púrpura) en presencia de un antioxidante para producir DPPH-H reducido (color amarillo).

De este modo se puede medir la desaparición del radical DPPH•, debida a la capacidad de captación de radicales libres de las muestras de hidrolizados, mediante la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. Esta determinación se efectúa utilizando distintas concentraciones de hidrolizado, de tal manera que permita la construcción de una curva: absorbancia vs concentración, donde se refleje el porcentaje de radical DPPH• remanente en cada caso. Utilizando la parte lineal de dicha curva se puede establecer por interpolación la cantidad de muestra necesaria para producir un 50% de

reducción del porcentaje de radical DPPH•, (EC<sub>50</sub>).

### *i) Medida de la capacidad antioxidante de los hidrolizados*

En cubetas desechables de 1 mL de metacrilato, se añaden 100 µL de los hidrolizados con concentraciones comprendidas entre (0 y 10 mg/mL), y 900 µL de una solución metanólica de DPPH• (76 µM), directamente. Así mismo, se prepara un control mediante la adición de 100 µL de agua Milli Q más 900 µL de solución metanólica del radical DPPH•. Se agitan vigorosamente y se incuban durante 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se mide su absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 2100pro UV/Visible (GE Healthcare, Barcelona, Spain), empleándose el metanol como blanco. El radical es estable durante un tiempo muy superior a los 15 minutos de medida. La determinación se realiza por triplicado.

La actividad captadora de DPPH<sup>+</sup> se ha expresado de forma porcentual como la cantidad de radical captado por la muestra antioxidante, calculándolo según la ecuación:

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} = [1 - (A_m/A_c)] \times 100$$

Donde: A<sub>c</sub> es la absorbancia de la disolución control de DPPH<sup>+</sup> al cabo de 15 min de incubación; A<sub>m</sub> es la absorbancia de la muestra al cabo de 15 minutos.

Una vez calculado el porcentaje de DPPH• captado para cada una de las concentraciones de las muestras de hidrolizado utilizadas, se ha representado el % de captación frente a la concentración de cada muestra y se ha calculado el valor de EC<sub>50</sub> para cada muestra. El EC<sub>50</sub> se define como la concentración de muestra a la que se produce el 50% de captación del radical, por lo que los extractos con menor EC<sub>50</sub> son mejores antioxidantes.

### – Actividad quelante de metales

La actividad quelante de los hidrolizados sobre el ión ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) se han llevado a cabo mediante una adaptación del método descrito por Kolayli y col. (Kolayli y col., 2004; Memarpoor-Yazdi y col., 2013).

Este método se basa en la medida de la absorbancia a 560 nm, a la cual absorbe el complejo formado por la ferrocina y el hierro ferroso libre. Si el hidrolizado presenta actividad quelante, se reduce la proporción de hierro libre, y por tanto del complejo ferroso-ferrocina, con el correspondiente descenso de la absorbancia a 560 nm.

Se ha evaluado la capacidad quelante de todos los hidrolizados y del extracto acuoso de la HTCH en comparación con ácido ascórbico utilizado como control positivo.

### 6. Procedimiento.

Se mezclaron 0,2 mL de una disolución acuosa de los hidrolizados, 1,2 mL de una disolución acuosa de 0,12 M de KCl y 5 mM de L-histidina a pH 6,8, y 0,2 mL de una disolución 0,2 mM de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Los sistemas se agitaron con un vortex. Posteriormente, se añadieron 0,4 mL de una disolución 1 mM de ferrocina y se midió la absorbancia a 560 nm, después de la incubación a temperatura ambiente durante 10 min.

La capacidad quelante se ha evaluado a distintas concentraciones de hidrolizados. Para ello se han preparado blancos sustituyendo los hidrolizados por agua, así, su absorbancia equivale a una actividad quelatante nula. Para eliminar las interferencias del color generado por la formación de complejos

hidrolizado-hierro ferroso, también se han preparado blancos formados con los hidrolizados y el hierro.

La capacidad quelante se ha expresado como la proporción de hierro ferroso ligado al compuesto complejante, y se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad quelatante (\%)} = [A_0(A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

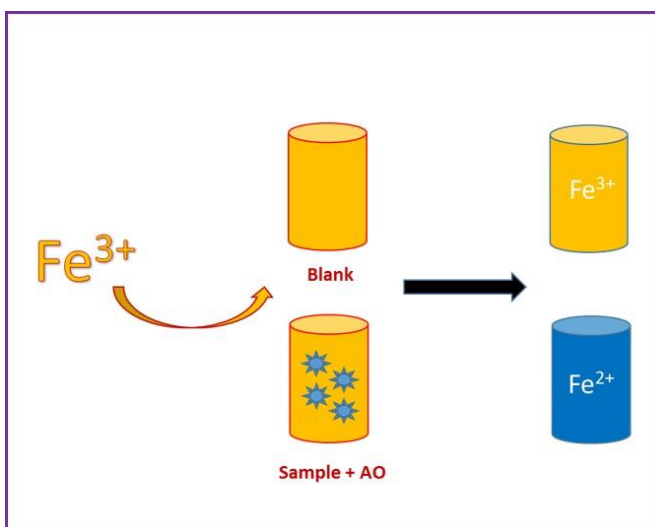
Donde  $A_0$  es la absorbancia del blanco correspondiente a la muestra sin compuesto quelante (hidrolizado),  $A_1$  es la absorbancia de la muestra en presencia del compuesto quelatante (hidrolizado) y  $A_2$  es la absorbancia del blanco formado por el compuesto quelatante (hidrolizado) y el hierro ferroso.

### – *Poder reductor férrico o Ensayo FRAP.*

El método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) mide directamente la habilidad de los antioxidantes para reducir el complejo tripiridil-triazina férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) al complejo ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) a pH ácido (Benzie y Strain, 1996). El resultado es un cambio de color, ya que el producto de la reacción muestra un color azul que se puede cuantificar espectrofotométricamente a 593 nm, existiendo una relación lineal del cromóforo formado con la capacidad reductora total de los antioxidantes donadores de electrones. La principal desventaja de este método es que no refleja necesariamente la actividad antioxidante, ya que como el método no incluye un sustrato oxidable no proporciona información sobre las propiedades de protección de los antioxidantes (Frankel y Meyer, 2000).

El poder reductor de los hidrolizados se ha determinado mediante el método FRAP, basado en el potencial de los hidrolizados para reducir los iones férricos. Este método se basa en la medida del aumento de absorbancia a 593 nm, que se produce

cuando el complejo Fe(III)-tripiridiltriacina (TPTZ) se reduce a Fe(II)-TPTZ. El complejo Fe(II)-TPTZ presenta un intenso color azul.



**Figura M&M.19** Reacción del complejo  $\text{Fe}^{3+}$  con un antioxidante.

La capacidad reductora se ha evaluado para todos los hidrolizados y el extracto acuoso de la HTCH y del correspondiente control positivo.

### – Procedimiento.

El reactivo FRAP se preparó diariamente mezclando el tampón de acetato 300 mM a pH 3,6, con una disolución 10 mM de 2,4,6-tripiridil-triazina (TPTZ) y con una disolución acuosa 20 mM de cloruro de hierro (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), en proporción 10:1:1, v/v/v. El tampón acetato se preparó por la mezcla de 3,1 g de acetato sódico trihidratado con 16 mL de ácido acético glacial, llevado a un volumen de 1 L con agua. La disolución de TPTZ se preparó en 40 mM de ácido clorhídrico.

El ensayo se ha llevado a cabo añadiendo 1,5 mL del reactivo FRAP en tubos y se incubaron en un baño de agua a 37 °C, durante 10 min. Después se añadieron sobre las muestras 150 µL de agua y 50 µL de una disolución acuosa, o metanólica, del compuesto fenólico del que se quiere medir la actividad reductora. A los 4 min de haber añadido la disolución fenólica, se determinó la absorbancia a 593 nm. En el blanco, se substituyó la disolución fenólica por agua o metanol. La capacidad reductora de los fenoles se estudió a varios niveles de concentración. La recta de calibrado se construyó con patrones acuosos de sulfato del compuesto fenólico, en la medida de su capacidad reductora. Para ello se construyó una curva de  $[\text{Fe}^{2+}]$  vs absorbancia. La actividad reductora se expresó como el valor FRAP, que indica la concentración de hierro ferroso (µmoles/L) generado en presencia del compuesto fenólico. También se estudió la posible influencia de la actividad quelatante utilizando la curva de calibrado anteriormente mencionada, en presencia de una elevada concentración de EDTA (14,7 µM).

### – *Inhibición de la oxidación del ácido linoleico o Inhibición peroxidación lipídica.*

Para determinar la capacidad inhibidora de los hidrolizados sobre la peroxidación lipídica, se ha utilizado el método de Alashi y col. (Alashi y col., 2014), basado en el uso del ácido linoleico como sustrato oxidable.

Las muestras y los controles (GSH y ácido ascórbico, AA) se disolvieron en tampón fosfato 0,1 M, pH 7 a una concentración final de 1 mg/mL. 1 mL de una disolución 50 mM de ácido linoleico (disuelto en etanol 99,7%) se mezcló con 1,5 mL de muestra (hidrolizados o controles) y de tampón (blanco), y la mezcla se incubó en oscuridad a 6 °C durante 7 días. El grado de oxidación se evaluó

midiendo el valor de ferri-cianato de acuerdo con el método descrito por Hwang y col. (Hwang y col., 2016) a intervalos de 24 horas. Brevemente, 100  $\mu$ L de muestra (hidrolizados o controles) incubados con ácido linoleico se añaden a tubos de ensayo con 4,7 mL de etanol al 75% (v/v), 0,1 mL de tiocianato amónico al 30% (p/v) y 0,1 mL de  $\text{FeCl}_2$  0,02 M disuelto en HCl 1 M, se agitan bien y se incuban a temperatura ambiente durante 3 min, y se lee la absorbancia de las muestras (hidrolizados y controles) y del blanco a 500 nm. Un aumento de la absorbancia es indicio de oxidación del ácido linoleico.

El grado de inhibición de la oxidación, expresado porcentualmente, se ha calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibition of linoleic acid (\%)} = [1 - (A_m/A_b)] \times 100$$

Donde  $A_m$  es la absorbancia de la muestra y  $A_b$  es la absorbancia del blanco.

### 3.9.2 Actividad antidiabética

Para determinar la posible actividad antidiabética de los diferentes hidrolizados se ha estudiado la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa *in vitro*.

#### – *Inhibición de la actividad $\alpha$ -Glucosidasa*

La inhibición de la actividad  $\alpha$ -Glucosidasa por los hidrolizados proteicos de la HTCH se ha medido mediante una modificación del método descrito por Bellesia y Tagliazucchi (Bellesia y Tagliazucchi, 2014). Brevemente, 0,2 mL de una preparación de  $\alpha$ -Glucosidasa (0,2 Unidades/mL) se han mezclado con

1,3 mL de tampón fosfato 67 mM, pH 6,89, y se han incubado a 30 °C durante 30 min. Seguidamente se ha añadido 1 mL de una solución 1 mM de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranos, y se ha incubado a 37 °C durante 20 min. Transcurrido este tiempo la reacción se ha parado añadiendo 3 mL de tampón carbonato 0,2 M y una vez bien mezclado, se ha medido la absorbancia de la mezcla de reacción a 400 nm. Como control positivo se ha utilizado una solución de acarbosa (1 mg/mL).

El grado de inhibición de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa se ha determinado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de inhibición (\%)} = [(A_c - A_m) / A_c] \times 100,$$

Donde  $A_c$  y  $A_m$  representan la absorbancia del control (100% de inhibición) y absorbancia de la muestra, respectivamente.

### – ***Inhibición de la actividad $\alpha$ -Amilasa***

La inhibición de la actividad  $\alpha$ -amilasa por los hidrolizados proteicos de la HTCH se ha determinado de acuerdo con el método descrito por Flores y col. (Flores y col., 2013). Brevemente, 0,5 mL de muestra se han preincubado con 0,5 mL de una solución de  $\alpha$ -amilasa con una actividad de 1 Unidad/mL (preparada en tampón fosfato 67 mM, pH 6,9/NaCl 6,7 mM) durante 10 min a 25 °C. Transcurrido este tiempo, se ha añadido 1 mL de reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS) para parar la reacción, y los tubos se han introducido en un baño de agua hirviendo durante 5 min, seguidamente se ha añadido 10 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> fría, y se ha medido la absorbancia a 575 nm.



El grado de inhibición de la actividad  $\alpha$ -amilasa se ha determinado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de inhibición (\%)} = [(A_c - A_m) / A_c] \times 100,$$

Donde  $A_c$  y  $A_m$  representan la absorbancia del control (100% de inhibición) y absorbancia de la muestra, respectivamente.

### 3.9.3 Inhibición de la actividad tirosinasa

La inhibición de la actividad tirosinasa por los hidrolizados proteicos de la HTCH se ha determinado de acuerdo con el método descrito por Choudhary y col. (Choudhary y col., 2010) con ligeras modificaciones. Brevemente, 30 unidades de tirosinasa se han preincubado con diferentes concentraciones de muestra (hidrolizados y controles) en 1 mL de tampón fosfato 50 mM, pH 6,8, durante 10 min a 25 °C. Seguidamente se han añadido 2,5 mL de L-DOPA (0,2 mM) y se ha incubado otros 10 min a 37 °C, y se ha medido lo más rápidamente posible la absorbancia a 475 nm. Como control positivo se ha utilizado una solución de ácido ascórbico de 1 mg/mL.

El grado de inhibición de la actividad  $\alpha$ -amilasa se ha determinado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de inhibición (\%)} = [(A_c - A_m) / A_c] \times 100,$$

Donde  $A_c$  y  $A_m$  representan la absorbancia del control (100% de inhibición) y absorbancia de la muestra, respectivamente.

### **3.10 Aplicación Agronómica: Evaluación de los Hidrolizados de HTCH como Biofertilizantes**

Los hidrolizados de la HTCH, debido a su composición, no sólo se caracterizan por presentar potencialmente ciertas actividades biológicas de interés medico-farmacéutico, cosmético o alimentario, sino que además podrían desempeñar un importante papel en la agronomía moderna, sobre todo como biofertilizantes.

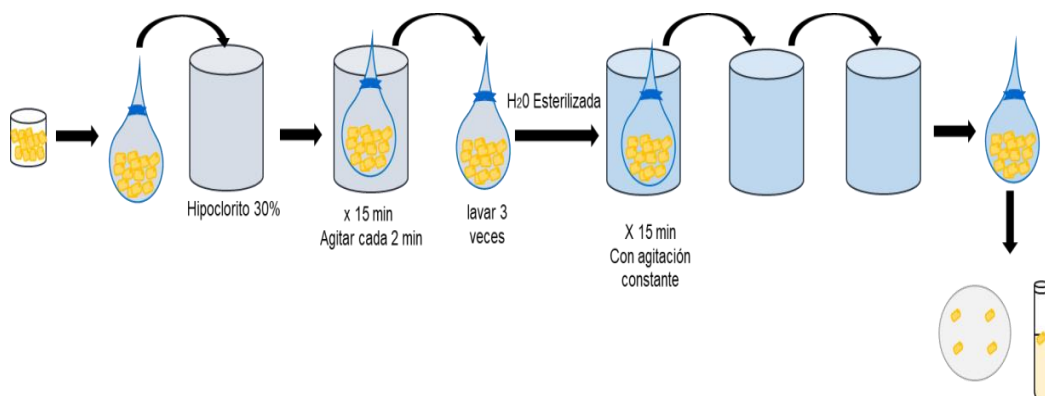
Con tal fin, se ha procedido a evaluar la actividad como biofertilizante de los hidrolizados obtenidos a partir de HTCH, para lo cual estos se han testado sobre la germinación y enraizamiento de semillas de pimiento (*Capsicum annuum*) en una primera aproximación.

#### **a) Preparación de las Semillas**

Se han utilizado semillas de pimiento (*Capsicum annuum*) suministradas por el Invernadero de la Universidad de Sevilla.

##### **- Desinfección**

Para evitar que algún tipo de contaminación pudiera afectar posteriormente en el desarrollo de la planta, las semillas se han sometido a un tratamiento desinfectante con hipoclorito al 30% como se muestra esquemáticamente en la Figura-M&M.20.



**Figura M&M.20** Proceso de desinfección de Semillas.

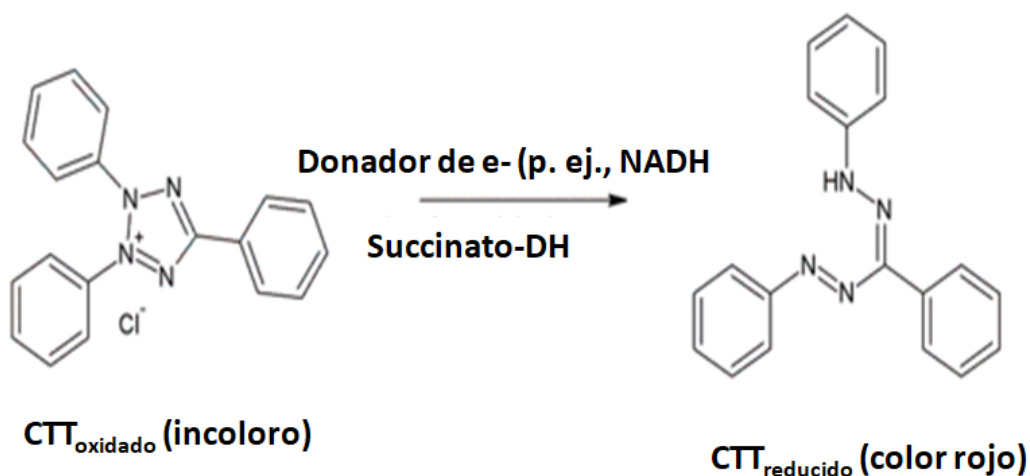
Brevemente, se colocan las semillas en una malla de tela y se cierra, la malla con las semillas se introducen en una solución de hipoclorito (NaOCl) al 30%, y se mantiene durante 15, 30, 45 y 60 min, agitando suavemente cada 2 o 3 min. A continuación se preparan 3 botes estériles con agua estéril para el lavado de las semillas, sacar la malla que contiene las semillas con una pinza estéril e introducir en los botes con agua estéril durante 15 min en cada uno con agitación suave constante. Sacar y colocar las semillas en tubos o placas estériles.

**NOTA.** *Procurar trabajar con la mayor asepsia posible, y procurar utilizar materiales autoclavados (121 °C durante 20 min) y desinfectado con etanol al 70%.*

### - **Viabilidad**

La viabilidad de la semilla se ha evaluado por medio de la prueba de Tetrazolio [cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio o simplemente cloruro de tetrazolio, (CTT)]. Para ello las semillas de pimiento se sumergieron en una solución de CTT al 1% (1 g en 100 mL de buffer fosfato, pH 6,5), durante 24-48

horas en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se examinaron en el microscopio-estereoscopio (Ossenbach y *col.*, 2007), realizándose 3 réplicas del proceso de viabilidad para cada tiempo de incubación (15, 30, 45 y 60). Las semillas viables se tiñeron de rojo, debido a la reducción del tetrazolio por la actividad respiratoria de las células (ver Figura-M&M.21). Esta prueba está aceptada por la International Seed Testing Association (ISTA, 1985).



**Figura M&M.21** Oxidación del 2,3,5-trifenil-tetrazolio.

### b) Siembra y Germinación de las Semillas

Confirmada la viabilidad de las semillas (15 min de tratamiento) se procedió a su siembra y al análisis de la germinación.

#### - **Siembra**

La siembra se ha llevado a cabo en tubos de ensayo con agar y en macetas con tierra o suelo.

La siembra en tubos de ensayo se realizó en tubos de 15 mL que contenían 10 mL de una solución preparada a distintas concentraciones de las muestras a ensayar (1%, 5% y 10%) y 1,5 % de agar para solidificar el medio. Una vez esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 min, y enfriado, de manera aséptico, se ha procedido a la siembra, una semilla por tubo. Se han ensayado 30 tubos para cada muestra.

En el caso de la siembra en tierra, se colocaron en recipientes de plástico de 10 cm de profundidad que contenían orificios en la base para permitir la entrada y salida de agua, cuidando de que no exista un exceso de agua. Una vez humedecida con agua, se procedió a colocar una semilla por maceta, y a partir de ese momento se regaron las macetas con las diferentes muestras y diferentes concentraciones (1%, 5% y 10%). Este ensayo se realizó utilizando 5 maceteros para cada muestra.

### - ***Condiciones de Germinación***

Tanto los tubos como los maceteros se han mantenido a temperatura ambiente, realizando los riegos diariamente (10 mL) durante 16, 30 días, para los tubos y macetas respectivamente.

### **c) Evaluación de la Germinación**

Una vez colocada la semilla en cada tubo se observa diariamente su germinación, se considera que la semilla ha germinado cuando la radícula alcanza una longitud mayor de 3 mm (ISTA, 2005).

### ▪ *Longitud de la Raíz*

En el caso de los cultivos en tubos de ensayo, se midió la longitud de la raíz con una regla desde la punta hasta el cuello del tallo cada 2 días desde el día 6 hasta finalizar el ensayo donde mediante el uso de una lupa se verificó el número de vellosidades presentes en la raíz, y la longitud se reportó en milímetros.

En el caso de los cultivos en maceteros la raíz fue medida al final del ensayo.

### ▪ *Longitud del Tallo*

La longitud del tallo de la plántula se midió con una regla desde el cuello del tallo hasta donde empieza a salir las hojas cada 2 días después del día 6 en el que empezó la germinación, y se reportó en milímetros.

En el caso de los maceteros se ha esperado a que se pueda observar el tallo para empezar a medir.



# **RESULTADOS Y DISCUSIONES**





### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde la primera revolución industrial el sistema de producción y consumo no ha cambiado, este sistema denominado sistema lineal se basa en la extracción de materia prima, la producción de bienes, el consumo y la generación de residuos. Como consecuencia de ellos cada vez es mayor el acúmulo de residuos que inexorablemente está destruyendo el medioambiente (**Pricipato y col., 2019; Morató, 2017**).

Es por ello que actualmente se está intentando cambiar el sistema de producción y consumo, adaptándolo al concepto de economía circular, cuyo objetivo fundamental es un cambio radical del sistema lineal que se ha venido siguiendo. Dichos cambios están enfocados hacia sistemas que sean regenerativos desde su diseño, para mantener el valor de los recursos (materiales, agua, suelo y energía), de los productos y limitando los insumos de materias primas y energía. Evitando, en lo posible, al máximo, de esta forma la acumulación de residuos y sus impactos negativos sobre el medioambiente, el clima y la salud humana (**Pricipato y col., 2019; Morató, 2017**).

Es decir, mediante una economía circular no solamente se espera responder al desafío global, como es el cambio climático, sino mantener y fortalecer el desarrollo socio-económico, creación de trabajo de manera sostenible, sin que esto afecte la función de los ecosistemas y preservando a su vez los recursos naturales para las generaciones futuras. Todo esto en base a principios de diversidad, resiliencia y pensamiento sistémico que requieren de un enfoque biotecnológico, integrando ciclos, materiales biológicos y tecnológicos.

De esta manera la economía industrial se transforma de un modelo basado en la producción a un modelo más inteligente, donde los subproductos agroindustriales, en lugar de ser un problema se transforman en una materia prima fundamental para la obtención de productos con alto valor añadido, es decir, revalorizándose, y logrando así una reducción drástica del impacto negativo que estos subproductos pueden tener sobre el medioambiente y la salud humana si no son adecuadamente procesados (**Morató, 2017**).

Por lo que en el presente trabajo nos hemos centrado en la revaloración de los subproductos provenientes de la industria de setas y hongos comestibles, concretamente del champiñón (*Agaricus bisporus*) como materia prima valorizable para la obtención de productos de alto valor para varias industrias: medico-farmacéutica, alimentaria, cosmética, química, agronómica, etc., y contribuir a la mejora y protección del medioambiente, a través de un sistema de economía circular (ver Figura-R.1).



## ECONOMÍA LINEAL



## ECONOMÍA CIRCULAR

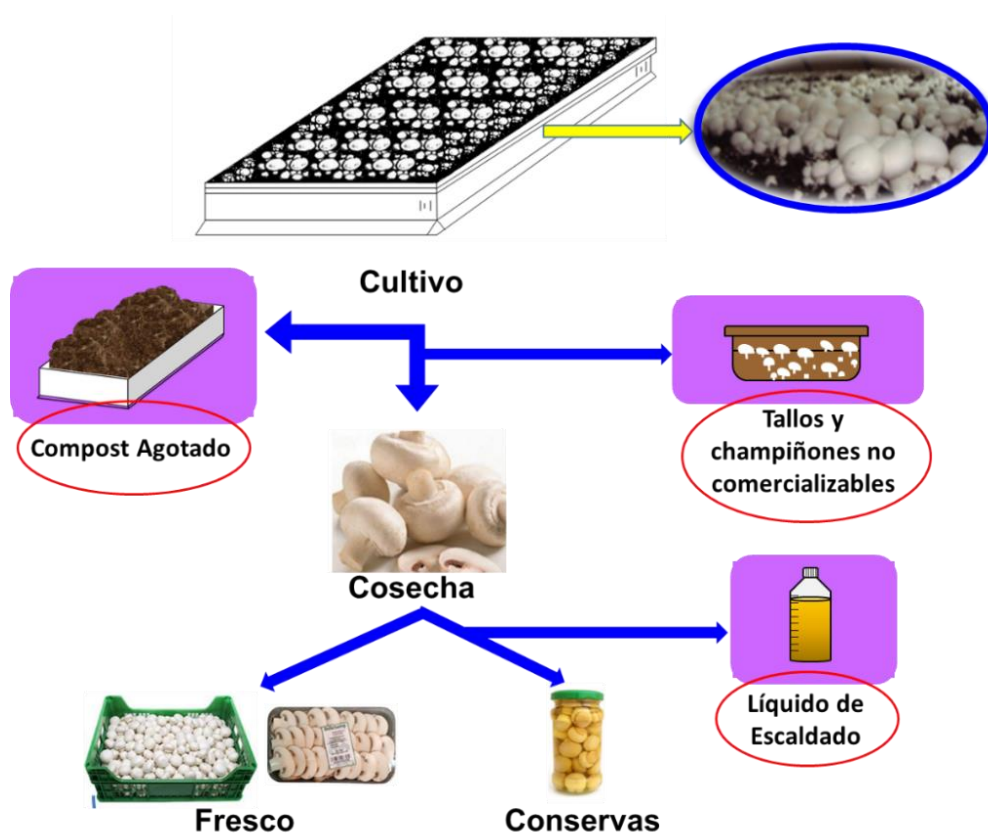
**Figura R.1** Economía lineal versus economía circular.

### *4.1 Descripción general*

Tal y como se muestra esquemáticamente en la Figura-R.2, la industria de las setas y hongos comestibles en general y la del champiñón en particular,

generan tres tipos de subproductos: i) el compost agotado, ii) los tallos y piezas no comercializables, y iii) el líquido de escaldado en el caso de las conservas. En el presente trabajo nos centraremos en la revalorización de los dos últimos: tallos y elementos no comercializables, y líquido de escaldado.

Describamos, brevemente, la generación de estos subproductos.



**Figura R.2** Generación de subproductos en el cultivo y procesamiento del champiñón.

Una vez cultivado el champiñón, la cosecha y procesamiento del champiñón para consumo en fresco o para conserva, genera entre el 25 y 30 % de productos

de desecho (tallos y champiñones no comercializables) (Cebin et al., 2018). Esto supone la generación de una gran cantidad de productos de desecho que si no se utilizan adecuadamente pueden provocar importantes problemas medioambientales, ya que se trata de una materia orgánica con un alto contenido en agua y biomoléculas, fácilmente utilizables por los microorganismos (bacterias y hongos) presentes en el medioambiente. Por otro lado, el procesamiento del champiñón en forma de conserva, genera una gran cantidad de desecho líquido, denominado líquido de escaldado, rico en metabolitos solubles: aminoácidos, péptidos, proteínas, azúcares, oligosacáridos, polisacáridos, ergotioneina, etc., que habitualmente se vierte a la red de desagües.

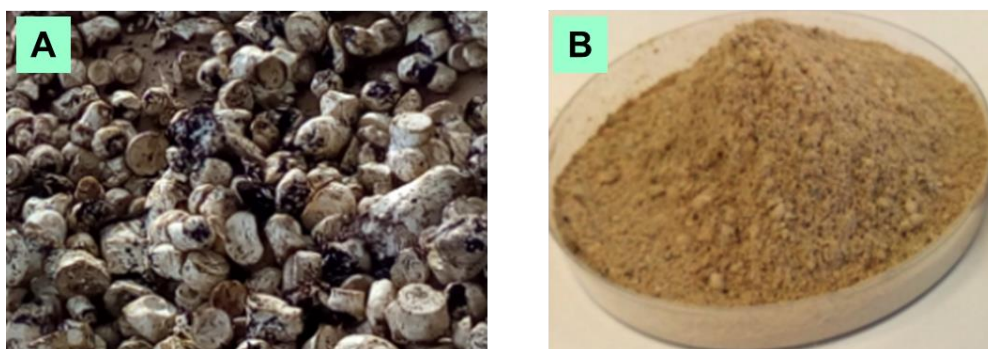
Tanto los tallos como el líquido de escaldado, debido a su composición (ricos en proteínas, hidratos de carbono y metabolitos secundarios) pueden constituir unas excelentes fuentes de partida para la obtención de diferentes productos potencialmente utilizables en la industria médico-farmacéutica y alimentaria como nutracéuticos, en la industria cosmética como nutricosméticos o en agronomía como biofertilizantes, e incluso pueden constituir una excelente fuente para fines biotecnológicos, tales como fuente de fermentación para la producción de quitinasas, o fuente de partida para la obtención de nano-quitina, siempre y cuando se desarrollen los procesos adecuados.

Sin embargo, para poder utilizar estos subproductos de una manera efectiva, es necesario, en una primera etapa estabilizarlos en una forma fácilmente almacenable y segura, ya que raramente se utilizaran de manera inmediata, y debido a su naturaleza y composición química, como ya hemos mencionado, son fácilmente deteriorables.

### 4.2 Estabilización de subproductos

#### 4.2.1 Estabilización de tallos y champiñones defectuosos (Obtención de HTCH)

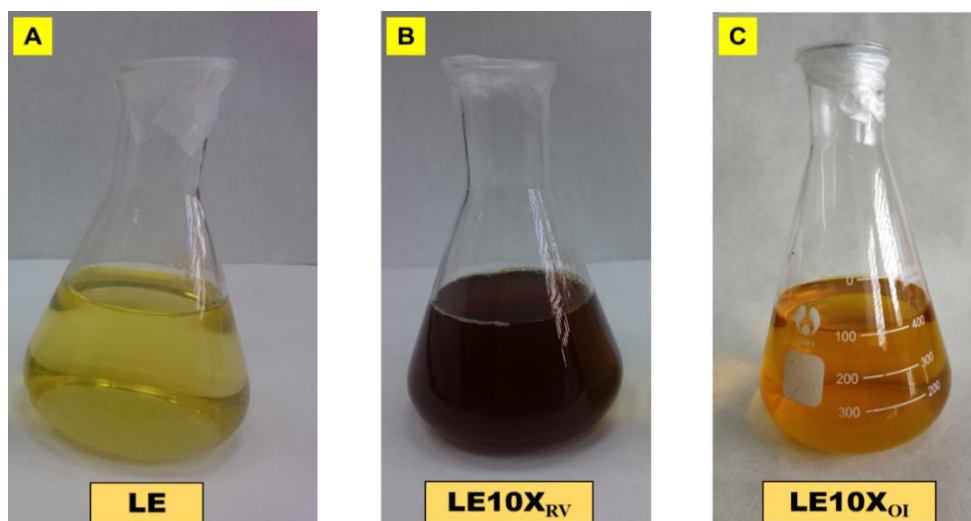
Los tallos de champiñón y champiñones defectuosos (no comercializables), una vez lavados con agua fría abundante para eliminar restos de compost y tierra, se han escurrido y se han secado con aire a 80 °C en una estufa con ventilación forzada hasta peso constante, tal y como se ha descrito en el correspondiente apartado de M&M. El producto seco se molió en un molino de pistón equipado con una malla de 0,5 mm de diámetro. Obteniéndose un polvo fino uniforme que hemos denominado harina de tallos de champiñón (HTCH) (ver Figura-R.3B) a la que hemos almacenado en bolsas de plástico herméticamente cerradas, a 18 - 20 °C en almacén, permaneciendo de esta manera estable al menos durante un año.



**Figura R.3** A) Tallos y residuos de champiñones frescos, B) Harina de tallos y residuos de champiñón (HTCH).

### 4.2.2 Estabilización del líquido de escaldado (LE10X)

El líquido de escaldado es un líquido ligeramente amarillento en el que se encuentran disueltas una gran variedad de compuestos solubles (aminoácidos, péptidos, azúcares, proteínas solubles, polisacáridos solubles, nucleótidos, etc.) y que representa un gran volumen, del orden de los 10.000 litros al día para una planta de tamaño pequeño/medio, y que habitualmente se vierte directamente a la red o a balsas para depuración. Debido al elevado volumen, para poder almacenarlo es necesario reducir su volumen, lo que se logra mediante su concentración al vacío y a temperatura entre 65-70 °C, o mejor aún mediante ósmosis inversa para evitar, en lo posible, la formación de productos de Amadori. Una vez concentrado el líquido de escaldado unas 10 veces (LE10X) este toma un ligero aspecto de sirope marrón-claro (Figura-R.4), donde los componentes están concentrados y es fácilmente almacenable a 4 °C, en cámara fría, durante al menos 3 meses.



**Figura R.4** A): Líquido de escaldado (LE), B): Líquido de escaldado concentrado 10 veces en RotaVapor (LE10X<sub>RV</sub>), C): Líquido de escaldado concentrado 10 veces por ósmosis inversa (LE10X<sub>OI</sub>).



### 4.3 Composición básica de los subproductos estabilizados

#### 4.3.1 Composición básica de la HTCH

En la Tabla-R.1 se muestra la composición básica de las HTCH de tres orígenes distintos, procedente de tres plantas de producción: Autol (La Rioja), Hellin (La Manchuela) y Los Palacios (Sevilla). La caracterización de las HTCH se ha llevado a cabo mediante la determinación de los siguientes parámetros: humedad, materia orgánica (MO), hidratos de carbono totales, grasa bruta, nitrógeno total ( $N_t$ ), proteína ( $N_t \times 5,45$ ), polifenoles, etc., y pH.

**Tabla R.1** Composición básica de las HTCH procedentes de tres orígenes distintos: Autol (La Rioja), Hellin (La Manchuela) y Los Palacios (Sevilla).

	<b>HTCH (AUTOL) (%)</b>	<b>HTCH (HELLIN) (%)</b>	<b>HTCH (LOS PALACIOS) (%)</b>
<b>HUMEDAD<sup>&amp;</sup></b>	7,3±1,2	7,4±0,9	7,5±1,4
<b>PESO SECO*</b>	92,7±1,2	92,6±0,9	92,5±1,4
<b>CENIZAS*</b>	8,8±2,3	8,9±1,9	9,1±2,1
<b>MO*</b>	91,2±2,3	91,1±1,9	90,9±2,1
<b>GRASA*</b>	3,2±0,4	3,0±0,5	3,4±0,3
<b><math>N_t</math>*</b>	5,2±0,3	5,1±0,4	5,3±0,2
<b>PROTEÍNA<sup>&amp;</sup></b>	28,6±1,7 <sup>§</sup>	28,1±1,4 <sup>§</sup>	29,2±1,5 <sup>§</sup>
<b>HC+OTROS<sup>&amp;</sup></b>	59,4±5,1	60,0±4,8	58,3±5,3
<b>ERGOSTEROL (mg/g, p.s.)*</b>	4,1±0,3	3,8±0,3	3,7±0,4
<b>ERGOTIONEINA*</b>	0,22±0,08	0,24±0,06	0,21±0,08
<b>pH*</b>	6,9±0,3	6,8±0,4	6,7±0,3

<sup>&</sup>Datos calculados; \*Datos experimentales; <sup>§</sup>factor 5,45.

Analicemos con algo más de detalle estos datos:

Una vez secados y molidos los tallos de champiñón se obtiene una harina de color marrón-claro (ver Figura-R.3B), con un contenido de humedad entre el  $7,3\pm 1,2\%$  y el  $7,5\pm 1,4\%$ , y peso seco entre el  $92,5\pm 1,4\%$  y el  $92,7\pm 1,2\%$ ; correspondiendo entre el  $8,8\pm 2,3\%$  y el  $9,1\pm 2,1\%$  (p.s.) a cenizas, y entre el  $90,9\pm 2,1\%$  y el  $91,2\pm 2,3\%$  (p.s.) a materia orgánica. Con un contenido en grasa entre el  $3,0\pm 0,5\%$  y el  $3,4\pm 0,3\%$  (p.s.), en proteína entre el  $28,1\pm 1,4\%$  y el  $29,2\pm 1,5\%$  (p.s.), y en hidratos de carbono más otros entre el  $58,3\pm 5,1\%$  y el  $60,0\pm 4,8\%$  (p.s.) (ver Tabla-R.1). Si bien, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los valores encontrados para las tres HTCH de diferentes orígenes geográficos. Probablemente a que los compost y tierras de cobertura utilizados industrialmente sean muy parecidos, a pesar de que los dos primeros han sido suministrados por el Grupo Riberebro (Haro, La Rioja) y el tercero por una empresa local de la provincia de Sevilla.

Como se puede observar el componente mayoritario de las tres HTCH analizadas son los hidratos de carbono ( $58,3\pm 5,3$  a  $60,0\pm 4,8$ ), seguido del contenido en proteínas ( $28,1\pm 1,4$  a  $29,2\pm 1,5$ ). Ambos componentes representan del orden del 86 al 89% de la materia orgánica.

En relación con los hidratos de carbono, la mayor parte de ellos son glucanos y quitina. En cuanto a las proteínas, estas se encuentran la mayor parte unidas a los hidratos de carbono, fundamentalmente a nivel de membranas y pared celular, con lo que su digestibilidad, y por tanto su valor nutritivo en principio es más bien baja. Sin embargo, el desarrollo de procedimientos que

faciliten su solubilidad favorecerán su bioaccesibilidad y por tanto su biodisponibilidad, incrementando así su valor nutricional y funcional.

En cuanto al contenido de metabolitos con interés médico-farmacéutico o nutricional, debido a su beneficio sobre la salud, el contenido en ergosterol oscila entre  $3,7\pm 0,3$  y  $4,1\pm 0,4$  mg/g, p.s., encontrados en las muestras de Los Palacios (Sevilla) y Autol (La Rioja), respectivamente; si bien, estadísticamente estos valores no son significativos. Mientras que el contenido en ergotioneina, antioxidante natural de gran interés tanto en la industria alimentaria como médico-farmacéutica y cosmética, el mayor contenido,  $0,24\pm 0,06$  mg/g, p.s., se ha encontrado en las muestras procedentes de Hellin (La Manchuela, Castilla-La Mancha) y el menor  $0,21\pm 0,08$  mg/g, p.s. en las muestras de Los Palacios (Sevilla), si bien, también en este caso las diferencias no son estadísticamente significativas. Lo que pone de manifiesto que las tres HTCH tienen prácticamente la misma composición, y que para la obtención de cualquiera de los dos metabolitos (ergosterol o ergotioneina) pueden utilizarse sin que por ello se altere significativamente el rendimiento del proceso.

### 4.3.2 Composición básica del LE10X

En la Tabla-R.2 se muestran los resultados obtenidos para la composición básica de dos LE10X procedentes de dos plantas diferentes: Autol (La Rioja) y Hellin (La Manchuela), ya que la planta de los Palacios (Sevilla) no fabrica conservas.

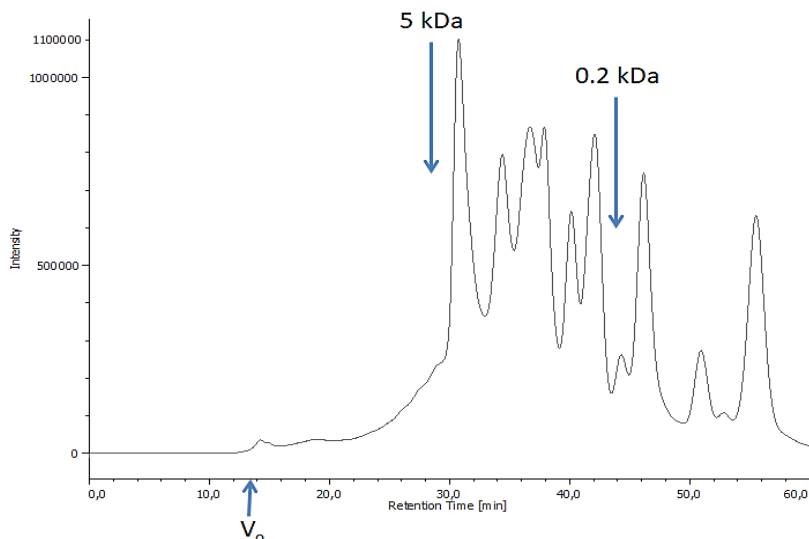
**Tabla R.2** Composición básica del LE10X procedente de dos plantas diferentes.

	<b>LE10X (Autol) (%)</b>	<b>LE10X (Hellin) (%)</b>
<b>Humedad</b>	91,0±2,1	92,2±2,5
<b>Peso seco</b>	9,0±2,1	7,8±2,5
<b>Cenizas (% p.s.)</b>	13,5±1,3	14,1±1,2
<b>Materia orgánica (% p.s.)</b>	86,5±1,3	85,9±1,2
<b>HC (% p.s.)</b>	54,5±3,4	53,8±4,4
<b>Grasa (% p.s.)</b>	n.d	n.d
<b>N<sub>t</sub> (% p.s.)</b>	4,8±0,3	4,9±0,4
<b>Proteína (N<sub>t</sub> x 6,24)</b>	30,0±2,9	30,6±4,1
<b>Aminoácidos libres (%)*</b>	18,4±0,9	19,8±1,7
<b>Oligopéptidos + Péptidos (%)*</b>	63,7±3,2	64,6±3,8
<b>Proteínas (%)*</b>	17,9±1,6	15,6±2,8
<b>Ergotioneina (mg/g, p.s.)</b>	1,3±0,1	1,2±0,2
<b>Otros (% p.s.)</b>	1,1±0,2	1,5±0,3

\* % del contenido proteico.

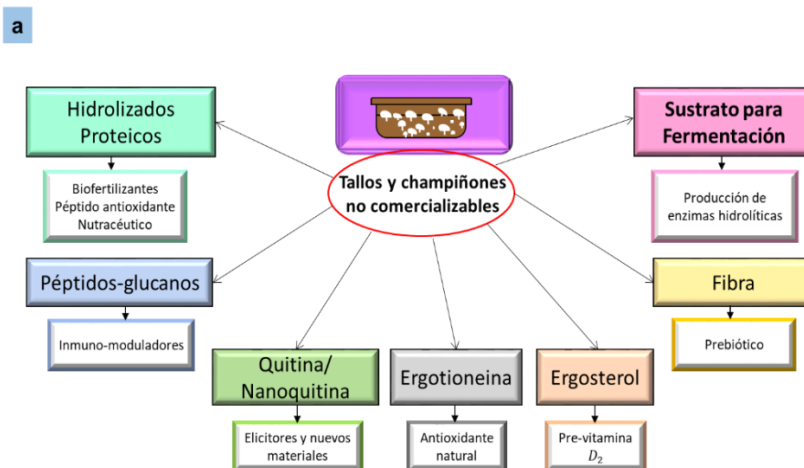
Una vez concentrado el líquido de escaldado 10 veces, se obtiene un líquido amarillo-marrón (ver Figura-R.4B), que hemos denominado LE10X, con un contenido de humedad (agua) entre el 91,0±2,1% y el 92,2±2,5%, y peso seco entre el 7,8±2,5% y el 9,0±2,1%; correspondiendo entre el 13,5±1,3% y el 14,1±1,2% (p.s.) a cenizas, y entre el 85,9±1,2% y el 86,5±1,3% (p.s.) a materia orgánica; con un contenido en hidratos de carbono del orden del 54% (53,8±3,4% y 54,5±3,4%) (p.s.), fundamentalmente constituido por productos solubles como azúcares, oligosacárido, y sacáridos solubles (glucanos). El contenido proteico es del orden del 30% (30,0±2,9% y 30,6±4,1%) (p.s.), constituido fundamentalmente por aminoácidos libres (18,4±0,9 y 19,8±1,7),

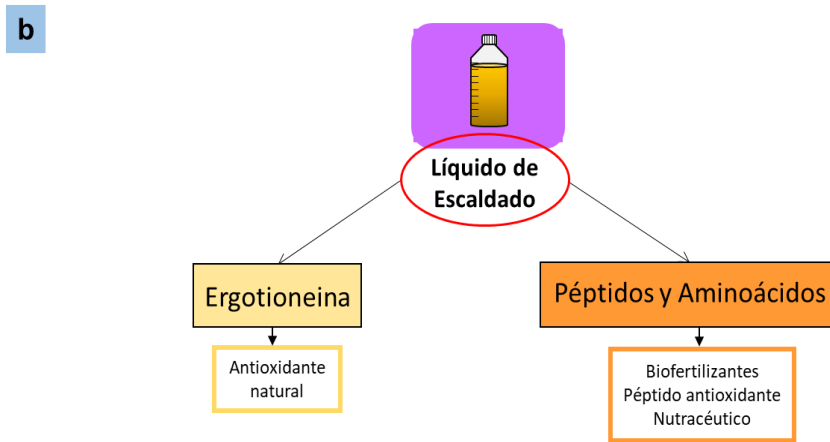
oligopéptidos + péptidos,  $<5$  kDa ( $63,7\pm 3,2$  y  $64,6\pm 3,8$ ) y proteínas solubles  $>5$  kDa ( $15,6\pm 1,6$  y  $17,9\pm 2,8$ ) (ver Figura-R.5 y Tabla-R.2).



**Figura R.5** Cromatograma del LE10X obtenido por cromatografía de exclusión en una columna Superdex™Peptide 10/300 GL.

Teniendo en cuenta la composición de cada uno de estos subproductos (HTCH y LE10X), estos pueden utilizarse como materia prima de partida para la obtención de diversos productos de alto valor añadido, como se muestra esquemáticamente en la Figura-R.6.





**Figura R.6** Productos de interés industrial que se podrían obtener de: a) Tallos y champiñones no comercializables, b) Líquido de escaldado.

Así, la HTCH puede utilizarse para la obtención de hidrolizados proteicos, péptido-glucanos, quitina y nano-quitina, ergotioneina, ergosterol (precursor de la vitamina-D<sub>2</sub>), fibra e incluso como sustrato rico en quitina y glucanos para la producción de hidrolasas (quitinasas, glucanasas y proteasas). Por su parte el LE10X es una buena materia prima de partida para la obtención de aminoácidos libres y péptidos, así como de ergotioneina, potencialmente utilizable como biofertilizante y/o nutracéutica.

#### ***4.4 Diseño de procesos biotecnológicos para la valorización de subproductos de la industria de los hongos y setas comestibles: Aplicación al champiñón***

Como hemos descrito más arriba, el procesamiento del champiñón genera dos subproductos importantes la HTCH y el LE, ambos susceptibles de valorización si se desarrollan los procedimientos adecuados.

### 4.4.1 Valorización de la HTCH

La valorización de este subproducto pasa necesariamente por el desarrollo de procesos biotecnológicos eficientes. En la Figura-M&M.11 de Materiales y Métodos se muestran esquemáticamente un abordaje biotecnológico, basado en el uso de enzimas, para la obtención de productos de alto valor añadido de interés industrial, tales como hidrolizados proteicos, quitina-nanoquitina, ergotioneina, péptido-glucanos, o ergosterol (pre-vitamina-D<sub>2</sub>), etc.

En el presente trabajo nos hemos centrado en la obtención de los siguientes productos:

- **Hidrolizados** ricos en aminoácidos, oligopéptidos y péptidos potencialmente utilizables como biofertilizantes en agronomía, o como nutracéuticos en alimentación o en cosmética.
- **Péptidos-glucanos** para su utilización como nutracéuticos en el tratamiento y prevención de enfermedades inmuno-deficientes.
- **Quitina y nano-quitina fúngica** para su utilización como materia prima para la preparación de quitino-oligosacáridos altamente demandados en la agronomía moderna (biocontrol), así como en el desarrollo de nuevos materiales.

Dependiendo del producto final a obtener, el proceso se desarrollará bien por la vía A) o B). La vía B) es la más eficiente para la obtención de hidrolizados proteicos, mientras que la vía A) es la más adecuada para la obtención de péptido-glucanos, siendo indistinta la vía a seguir para la obtención de ergotioneina o quitina/nano-quitina fúngica.





Como podemos observar el paso fundamental de este procedimiento es el tratamiento con proteasas, encaminado a la desproteización de la HTCH. Este tratamiento enzimático genera un sobrenadante o hidrolizado proteico y un precipitado o material insoluble-I. El hidrolizado proteico, como más adelante discutiremos, está integrado por aminoácidos, oligopéptidos, péptidos y proteínas solubles, así como también por otras moléculas solubles como azúcares, oligosacáridos y polisacáridos, además del antioxidante ergotioneína, mientras que el material insoluble-I está integrado, fundamentalmente, por glucanos, quitina, mananos y proteínas covalentemente unidas a algunos de estos polisacáridos.

La decisión por la variante B se tomó tras el análisis de las cantidades de producto recuperadas en forma soluble e insoluble, que se recogen en la Tabla-R.3. Estos datos muestran que la cantidad de producto soluble recuperado por la variante A es del  $34,3 \pm 0,4\%$  mientras que por la variante B se recupera el  $41,3 \pm 1,1\%$ , diferencia que podría sugerirnos que no es lo significativamente importante como para justificar el uso de una etapa enzimática, que generalmente es un proceso caro, debido al coste de las enzimas. Sin embargo si nos fijamos en la cantidad de producto proteico recuperado, el producto recuperado por la variante A contiene un  $23,6 \pm 0,2\%$  de material proteico mientras que el obtenido por la variante B contiene el  $36,8 \pm 1,5\%$ . Diferencia significativamente mayor, y que como más adelante discutiremos, en base a sus posibles aplicaciones sí justificaría sobradamente el uso de enzimas, proteasas en concreto, para esta etapa o fase del proceso de valorización de la HTCH.

**Tabla R.3** Balance de masas para la vía A) y B) del proceso biotecnológico utilizado para la recuperación de material hidrosoluble de la HTCH.

	HTCH (g)	Precip-I (g)	% Insoluble	% Soluble	Sobren. (g, p.s.)	Sobren. (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína (g)	Proteína (%)
<b>Vía A)</b>	36,2	23,9	66,02209945	33,9779006	12,3	330	8,8	2,904	23,6097561
	36,3	23,7	65,2892562	34,7107438	12,6	340	8,7	2,958	23,47619048
	35,8	23,5	65,6424581	34,3575419	12,3	325	9	2,925	23,7804878
<b>Media±DS</b>	<b>36,1±0,3</b>	<b>23,7±0,2</b>	<b>65,6±0,4</b>	<b>34,3±0,4</b>	<b>12,4±0,2</b>	<b>331,7±7,6</b>	<b>8,8±0,2</b>	<b>2,9±0,1</b>	<b>23,6±0,2</b>
<b>Vía B)</b>	36,5	21,2	58,08219178	41,9178082	15,3	370	14,7	5,439	35,54901961
	35,8	20,8	58,10055866	41,8994413	15	350	15,6	5,46	36,4
	36,2	21,7	59,94475138	40,0552486	14,5	362	15,4	5,5748	38,44689655
<b>Media±DS</b>	<b>36,2±0,4</b>	<b>21,2±0,4</b>	<b>58,7±1,1</b>	<b>41,3±1,1</b>	<b>14,9±0,4</b>	<b>360,7±10,1</b>	<b>15,2±0,5</b>	<b>5,5±0,1</b>	<b>36,8±1,5</b>

### a) Hidrólisis enzimáticas

La hidrólisis de proteínas puede llevarse a cabo mediante métodos químicos (utilizando ácidos fuertes concentrados, generalmente HCL 6M ó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M y a temperaturas altas >75 °C), y enzimáticos (utilizando proteasas, a pHs y temperaturas *cuasi*-fisiológicas). La hidrólisis enzimática tiene ventajas sobre la hidrólisis química, ya que durante la hidrólisis ácida determinados aminoácidos son completamente destruidos (triptofano), y otros son degradados significativamente (cisteína, metionina, serina, etc.) (Zumwalt y col., 1987), mientras que en la hidrólisis enzimática estas pérdidas no tienen lugar, manteniéndose prácticamente constante o inalterado el contenido aminoacídico de la muestra.

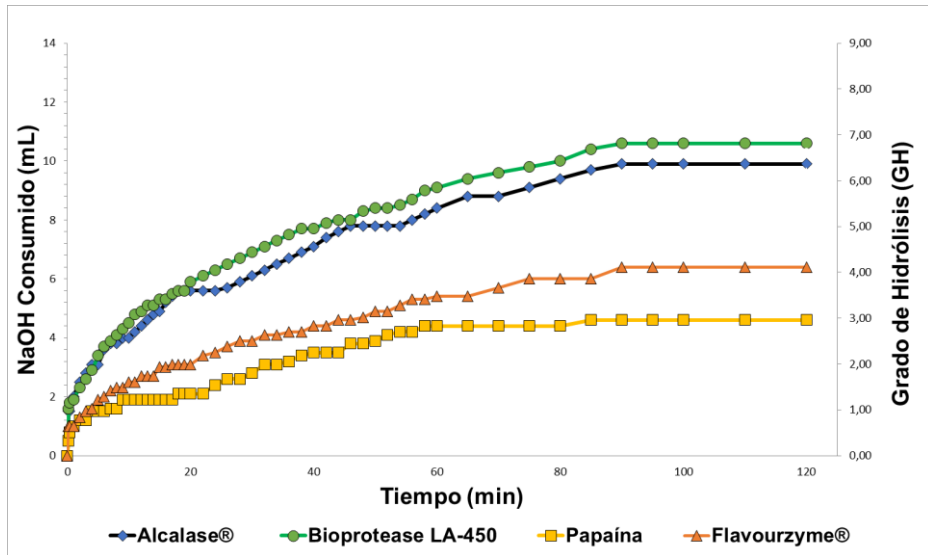
En el presente trabajo se han utilizado cuatro proteasas: tres endo-proteasas (Alcalase®, Papaína y Bioprotease LA-450) y una exoproteasa (Flavourzyme®), comercialmente disponibles (ver Tabla-R.4).

**Tabla R.4** Enzimas utilizadas en la hidrólisis de la HTCH.

Nombre Comercial de las Proteasas	Código E.C.	Microorganismo productor
Alcalase®	3.4.21.62	<i>Bacillus licheniformis</i>
Bioprotease LA-450	3.4.21.99	<i>Bacillus licheniformis</i>
Papaína	3.4.22.2	<i>Cariaca papaya</i>
Flavourzyme®		<i>Aspergillus oryzae</i>

En la Figura-R.8 se muestran las curvas de hidrólisis de la HTCH con las cuatro proteasas. Como se observa el grado de hidrólisis aumenta

significativamente con el transcurso del tiempo hasta llegar a las 2 horas donde, a partir de este tiempo, se mantiene estable. Es por este motivo que se eligió este tiempo como tiempo de hidrólisis para la generación de los correspondientes hidrolizados de la HTCH.



**Figura R.8** Hidrólisis enzimática de la HTCH con las proteasas: Alcalase®, Flavourzyme®, Bioprotease LA-450 y Papaína.

Como podemos observar las hidrólisis más eficientes, es decir, la que conducen a un mayor grado de hidrólisis o cantidad de enlaces peptídicos rotos, se logra con la Bioprotease LA-450 y la Alcalase®,  $6,65 \pm 0,6$  y  $6,21 \pm 0,9$ , respectivamente, y los grados más bajos se alcanzan con la Papaína y la Flavourzyme®:  $2,88 \pm 0,2$  y  $4,01 \pm 0,3$ , respectivamente. Si bien, el grado de hidrólisis es el parámetro que determina la eficiencia de un proceso de hidrólisis enzimática con proteasas, al ser un parámetro teórico, no es directamente medible, no es un parámetro idóneo para seguir el proceso hidrolítico desde un

punto de vista práctico. Sin embargo, el consumo de NaOH, que está directamente relacionado con el grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1986) sí es un parámetro medible, fácil de obtener y útil para el seguimiento del proceso de hidrólisis.

Los grados de hidrólisis alcanzados no son lo altos que cabría esperar para un sustrato con una concentración de proteína del orden del 30% como es la HTCH. Sin embargo, teniendo en cuenta que una parte importante de las proteínas de la HTCH son proteínas de membrana, en las que estas están unidas covalentemente a algún componente membranal, fundamentalmente glucanos o quitina (García-Mendoza, 2000), esto dificulta estéricamente una degradación o fraccionamiento completo de la cadena polipeptídica quedando siempre un fragmento unido al polisacárido u otra posible molécula.

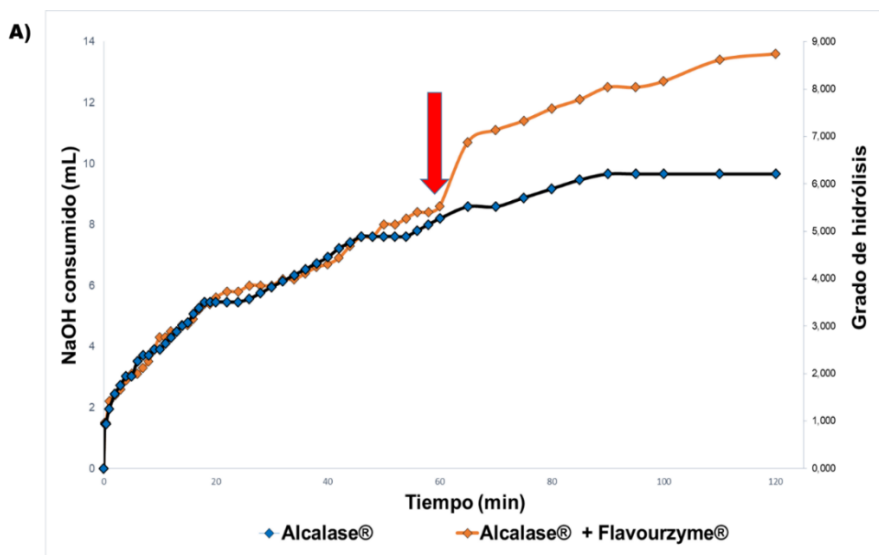
En la Tabla-R.5 se recoge el balance de masas, referido al peso seco, del material insoluble (precipitado) y material soluble (sobrenadante), recuperado tras la hidrólisis enzimática con las cuatro proteasas ensayadas: Alcalase®, Bioprotease LA-450, Papaína y Flavourzyme®.

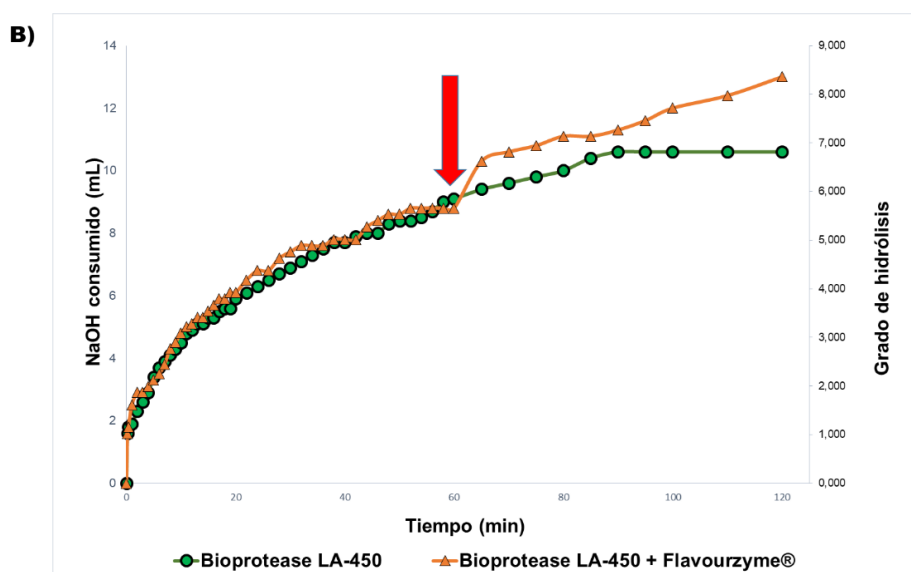
**Tabla R.5** Balance de masas, referido al peso seco recuperado en el precipitado y en el sobrenadante, tras la hidrólisis enzimática simple de la HTCH.

ENZIMA	HTCH (g)	Precipitado (g)	Sobrenadante (g)	Rendimiento (%)	Proteína (%)
Alcalase®	30	16,2±1,3	12,5±0,9	41,7±3,0	76,3±3,1
Bioprotease LA-450	30	13,8±1,0	13,9±1,1	46,3±3,6	77,2±2,7
Papaína	30	19,3±2,2	8,0±0,7	26,3±2,3	49,4±2,0
Flavourzyme®	30	20,1±1,7	6,9±0,5	23,0±1,7	41,3±1,6

Como puede observarse, las endoenzimas, procedentes de *Bacillus licheniformis*: Alcalase® y Bioprotease LA-450, son las que mayor cantidad de producto solubilizan,  $41,7\pm 3,0\%$  y  $46,3\pm 3,6\%$ , respectivamente, mientras que la Papaína, enzima de origen vegetal, *Cariaca papaya*, y la Flavourzyme®, mezcla predominante de exoproteasas bacterianas, presentan un rendimiento solubilizador más bajo,  $26,3\pm 2,3\%$  y  $23,0\pm 1,7\%$ , respectivamente.

Con el fin de incrementar, en lo posible, el grado de hidrólisis, y por tanto, probablemente, la cantidad de material solubilizado se procedió a la realización de hidrólisis secuenciales, utilizando primero una endoproteasa y seguidamente una exoproteasa. Las hidrólisis secuenciales realizadas han sido las siguientes dos combinaciones: “Alcalase® + Flavourzyme®” y “Bioprotease LA-450 + Flavourzyme®”. En la Figura-R.9 se muestra el perfil de ambas hidrólisis secuenciales.





**Figura R.9** Hidrólisis enzimática secuencial vs hidrólisis enzimática simple: A) Alcalase® vs “Alcalase® + Flavourzyme®” y B) Bioprotease LA-450 vs “Bioprotease LA-450 + Flavourzyme®”.

Como puede observarse en el caso de la hidrólisis secuencial en ambos casos se obtiene un mayor grado de hidrólisis.  $8,53 \pm 0,3$  en el caso del par: “Alcalase® + Flavourzyme®” y  $8,15 \pm 0,4$  en el caso del par “Bioprotease LA-450 + Flavourzyme®”. Es decir en ambos casos se alcanza prácticamente el mismo grado de hidrólisis ya que la diferencia entre uno y otro no es estadísticamente significativa. Por lo que cualquiera de las dos combinaciones sería efectiva, si la calidad del nuevo hidrolizado justificara el incremento de coste que conlleva el uso de dos enzimas.

El incremento en el grado de hidrólisis podríamos atribuirlo a que tras la primera hora de hidrólisis (endoproteasas) la cantidad de sustrato disponible es mucho mayor, ya que al ser los componentes de la Flavourzyme® mayoritariamente exoproteasas (amino-peptidasas) (Merz y col., 2015) los puntos de ataque (hidrólisis) son mayores que cuando actúa la endoproteasa, ya

que a este nivel la mayoría de los puntos de corte o hidrólisis ya han sido rotos.

**Tabla R.6** Balance de masas, referido al peso seco recuperado en el precipitado y en el sobrenadante, tras la hidrólisis enzimática secuencial de la HTCH.

ENZIMA	HTCH (g)	Precipitado (g)	Sobrenadante (g)	Rendimiento (%)	Proteína (%)
Alcalase® + Flavourzyme®	30	12,9±2,1	15,8±1,3	52,7±4,3	79,6±2,9
Bioprotease LA-450 + Flavourzyme®	30	13,6±1,0	15,4±1,1	51,3±3,6	81,4±3,3

### ***b) Caracterización de los Hidrolizados***

Una vez obtenidos los hidrolizados estos se han caracterizado desde el punto de vista de su composición química, y en cuanto a la distribución molecular de sus componentes proteicos mediante análisis electroforético (PAGE-SDS) y cromatográfico (cromatografía de exclusión molecular), así como a determinadas propiedades y/o funcionalidades: actividad bioestimulante, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana y actividad antivírica.

#### **▪ *Caracterización básica***

La caracterización básica se ha llevado a cabo mediante el análisis del contenido en cenizas, materia orgánica, materia proteica, hidratos de carbono, grasa y otros, tal y como se muestra en la Tabla-R.7.



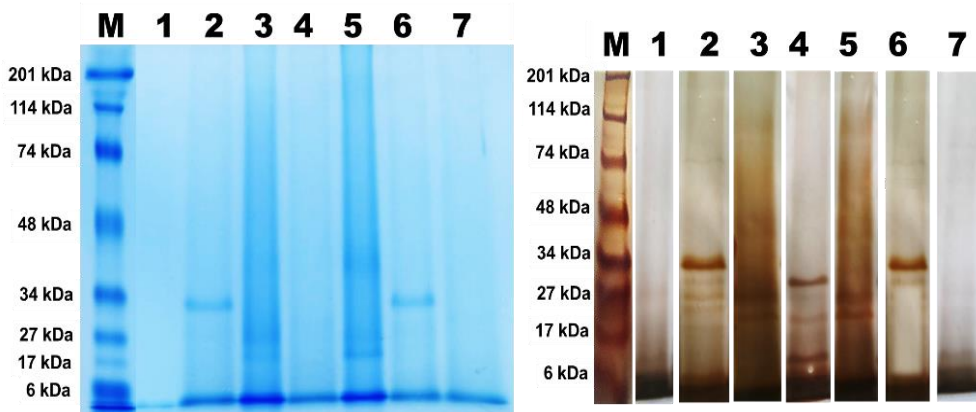
**Tabla R.7** Composición básica de los hidrolizados proteicos de la HTCH (HPTCH<sub>X</sub>) en comparación con el extracto acuoso de la HTCH (HTCH<sub>H2O</sub>).

	<b>Peso seco (%)</b>	<b>Cenizas (%) p.s.</b>	<b>Materia Orgánica (%) p.s.</b>	<b>Proteínas<sub>totales</sub> (%) p.s.</b>	<b>Carbohidratos<sub>totales</sub> (%) p.s.</b>	<b>Otros (%) p.s.</b>
<b>HTCH<sub>H2O</sub></b>	8,8±0,4	7,6±0,3	92,4±0,3	25,7±1,7	67,1±4,3	7,2±0,8
<b>HPTCH<sub>A</sub></b>	41,7±3,0	9,2±0,6	90,8±0,6	61,3±3,9	32,5±3,8	6,2±0,5
<b>HPTCH<sub>LA450</sub></b>	46,3±3,6	9,4±0,3	90,6±0,3	51,9±4,8	41,1±4,1	7,0±0,6
<b>HPTCH<sub>P</sub></b>	26,3±2,3	8,9±0,9	91,1±0,9	32,8±3,0	58,1±3,2	9,1±1,3
<b>HPTCH<sub>F</sub></b>	23,0±1,7	9,1±0,8	90,9±0,8	38,8±2,1	54,4±4,4	6,8±0,4
<b>HPTCH<sub>A+F</sub></b>	52,7±4,3	9,6±0,7	90,4±0,7	52,4±4,2	40,4±3,2	7,2±0,5
<b>HPTCH<sub>LA450+F</sub></b>	51,3±3,6	9,3±0,6	90,7±0,6	48,9±3,7	44,2±3,7	6,9±0,5

**HPTCH<sub>H2O</sub>**: Extracto acuoso HTCH; **HPTCH<sub>A</sub>**: Hidrolizado Proteico Alcalase®; **HPTCH<sub>LA450</sub>**: Hidrolizado Proteico Bioproteasa LA-450; **HPTCH<sub>F</sub>**: Hidrolizado Proteico Flavourzyme®; **HPTCH<sub>P</sub>**: Hidrolizado Proteico Papaína; **HPTCH<sub>A+F</sub>**: Hidrolizado Proteico Alcalasa+Flavourzyme; **HPTCH<sub>LA450+F</sub>**: Hidrolizado Proteico Bioproteasa LA-450 + Flavourzyme.

▪ **Caracterización electroforética**

Con el fin de obtener información sobre el tamaño de los péptidos presentes en los hidrolizados se ha llevado a cabo un estudio electroforético utilizando en primera estancia geles de PAGE-SDS, no observándose banda alguna al teñirlo con azul de Coomassie (Resultados no mostrados). Teniendo en cuenta que la modificación de este procedimiento sustituyendo el tris por tricina en el tampón de corrido permite una separación más eficiente de péptidos de bajo peso molecular (Schäger y von Jagow, 1987), se separaron mediante este procedimiento los distintos hidrolizados. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura-R.10.



**Figura R.10** Gel de electroforesis en geles para péptidos, (según Schäger) de los diferentes hidrolizados proteicos y del extracto acuoso de la HTCH.

(M: marcadores de peso molecular; 1:  $\text{HTCH}_{\text{H}_2\text{O}}$ ; 2:  $\text{HPTCH}_{\text{A}}$ ; 3:  $\text{HPTCH}_{\text{P}}$ ; 4:  $\text{HPTCH}_{\text{LA450}}$ ; 5:  $\text{HPTCH}_{\text{F}}$ ; 6:  $\text{HPTCH}_{\text{A}+\text{F}}$ ; 7:  $\text{HPTCH}_{\text{LA450}+\text{F}}$ ).

Como podemos observar en el extracto acuoso de la HTCH (carril-1) no se observan proteínas de masa molecular apreciable, entre 201 y 6 kDa, dado que la gran mayoría de las proteínas están unidas covalentemente a alguna otra

biomolécula (fundamentalmente polisacáridos), y posiblemente, la pequeña cantidad, de proteínas solubles, sea tan baja que no se pueden detectar con la tinción de azul de Coomassie (del orden de 0,5 µg por banda). La tinción con plata, tinción unas diez veces más sensible, tampoco permite detectar proteínas de tamaño grande (resultados no mostrados). Sin embargo, ¿cómo podemos explicar el valor de contenido proteico de  $25,7 \pm 1,7$  % del extracto acuoso de HTCH? Esto podría explicarse porque en el extracto acuoso únicamente se encuentren aminoácidos libres, oligopéptidos (di-, tri-, tetra-péptidos, etc.) y péptidos de masa molecular  $< 6$  kDa, que durante la electroforesis han salido fuera del gel y por tanto no se pueden teñir y detectar.

Sin embargo, en el carril 2 (hidrolizado de HTCH con Alcalase®) se observa claramente una banda de unos 30 kDa, probablemente debido a la liberación y solubilización de un fragmento proteico de ese tamaño, así mismo se observa una banda intensa, de unos 5 kDa, que corre con el frente de la electroforesis, probablemente correspondiente a péptidos de este orden de tamaño.

Análogamente, en el carril 3 (hidrolizado de HTCH con Papaína) se observan claramente 2 bandas, una de 27 kDa y otra de 20 kDa, correspondientes a fragmentos proteicos liberados y solubilizados por la Papaína. En este caso también se observa una banda intensa, de unos 5 kDa, que corre con el frente de la electroforesis, y probablemente corresponda a péptidos de este orden de tamaño.

En el caso del carril 4 (hidrolizado de HTCH con Bioproteasa LA-450) se logran distinguir tres bandas de 29 kDa, 20 kDa y 10 kDa que corresponderían a

fragmentos de proteínas con este peso molecular, de la misma manera se observa la banda intensa que corre con el frente de la electroforesis y que podría estar constituida por péptidos del orden de los 5 kDa.

El hidrolizado de HTCH con Flavourzyme® se ha analizado en el carril 5, donde se observa tenuemente dos bandas, una banda de 41 kDa, y una de 27 kDa y otra banda intensa de 17 kDa que correspondería a péptidos de ese tamaño, además de la banda de los 5 kDa que corre con el frente.

En el carril 6 (hidrolizado de HTCH con Alcalase®+Flavourzyme®) se observa una banda de 30 kDa que aparece también en el carril 2 lo que significa que tanto en el carril 2 como en el carril 6 existe la presencia de la misma proteína. En este caso la banda, de 5 kDa, que corre con el frente, es más tenue, probablemente a que los péptidos de este tamaño hayan sido degradados por la actividad exoproteasa de la Flavourzyme® generándose oligopéptidos y aminoácidos libres que salen fuera del gel durante la electroforesis.

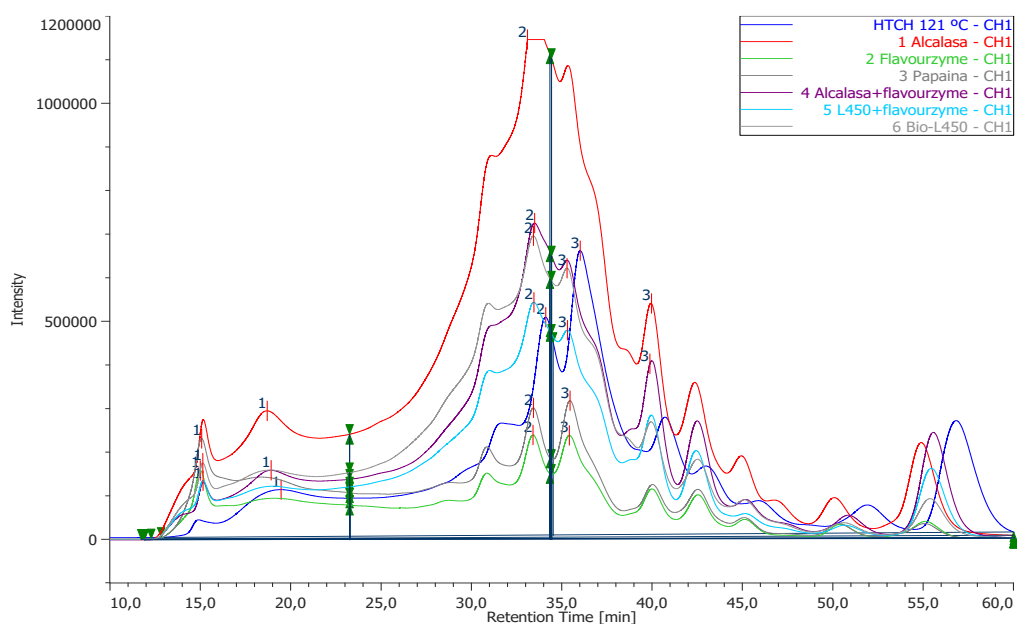
Por ultimo en el carril 7 (hidrolizado de HTCH con Bioproteasa LA-450+Flavourzyme®) a pesar de haber cargado la misma concentración de muestra que en los anteriores carriles no es visible ninguna banda de proteína, podría deberse a que la muestra no presenta proteínas en el rango de recorrido del gel.

### ▪ *Caracterización cromatográfica (Cromatografía de Exclusión)*

Con el fin de obtener información más detallada sobre la distribución del tamaño de las proteínas, péptidos, oligopéptidos y aminoácidos presentes en los hidrolizados, se procedió a su estudio por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex<sup>TM</sup>peptide 10/300 GL, que tiene un rango de resolución de 7000 a 100 kDa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura-R.11 y Figura-R.13, correspondientes a los cromatogramas obtenidos a 215 nm y 280 nm, respectivamente. El análisis del perfil de fraccionamiento por exclusión a 215 nm nos permitiría identificar una mayor cantidad de di y tripeptidos, además de oligopéptidos.

Los perfiles se han separado en áreas de acuerdo al peso molecular para lograr identificar el porcentaje de proteínas encontradas en este rango.

Todas las proteínas encontradas con un tamaño menor a 0,2 kDa pueden o podrían ser utilizadas como antioxidante.



**Figura R.11** Caracterización de los hidrolizados enzimáticos por Cromatografía de Exclusión (215 nm).

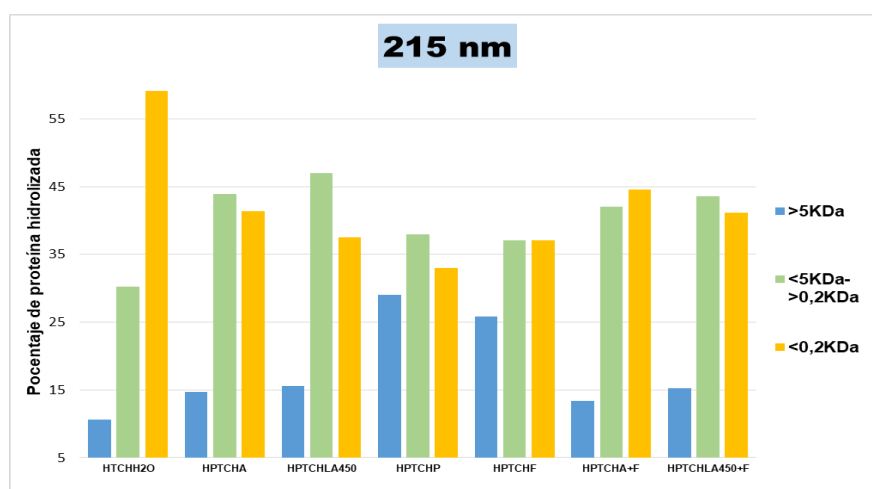
En la Figura-R.11 se muestra el perfil cromatográfico, a 215 nm, para cada uno de los hidrolizados y para el extracto acuoso, dividido en tres grandes zonas o áreas:  $>5$  kDa,  $<5$  kDa y  $>0,2$  kDa, y  $<0,2$  kDa. La zona “ $>5$  kDa”, constituida por proteínas y péptidos mayores de 5 kDa; la zona “ $<5$  kDa y  $>0,2$  kDa”, constituida por péptidos y oligopéptidos menores de 5 kDa, y mayores de 0,2 kDa, y la zona “ $<0,2$  kDa” constituida por dipéptidos y aminoácidos libres. Los perfiles cromatográficos individuales se muestran en anexos Figura-A.1 y Figura-A.2.

En la Tabla-R.8 y Figura-R.12, se muestra la contribución porcentual de cada zona o área, respecto del total, para cada hidrolizado y el extracto acuoso. Como se puede observar, el mayor porcentaje de aminoácidos libres se encuentran en el extracto acuoso de HTCH (59,16%), lo que no es de sorprender

ya que la mayor parte de las proteínas en la HTCH están unidas a polisacáridos. En relación con los HPTCH, los mayores porcentajes de dipéptidos y aminoácidos libres se encuentran para los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis secuencial con Alcalase®+Flavourzyme® y Bioproteasa+Flavourzyme®, 44,57% - 41,12% respectivamente, lo que podría atribuirse a las exoproteasas presentes en la Flavourzyme®.

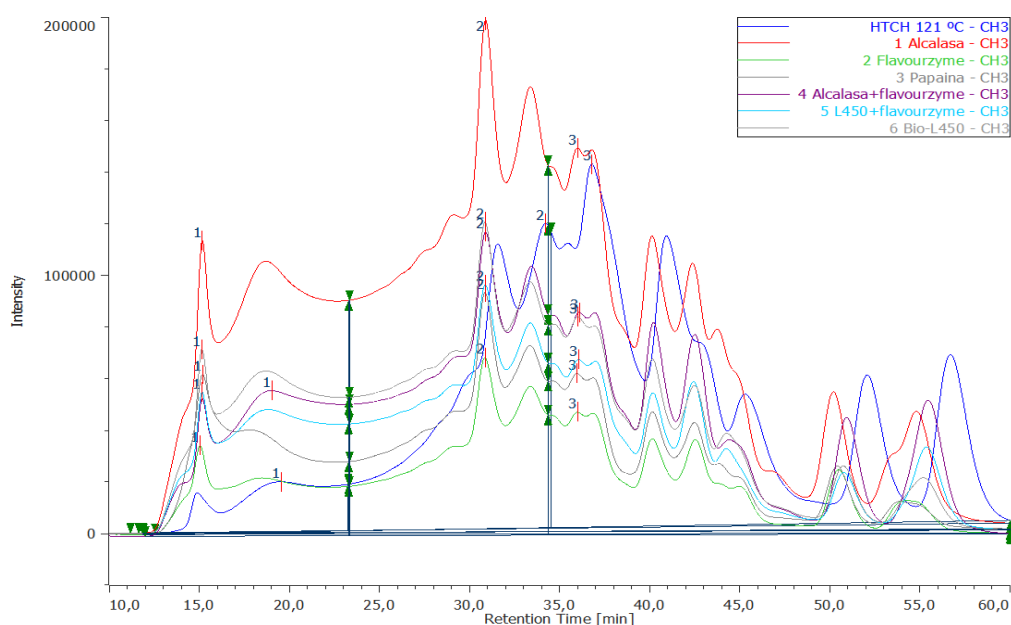
**Tabla R.8** Contribución porcentual para cada una de las zonas seleccionadas en los cromatogramas (215 nm).

215 nm	>5kDa (%)	<5kDa->0,2kDa (%)	<0,2kDa (%)
HTCH <sub>H2O</sub>	10,64	30,19	59,16
HPTCH <sub>A</sub>	14,7	43,96	41,33
HPTCH <sub>LA450</sub>	15,56	46,96	37,47
HPTCH <sub>P</sub>	29,02	37,98	32,98
HPTCH <sub>F</sub>	25,86	37,09	37,03
HPTCH <sub>A+F</sub>	13,42	42	44,57
HPTCH <sub>LA450+F</sub>	15,28	43,58	41,12



**Figura R.12** Porcentaje de proteína hidrolizada en cada muestra (Cromatografía de Exclusión \*215 nm).

En la Figura-R.13 se muestra el perfil cromatográfico, a 280 nm, para cada uno de los hidrolizados y para el extracto acuoso, dividido en tres grandes zonas o áreas:  $>5$  kDa,  $<5$  kDa y  $>0,2$  kDa, y  $<0,2$  kDa. La zona “ $>5$  kDa”, constituida por proteínas y péptidos mayores de 5 kDa; la zona “ $<5$  kDa y  $> 0,2$  kDa”, constituida por péptidos y oligopéptidos menores de 5 kDa, y mayores de 0,2 kDa, y la zona “ $<0,2$  kDa” constituida por dipéptidos y aminoácidos libres.



**Figura R.13** Caracterización de los hidrolizados enzimáticos por Cromatografía de Exclusión (280 nm).

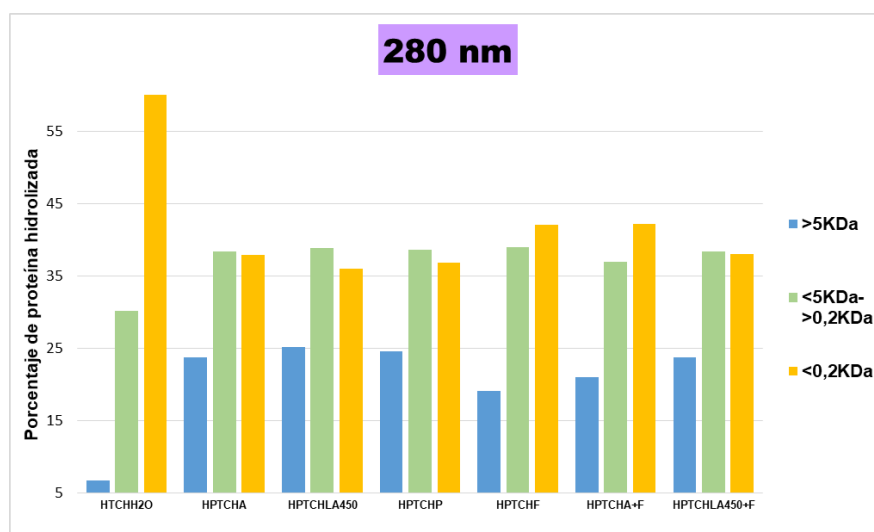
En la Tabla-R.9 y Figura-R.14, se muestra la contribución porcentual de cada zona o área, respecto del total, para cada hidrolizado y el extracto acuoso. Como se puede observar, en este caso el mayor porcentaje de aminoácidos libres se encuentran en el extracto acuoso de HTCH (63,12%), lo que no es de sorprender ya que la mayor parte de las proteínas en la HTCH están unidas a polisacáridos. En relación con los HPTCH, los mayores porcentajes de



dipéptidos y aminoácidos libres se encuentran para los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis secuencial con Alcalase®+Flavourzyme® y Bioproteasa+Flavourzyme®, 42,13% - 37,94% respectivamente, lo que podría atribuirse a las exoproteasas presentes en la Flavourzyme®.

**Tabla R.9** Contribución porcentual para cada una de las zonas seleccionadas en los cromatogramas (280 nm).

280 nm	>5kDa (%)	<5kDa->0,2kDa (%)	<0,2kDa (%)
HTCH <sub>H2O</sub>	6,68	30,19	63,12
HPTCH <sub>A</sub>	23,71	38,35	37,92
HPTCH <sub>LA450</sub>	25,13	38,88	35,98
HPTCH <sub>P</sub>	24,58	38,58	36,83
HPTCH <sub>F</sub>	19,05	38,92	42,02
HPTCH <sub>A+F</sub>	20,97	36,89	42,13
HPTCH <sub>LA450+F</sub>	23,75	38,3	37,94



**Figura R.14** Porcentaje de proteína hidrolizada en cada muestra (Cromatografía de Exclusión \*280 nm).

### ▪ **Composición aminoacídica de los HPTCH**

Cada vez hay más información de que la composición aminoacídica, conjuntamente con la estructura y su hidrofobicidad, influye marcadamente en las actividades biológicas de los péptidos, fundamentalmente las antioxidantes (**Sarmadi y Ismail, 2010; Zhao y col., 2012**). Por ello antes de pasar a estudiar diversas actividades biológicas, potencialmente presentes en los HPTCH hemos estudiado la composición aminoacídica de los diferentes hidrolizados obtenidos en el presente estudio.

En la Tabla-R.10 se muestra la composición aminoacídica de los diferentes HPTCH y del HTCH<sub>H2O</sub>. Como se puede observar los HPTCH se caracterizan por su alto contenido en Asx y Glx, lo que se refleja en el alto valor para los aminoácidos con carga negativa (AAsCN), además de Ala, Leu y Lys. Los aminoácidos con carga positiva (AAsCP) le confieren a los péptidos su actividad antioxidante, debido a la abundancia de electrones que pueden donarse para secuestrar los radicales libres (**He y col., 2013**).

La Cys es aminoácido limitante tanto en el HTCH<sub>H2O</sub> como en los diferentes HPTCH, no pasando su contenido de  $2,17 \pm 0,07$  mg/g de proteína, es decir con un contenido del orden del 0,2%, mientras que el otro aminoácido azufrado, la Met, se encuentra en cantidades ligeramente mayores:  $4,63 \pm 0,22$  y  $4,23 \pm 0,87$  mg/g de proteína en HPTCH<sub>LA450</sub> y HPTCH<sub>LA450+F</sub>, respectivamente, valores relativamente bajos, pero comparables a los encontrados en algunos hidrolizados de proteínas vegetales, como por ejemplo en los hidrolizados de proteínas de colza (**He y col., 2013**). La Met tiene la capacidad de donar el hidrógeno de su grupo sulfuro, por lo que se considera como un buen secuestrador de radicales.

En cuanto a los aminoácidos aromáticos (AAA) con un contenido de 63,92 a 72,01 mg/g proteína en HPTCH<sub>LA450+F</sub> y HPTCH<sub>A</sub>, respectivamente, presenta valores del orden del 0,7%, que constituye valores semejantes a los encontrados en otros hidrolizados de fuentes proteicas vegetales diferentes. Los AAA podrían contribuir a mejorar la capacidad secuestradora de radicales a través de la donación de protones para la estabilización de radicales con deficiencia electrónica, mientras que mantienen su propia estabilidad a través de efectos resonantes en su estructura (Sarmadi y Ismail, 2010).

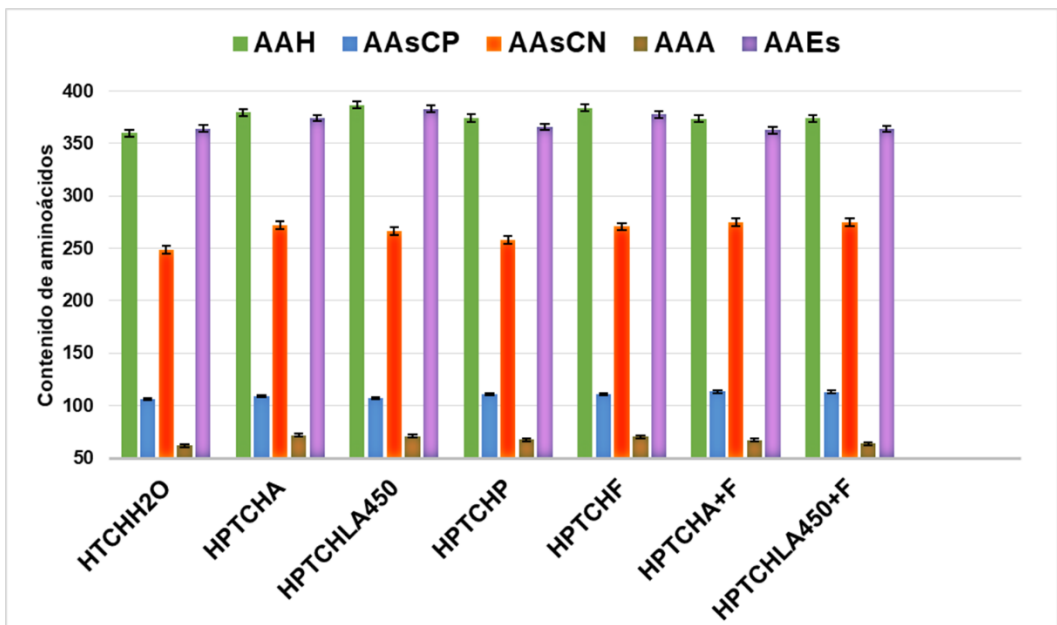
Todos los HPTCH presentan un mayor contenido en aminoácidos hidrofóbicos (AAH) que el HTCH<sub>H2O</sub> ( $p < 0,05$ ), contenido que supera el 37%. El alto contenido en AAH en los hidrolizados viene dado por sus contenidos en Ala, Leu, Ile y Val, fundamentalmente. Los AAH mejoran la solubilidad de los péptidos en medios lipídicos, aumentando su interacción con los radicales libres, y/o favoreciendo la entrada en órganos diana mediante asociaciones hidrofóbicas, lo que ha sido descrito para varios hidrolizados de proteínas alimentarias (Alashi y col., 2014; Najafian y Babji, 2014).

La presencia de prácticamente todos los aminoácidos esenciales (AAEs) en los HPTCH en cantidades equivalentes a las recomendadas por los estándares de la FAO/HWO (FAO y WHO, 1991), muestra/indican su buena calidad nutritiva, además de sus propiedades antioxidantes. Desde este punto de vista los mejores hidrolizados son: el HPTCH<sub>LA450</sub> y el HPTCH<sub>F</sub>, con un contenido de 383,18 y 377,59 mg/g de proteína, respectivamente.

En la Figura-R.15 se muestra en un gráfico de barras el contenido en aminoácidos hidrofóbicos (AAH), aminoácidos con carga positiva (AAsCP),

aminoácidos con carga negativa (AAsCN), aminoácidos aromáticos (AAA) y aminoácidos esenciales (AAEs) para cada uno de los HPTCH, mientras que en la Figura-R.16 se presenta en contenido aislado de cada uno de los grupos aminoacídicos en cada HPTCH. Como podemos ver los HPTCH se caracterizan por un contenido relativamente alto de AAH, AAEs y AAsCP, y un bajo contenido en AAA.

De particular interés es el contenido alto en AAH, fundamentalmente aminoácidos ramificados (Leu, Ile y Valina) y el bajo contenido en AAA, hace que estos hidrolizados presenten una razón de Fischer ( $[AAH]/[AAA]$ ) alta, lo que los hace idóneos para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas, fundamentalmente la encefalopatía hepática (Casco-Lorence, 2010).



**Figura R.15** Contenido en aminoácidos hidrofóbicos (AAH), aminoácidos con carga positiva (AAsCP), aminoácidos con carga negativa (AAsCN), aminoácidos aromáticos (AAA) y aminoácidos esenciales (AAEs) para cada uno de los HPTCH.

**Tabla R.10** Composición aminoacídica de la HTCH<sub>H2O</sub> y de los diferentes HPTCH (mg/g proteína).

	HTCH <sub>H2O</sub>	HPTCH <sub>A</sub>	HPTCH <sub>LA450</sub>	HPTCH <sub>P</sub>	HPTCH <sub>F</sub>	HPTCH <sub>A+F</sub>	HPTCH <sub>LA450+F</sub>
<b>Ala</b>	80,37±1,29	81,70±0,12	82,54±0,17	88,03±0,11	83,04±0,10	85,43±0,18	86,37±0,27
<b>Arg</b>	46,89±2,07	50,85±0,26	51,62±0,24	52,60±0,23	55,73±0,17	57,83±0,15	55,94±0,14
<b>Asx</b>	73,32±2,12	79,75±0,18	78,84±0,11	79,41±0,19	81,08±0,11	84,77±0,14	85,19±0,18
<b>Cys</b>	1,34±0,07	1,94±0,09	2,14±0,07	2,17±0,07	2,06±0,07	2,08±0,07	1,45±0,07
<b>Glx</b>	175,35±5,16	192,20±14,52	187,97±13,47	179,02±11,31	189,70±0,49	190,34±20,23	189,42±16,34
<b>Gly</b>	45,05±1,08	47,32±1,02	48,23±2,34	46,89±1,87	49,15±3,01	44,78±0,94	43,87±1,03
<b>His</b>	22,69±0,76	24,10±0,98	23,89±0,75	23,12±0,91	25,01±1,33	20,89±0,96	21,19±0,89
<b>Ile</b>	33,97±1,06	37,38±0,28	39,53±1,02	34,82±2,12	38,33±1,73	33,17±1,17	34,56±0,94
<b>Leu</b>	106,56±3,11	110,62±3,24	112,43±4,54	107,93±7,62	115,13±3,42	107,89±6,53	107,34±5,41
<b>Lys</b>	36,94±0,61	33,86±0,95	31,76±0,88	35,17±1,24	30,01±1,93	34,56±1,12	36,12±1,27
<b>Met</b>	3,37±0,17	3,68±0,19	4,63±0,22	3,62±0,72	3,91±0,17	4,02±0,76	4,23±0,87
<b>Phe</b>	33,55±0,07	38,34±1,76	38,45±1,78	36,12±1,97	39,75±2,06	35,17±2,11	33,17±1,76
<b>Pro</b>	39,03±0,66	43,81±1,59	45,89±2,05	35,3±2,03	43,17±3,22	36,89±1,85	35,97±0,69
<b>Ser</b>	40,29±0,67	43,62±1,74	44,23±1,45	41,62±2,72	47,03±2,12	44,89±0,78	45,23±1,03
<b>Thr</b>	45,53±0,77	43,81±1,56	47,34±0,98	44,62±1,81	45,22±0,56	42,18±0,63	41,89±1,23
<b>Trp*</b>	7,86±0,54	8,31±0,94	8,02±1,01	8,03±0,44	7,32±0,89	8,56±0,92	7,84±0,45
<b>Tyr</b>	20,42±0,93	25,36±1,17	24,17±2,18	23,45±1,03	23,34±1,13	23,17±0,87	22,91±0,32
<b>Val</b>	73,82±2,08	74,34±1,87	77,13±2,45	72,29±1,05	72,91±1,85	76,17±0,86	77,45±0,96
<b>AAH</b>	<b>360</b>	<b>380</b>	<b>387</b>	<b>374</b>	<b>384</b>	<b>374</b>	<b>374</b>
<b>AAAsCP</b>	<b>106,52</b>	<b>108,81</b>	<b>107,27</b>	<b>110,89</b>	<b>110,75</b>	<b>113,28</b>	<b>113,25</b>
<b>AAAsCN</b>	<b>248,67</b>	<b>271,95</b>	<b>266,81</b>	<b>258,43</b>	<b>270,78</b>	<b>275,11</b>	<b>274,61</b>
<b>AAA</b>	<b>61,83</b>	<b>72,01</b>	<b>70,64</b>	<b>67,6</b>	<b>70,41</b>	<b>66,9</b>	<b>63,92</b>
<b>AAEs</b>	<b>364,29</b>	<b>374,44</b>	<b>383,18</b>	<b>365,72</b>	<b>377,59</b>	<b>362,61</b>	<b>363,79</b>

\*Determinado por hidrólisis alcalina

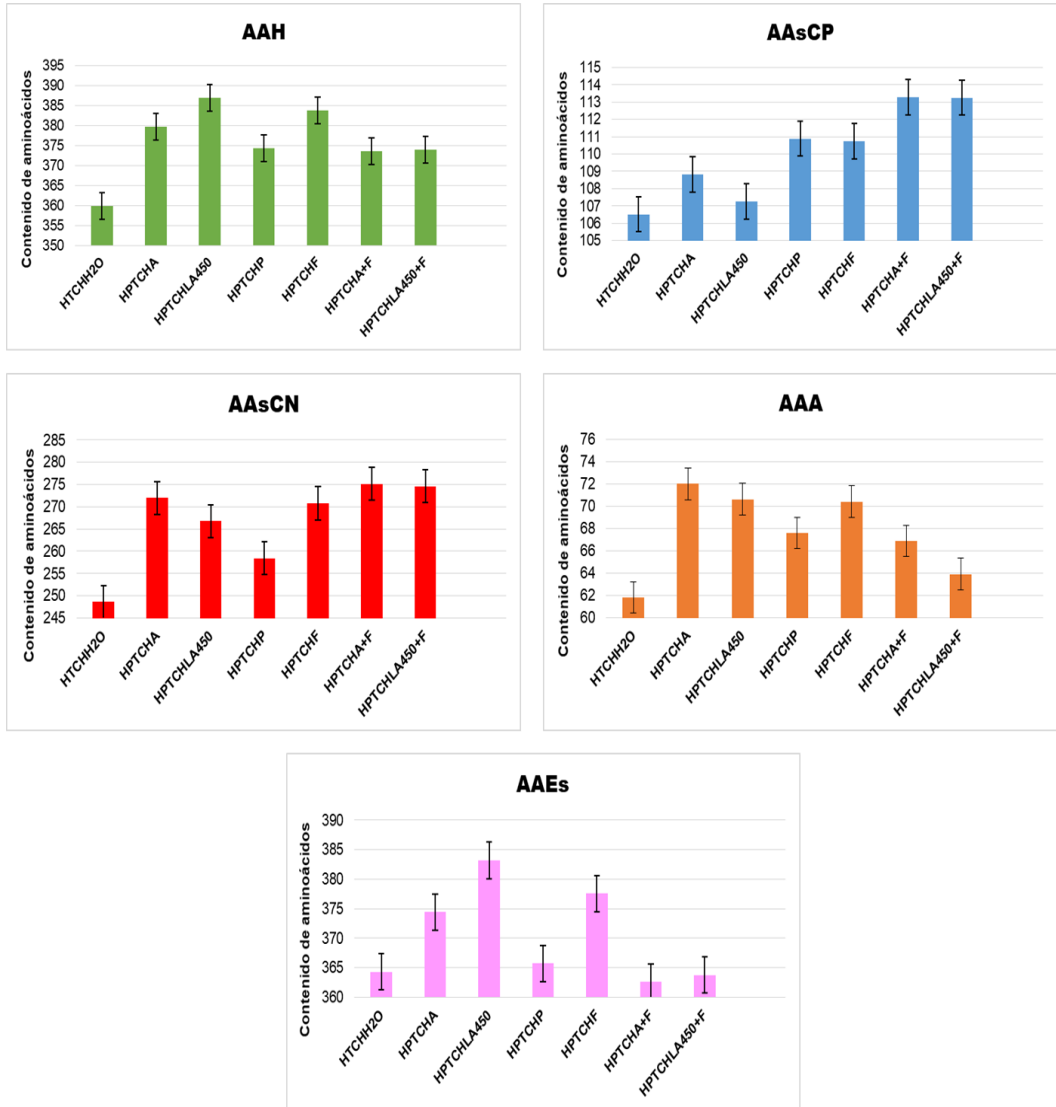
AAH: Aminoácidos hidrofóbicos (Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp, Met)

AAAsCP: Aminoácidos con carga positiva (Arg, Lys, His)

AAAsCN: Aminoácidos con carga negativa (Asx+Glx; Asx = Glu + Gln; Gln = Glu + Gln)

AAA: Aminoácidos aromáticos (Tyr, Phe, Trp)

AAEs: Aminoácidos esenciales (Trp, Thr, Val, Lys, Leu, Met, His, Phe, Ile)



**Figura R.16** Contenido individual de cada uno de los grupos aminoacídicos en los HPTCH.

De los resultados expuestos en la Figura-R.16 se observa que los mayores contenidos en AAH se obtienen en HPTCH<sub>LA450</sub>, mientras que la mayor concentración de AAsCP y AAsCN se obtienen en HPTCH<sub>A+F</sub>, el mayor contenido de AAA se obtiene en HPTCH<sub>A</sub> y el mayor contenido de AAes se encuentra en HPTCH<sub>LA450</sub>.

### 4.5 Estudios de potenciales actividades biológicas en los HPTCH

Entre las principales actividades biológicas o bioactividades descritas para hidrolizados de proteínas, tanto animales como vegetales, cabe resaltar la actividad antioxidante, así como la actividad antidiabética, antimicrobiana, etc.

#### 4.5.1 Actividad antioxidante

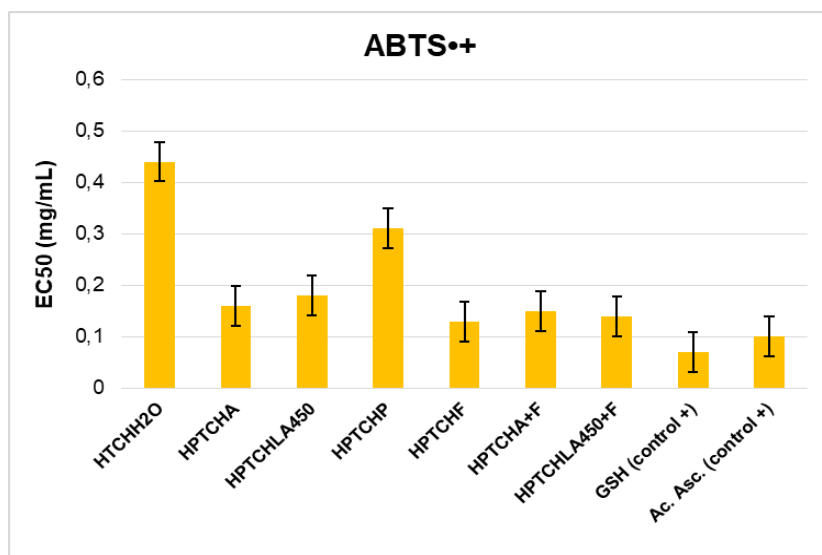
La actividad antioxidante de los HPTCH y del HTCH<sub>H2O</sub> se han evaluado midiendo la actividad secuestradora de los radicales ABTS<sup>•+</sup>, y DPPH<sup>•</sup>, así como a través de su poder reductor y de la inhibición de la oxidación del ácido linoleico.

##### 4.5.1.1 Capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup>

La capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup>, expresada como EC<sub>50</sub>, por los diferentes HPTCH y el HTCH<sub>H2O</sub> se muestran en la Tabla-R.11.

**Tabla R.11** Capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup> por los diferentes HPTCH.

Muestra	EC <sub>50</sub> (mg/mL)
HTCH <sub>H2O</sub>	0,44±0,08
HPTCH <sub>A</sub>	0,16±0,03
HPTCH <sub>LA450</sub>	0,18±0,06
HPTCH <sub>P</sub>	0,31±0,05
HPTCH <sub>F</sub>	0,13±0,02
HPTCH <sub>A+F</sub>	0,15±0,05
HPTCH <sub>LA450+F</sub>	0,14±0,04
GSH(control +)	0,07±0,01
Ac. Ascórbico (control +)	0,10±0,02



**Figura R.17** Capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup> por los diferentes HPTCH.

Estos resultados muestran que todos los HPTCH presentan una mayor capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup> que el HTCH<sub>H<sub>2</sub>O</sub>. Si bien, estos resultados muestran que la hidrólisis incrementa el poder secuestrador del radical ABTS<sup>•+</sup>, ninguno de los hidrolizados obtenidos presenta mayor actividad que los controles positivos utilizados (GSH y ácido ascórbico: 0,07±0,01 y 0,10±0,02, respectivamente).

Estos resultados también muestran que la capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup> por los HPTCH depende del tipo de proteasa utilizado para la obtención de los hidrolizados en las hidrólisis simples, obteniéndose la mayor capacidad secuestradora (menor EC<sub>50</sub>) cuando se utiliza la exoproteasa Flavourzyme® (EC<sub>50</sub> = 0,13±0,02 mg/mL), y cuando se utiliza en combinación de las endoproteasas Alcalase® y Bioproteasa L450 (0,15±0,05 y 0,14±0,04, respectivamente), no observándose diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las dos combinaciones estudiadas.



Estos resultados están de acuerdo con estudios previos de otros autores que también encuentran que hidrolizados proteicos constituidos mayoritariamente por péptidos y oligopéptidos de bajo peso molecular (<1 kDa) tienden a presentar las mayores capacidades de secuestro del radical ABTS<sup>•+</sup> (Wang y col., 2014). En nuestro caso esta situación es la que se alcanza cuando la hidrólisis se lleva a cabo con Flavourzyme® en hidrólisis simple, que realmente es una mezcla de endo- y exoproteasas, con una alta prevalencia de la actividad endoproteásica frente a la exoproteásica, comúnmente aceptada (Merz y col., 2015).

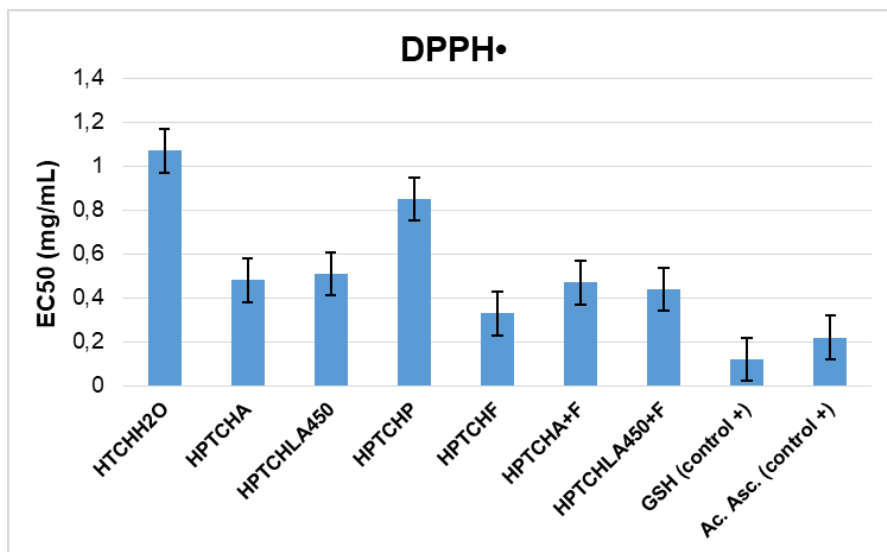
Por ello sería razonable sugerir que los diferentes hidrolizados contienen péptidos y/o aminoácidos capaces de donar electrones que estabilizarían al radical ABTS<sup>•+</sup> interrumpiendo la reacción radicalaria en cadena. El grado de capacidad secuestradora del radical ABTS<sup>•+</sup> de los péptidos y/o aminoácidos depende de la especificidad de la proteasa utilizada en la hidrólisis y del tamaño (peso molecular) de los péptidos así como de su composición y conformación (Ahn y col., 2014).

### ***4.5.1.2 Capacidad secuestradora del radical DPPH•***

La capacidad secuestradora del radical DPPH•, expresada como EC<sub>50</sub>, por los diferentes HPTCH y el HTCH<sub>H<sub>2</sub>O</sub> se muestran en la Tabla-R.12.

**Tabla R.12** Capacidad secuestradora del radical DPPH<sup>•</sup> por los diferentes HPTCH.

Muestra	EC <sub>50</sub> (mg/mL)
HTCH <sub>H2O</sub>	1,07±0,12
HPTCH <sub>A</sub>	0,48±0,05
HPTCH <sub>LA450</sub>	0,51±0,03
HPTCH <sub>P</sub>	0,85±0,05
HPTCH <sub>F</sub>	0,33±0,02
HPTCH <sub>A+F</sub>	0,47±0,05
HPTCH <sub>LA450+F</sub>	0,44±0,06
GSH (control +)	0,12±0,03
Ac. Ascórbico (control +)	0,22±0,03



**Figura R.18** Capacidad secuestradora del radical DPPH<sup>•</sup> por los diferentes HPTCH.

El análisis de estos resultados muestran que la capacidad secuestradora del radical DPPH<sup>•</sup> es en todos casos mayor para los HPTCH que para el HTCH<sub>H2O</sub>. Aunque estos resultados muestran que la hidrólisis favorece el incremento del

poder secuestrador del radical DPPH<sup>•</sup>, ninguno de los hidrolizados presenta mayor actividad que los controles positivos utilizados (GSH y ácido ascórbico: 0,12±0,03 y 0,22±0,03, respectivamente).

Estos resultados, al igual que para el radical ABTS<sup>•+</sup>, también muestran que la capacidad secuestradora del radical DPPH<sup>•</sup> de los HPTCH depende del tipo de proteasa utilizado en las hidrólisis simples, obteniéndose la mayor capacidad secuestradora (menor EC<sub>50</sub>) en el caso de utilizar la exoproteasa Flavourzyme® (EC<sub>50</sub> = 0,33±0,02 mg/mL). En el caso de las hidrólisis secuenciales, al igual que anteriormente, no se observan diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las dos combinaciones de endoproteasa + exoproteasa estudiadas, obteniéndose valor de EC<sub>50</sub>, 0,47±0,05 y 0,44±0,06 g/mL para HPTCH<sub>A+F</sub> y HPTCH<sub>LA450+F</sub>, muy similares al obtenido para la hidrólisis simple con la endoproteasa.

En este caso también, nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos de otros autores que encuentran que hidrolizados proteicos constituidos mayoritariamente por péptidos y oligopéptidos de bajo peso molecular (<1 kDa) tienden a presentar las mayores capacidades de secuestro del radical DPPH<sup>•</sup> (Arise y col., 2016; He y col., 2013). En nuestro caso esta situación es la que se alcanza cuando la hidrólisis se lleva a cabo con Flavourzyme® en hidrólisis simple, que realmente es una mezcla de endo- y exoproteasas, con una alta prevalencia de la actividad endoproteásica frente a la exoproteásica, comúnmente aceptada (Merz y col., 2015).

Sería razonable sugerir que los diferentes hidrolizados contienen péptidos y/o aminoácidos capaces de donar electrones que estabilizarían al radical DPPH<sup>•</sup>

interrumpiendo la reacción radicalaria en cadena. El grado de capacidad secuestradora de radical DPPH<sup>•</sup> de los péptidos y/o aminoácidos depende de la especificidad de la proteasa utilizada en la hidrólisis y del tamaño (peso molecular) de los péptidos así como de su composición y conformación (Girgih y col., 2011; Jin y col., 2016).

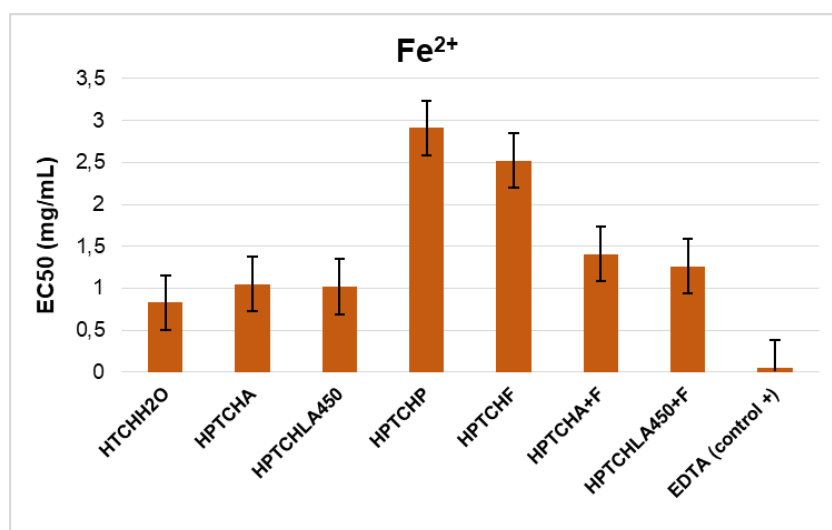
#### 4.5.1.3 Actividad quelante de metales

En la Tabla-R.13 se muestra la actividad quelante frente al ion Fe<sup>2+</sup> de los diferentes HPTCH y del HTCH<sub>H2O</sub> y en comparación con el EDTA (control positivo).

**Tabla R.13** Capacidad quelante de los diferentes HPTCH.

Muestra	EC <sub>50</sub> (mg/mL)
HTCH <sub>H2O</sub>	0,83±0,15
HPTCH <sub>A</sub>	1,05±0,32
HPTCH <sub>LA450</sub>	1,02±0,22
HPTCH <sub>P</sub>	2,91±0,37
HPTCH <sub>F</sub>	2,52±0,28
HPTCH <sub>A+F</sub>	1,41±0,18
HPTCH <sub>LA450+F</sub>	1,26±0,21
EDTA (control +)	0,05±0,01

Estos resultados muestran que todos los HPTCH presentan una actividad quelante del ión Fe<sup>2+</sup> relativamente baja, mostrando valores de EC<sub>50</sub> significativamente mayores que el control positivo (EDTA, 0.05±0.01 mg/mL), e incluso mayores que el obtenido con el HTCH<sub>H2O</sub>, 0,83±0,15 mg/mL.



**Figura R.19** Capacidad quelante de los diferentes HPTCH.

Esto podría ser debido a la ausencia o relativa baja presencia de macropéptidos en los hidrolizados, que serían los responsables mayoritarios de esta actividad, así como a un bajo contenido en péptidos con carga negativa.

Los hidrolizados HPTCH<sub>A</sub> y HPTCH<sub>LA450</sub> presentan las mayores actividades quelantes ( $EC_{50} = 1,05 \pm 0,32$  y  $1,02 \pm 0,22$  mg/mL, respectivamente) en comparación con los otros hidrolizados (HPTCH<sub>P</sub> y HPTCH<sub>F</sub>) que presentan valores de  $EC_{50} = 2,91 \pm 0,37$  y  $2,52 \pm 0,28$  mg/mL, respectivamente. El uso de una segunda proteasa, hidrólisis secuencial, no mejora la capacidad quelante, e incluso la empeora ligeramente. Esto sugiere que la pre-hidrólisis de las proteínas de la harina de tallos de champiñón con Alcalase® y Bioproteasa LA-450 previa al tratamiento con Flavourzyme® conduce a la obtención de péptidos de peso molecular relativamente altos con una mejor capacidad quelante, que cuando se utilizan las dos proteasas en forma secuencial, que conduce a la reducción del contenido de estos péptidos de mayor peso molecular y por tanto

disminuyendo la actividad quelante.

Las actividades descritas en este estudio para los diferentes HPTCH con valores de  $EC_{50}$  de  $1.02 \pm 0,22$  a  $2.91 \pm 0,37$  mg/mL son mejores que los descritos para otros hidrolizados proteicos de proteínas vegetales y animales, con las mismas o similares proteasas, para los que se han reportado valores de  $EC_{50} > 5$  mg/mL (He y col., 2013).

Se ha sugerido que la mayor actividad quelante de los macropéptidos o péptidos de relativamente alto peso molecular podría ser debido a un efecto sinérgico entre sus aminoácidos integrantes, favoreciendo estadísticamente la presencia de aminoácidos con carga negativa a pHs fisiológicos (Asp y Glu) (He y col., 2013; Shi y col., 2014).

Sin embargo, los valores obtenidos para los HPTCH comparados con el valor obtenido para el EDTA (control positivo), 0,01 mg/mL, todos son significativamente inferiores. El GSH no muestra actividad quelante medible.

A partir de estos resultados podríamos concluir que aunque la actividad quelante no sea extraordinariamente alta, los hidrolizados con mayor contenido en péptidos de peso molecular relativamente alto, así como el  $HTCH_{H_2O}$ , podrían ser buenos candidatos para la prevención de la oxidación lipídica en alimentos mediante su capacidad quelante de iones metálicos pro-oxidativos, además de reducir el daño de los componentes celulares que resulta de la oxidación catalizada por iones metálicos *in vivo*.

### 4.5.1.4 Poder reductor férrico (*Ferric reducing activity power: FRAP*)

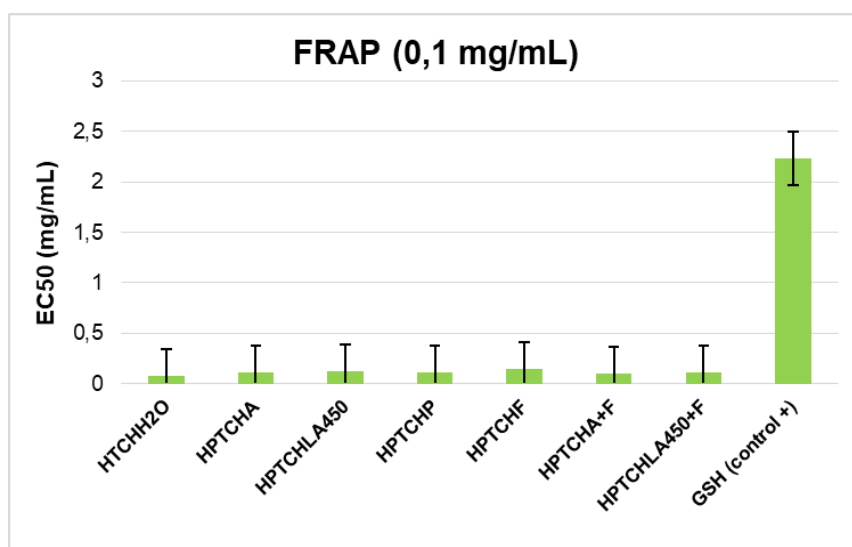
En la Tabla-R.14 se muestra la reducción de la actividad férrica (FRAP) a tres concentraciones distintas: 0,1, 0,2 y 0,3 mg/mL), de los diferentes HPTCH y del HTCH<sub>H2O</sub> frente a un control positivo (GSH, 0,1 mg/mL)

**Tabla R.14** Poder reductor férrico (FRAP) de los diferentes HPTCH (a tres concentraciones: 0,1, 0,2 y 0.3 mg/mL) y del control positivo, GSH a 0,1 mg/mL.

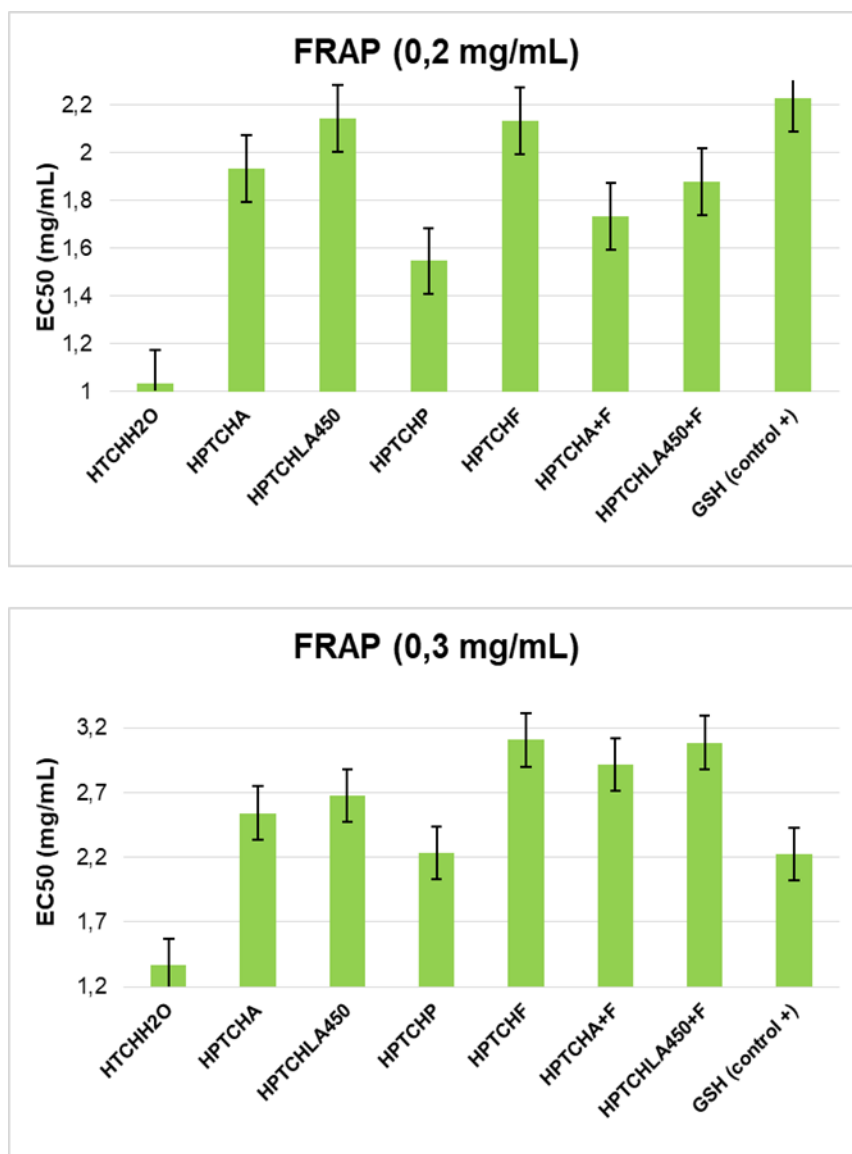
Muestra (0,1 mg/mL)	Absorbancia a 700 nm
HTCH <sub>H2O</sub>	0,077
HPTCH <sub>A</sub>	0,113
HPTCH <sub>LA450</sub>	0,120
HPTCH <sub>P</sub>	0,106
HPTCH <sub>F</sub>	0,143
HPTCH <sub>A+F</sub>	0,103
HPTCH <sub>LA450+F</sub>	0,111
GSH (control +, 0,1 mg/mL)	2,227

Muestra (0,2 mg/mL)	Absorbancia a 700 nm
HTCH <sub>H2O</sub>	1,035
HPTCH <sub>A</sub>	1,932
HPTCH <sub>LA450</sub>	2,143
HPTCH <sub>P</sub>	1,546
HPTCH <sub>F</sub>	2,131
HPTCH <sub>A+F</sub>	1,732
HPTCH <sub>LA450+F</sub>	1,879
GSH (control +, 0,1 mg/mL)	2,227

Muestra (0,3 mg/mL)	Absorbancia a 700 nm
HTCH <sub>H2O</sub>	1,369
HPTCH <sub>A</sub>	2,543
HPTCH <sub>LA450</sub>	2,678
HPTCH <sub>P</sub>	2,233
HPTCH <sub>F</sub>	3,107
HPTCH <sub>A+F</sub>	2,917
HPTCH <sub>LA450+F</sub>	3,087
GSH (control +, 0,1 mg/mL)	2,227







**Figura R.20** Poder reductor férrico (FRAP) de los diferentes HPTCH (a tres concentraciones: 0,1, 0,2 y 0,3 mg/mL) y del control positivo, GSH a 0,1 mg/mL.

Como puede observarse de los resultados expuestos en la Tabla-R.14, todos los HPTCH muestran una actividad FRAP concentración dependiente, aumentando esta a medida que aumenta la concentración del hidrolizado.

El HPTCH<sub>F</sub> es el hidrolizado que muestra el mayor valor FRAP: 0,143, 2,131 y 3,107 U<sub>Absorbancia</sub>, a 0,1, 0,2 y 0,3 mg/mL, respectivamente.

El uso secuencial de dos proteasas no mejora significativamente ( $p < 0,05$ ) el valor de FRAP obtenido por hidrólisis simple. Esto implica que la pre-hidrólisis con una exoproteasa (Alcalase® o Bioprotease LA-450) no mejora el valor de FRAP obtenido tras la hidrólisis con Flavourzyme®.

Los mejores valores de FRAP se han obtenido a una concentración de 0,3 mg/mL para HPTCH<sub>F</sub> y HPTCH<sub>LA450</sub>, 3,107 y 2,678 U<sub>Absorbancia</sub>, respectivamente, que son valores más altos que los obtenidos para hidrolizados de hemoproteínas (0,31 U<sub>Absorbancia</sub>) con proteasas similares (Tang y col., 2009).

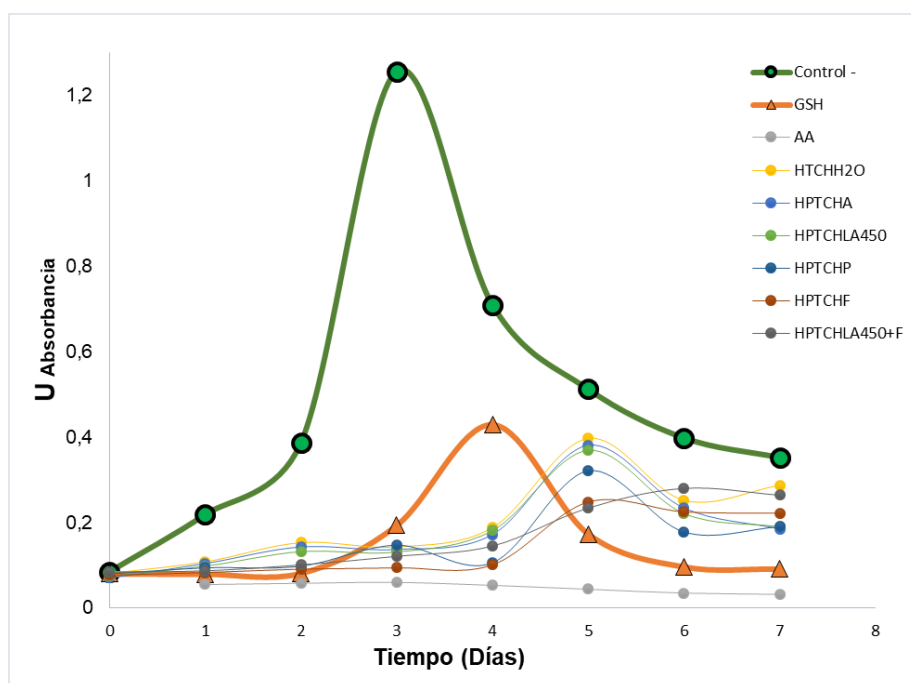
### ***4.5.1.5 Inhibición de la oxidación del ácido linoleico (Inhibición peroxidación lipídica)***

En la Tabla-R.15 se muestran los resultados obtenidos para la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico por los controles positivos: GSH y ácido ascórbico (AA) y los diferentes HPTCH y el HTCH<sub>H2O</sub>.

Tabla R.15 Resultados obtenidos para la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico.

<b>Dias</b>	<b>Control -</b>	<b>GSH</b>	<b>AA</b>	<b>HTCH<sub>H2O</sub></b>	<b>HPTCH<sub>A</sub></b>	<b>HPTCH<sub>LA450</sub></b>	<b>HPTCH<sub>P</sub></b>	<b>HPTCH<sub>F</sub></b>	<b>HPTCH<sub>A+F</sub></b>	<b>HPTCH<sub>LA450+F</sub></b>
<b>0</b>	0,085	0,080	0,055	0,081	0,070	0,075	0,080	0,077	0,077	0,084
<b>1</b>	0,219	0,079	0,058	0,108	0,104	0,098	0,094	0,083	0,79	0,087
<b>2</b>	0,387	0,081	0,060	0,153	0,143	0,132	0,098	0,091	0,095	0,101
<b>3</b>	1,256	0,193	0,053	0,143	0,137	0,131	0,147	0,094	0,118	0,121
<b>4</b>	0,709	0,429	0,044	0,188	0,172	0,181	0,106	0,101	0,139	0,145
<b>5</b>	0,512	0,173	0,035	0,397	0,381	0,369	0,321	0,248	0,210	0,234
<b>6</b>	0,398	0,096	0,032	0,252	0,234	0,221	0,178	0,225	0,278	0,280
<b>7</b>	0,352	0,091	0,040	0,287	0,185	0,190	0,190	0,222	0,256	0,264

En la Figura-R.21 se muestra la evolución de la reacción sin inhibidor (control-). Como puede observarse la reacción muestra un incremento de la absorbancia (oxidación) durante los primeros días, alcanzando el máximo 1,256  $U_{\text{Absorbancia}}$  el día 3, seguidamente se observa un rápido descenso a lo largo del resto de días de experimentación. El incremento de absorbancia durante los tres primeros días es muestra de una rápida auto-oxidación del ácido linoleico en ausencia de inhibidor. Y el rápido descenso de absorbancia tras alcanzar el máximo de absorbancia se ha atribuido a la descomposición de los productos de oxidación primaria, fundamentalmente de los hidroperóxidos, además de que el agotamiento del ácido linoleico limita por sí mismo la producción de productos de oxidación a medida que avanza el tiempo de incubación (**Chen y col., 2007**).



**Figura R.21** Auto-oxidación del ácido linoleico en ausencia de inhibidor (control -) y en presencia de inhibidores de la auto-oxidación.

Como se puede observar de los datos expuestos en la Tabla-R.15, la protección de la auto-oxidación del ácido linoleico por el control positivo (ácido ascórbico, AA) es prácticamente completa como lo demuestra la baja absorbancia de las muestras a lo largo del tiempo de incubación, 7 días (ver Figura-R.21).

El otro control positivo utilizado, el GSH, muestra una mayor eficiencia que los HPTCH durante los dos primeros días de incubación, como se refleja en el bajo valor de absorbancia. Sin embargo, esta actividad parece perderse transcurrido los dos primeros días como muestra el incremento claro de la absorbancia, lo que es indicativo de una rápida auto-oxidación del ácido linoleico. La disminución de la capacidad del GSH para sostener la inhibición de la oxidación lipídica, en el sistema utilizado, durante un largo tiempo podría ser debido al hecho de que una vez oxidado el GSH a GSSG a través de la formación de un puente disulfuro, la regeneración del GSH no es posible a medida que progresa el tiempo de incubación (Ajbola y col., 2011).

En cuanto a los HPTCH todos muestran una clara inhibición de la auto-oxidación del ácido linoleico, y además, aunque ligeramente menor que la del AA (control +), esta es más prolongada en el tiempo que la observada para el control +, siendo claramente efectiva durante 4 días; no siendo hasta el día 5 cuando se observa un incremento en la oxidación, es decir, cuando se pierde la actividad protectora. Si bien, esta pérdida no es igual para todos los HPTCH como se muestra en la Tabla-R.16 donde se indica el tanto por ciento de inhibición, respecto a la reacción sin inhibidor (control -), para los HPTCH y el extracto acuoso (HTCH<sub>H2O</sub>) en comparación con los controles + (GSH y AA).

**Tabla R.16** Inhibición porcentual de la peroxidación lipídica (ácido linoleico) por parte de los HPTCH y HTCH<sub>H2O</sub>.

Muestra	Inhibición (%)	
	Día 3	Día 5
HTCH <sub>H2O</sub>	88,61	22,5
HPTCH <sub>A</sub>	89,1	26,6
HPTCH <sub>LA450</sub>	89,6	27,9
HPTCH <sub>P</sub>	92,5	51,6
HPTCH <sub>F</sub>	88,3	37,3
HPTCH <sub>A+F</sub>	90,6	59,0
HPTCH <sub>LA450+F</sub>	90,4	54,3
GSH	84,6	66,2
AA	95,8	93,2

Como podemos observar los HPTCH han perdido parte de su efecto protector, pero reteniendo en algunos casos un poder inhibidor >50% respecto del control negativo; aunque bastante más bajo o pobre que los alcanzados con los controles positivos (GSH y/o AA).

Los HPTCH al quinto día presenta actividades inhibitoras que van desde el 26,6% al 59,0%, observadas para el HPTCH<sub>A</sub>, y el HPTCH<sub>A+F</sub> respectivamente, pero estos valores son inferiores a los observados para hidrolizados de proteínas de canola (42-82%) (Alashi y *col.*, 2014), aunque mayores que los encontrados para hidrolizados de proteínas de pescado (15-53%), bajo condiciones y tiempos de incubación similares (Bougatef y *col.*, 2010).

El comportamiento diferencial de los distintos hidrolizados frente a la inhibición de la peroxidación lipídica sugiere diferencias en la composición de éstos, y la pérdida en la capacidad de protección contra la oxidación de los lípidos podría deberse al agotamiento de los electrones libres a medida que

avanza el período de reacción. Esto parece estar indicando que los hidrolizados podrían reaccionar con los radicales libres, particularmente los radicales peroxilos, que son los propagadores primarios de la auto-oxidación de los lípidos, terminando así la reacción en cadena. Por lo tanto, estos hidrolizados podrían encontrar aplicación en la industria alimentaria como antioxidantes naturales para prevenir la auto-oxidación de grasas en sistemas alimentarios ricos en lípidos. Así mismo podrían utilizarse como nutracéuticos para potenciar la protección de los componentes celulares previniendo la oxidación lipídica en el sistema corporal sobre todos en estados de estrés oxidativo.

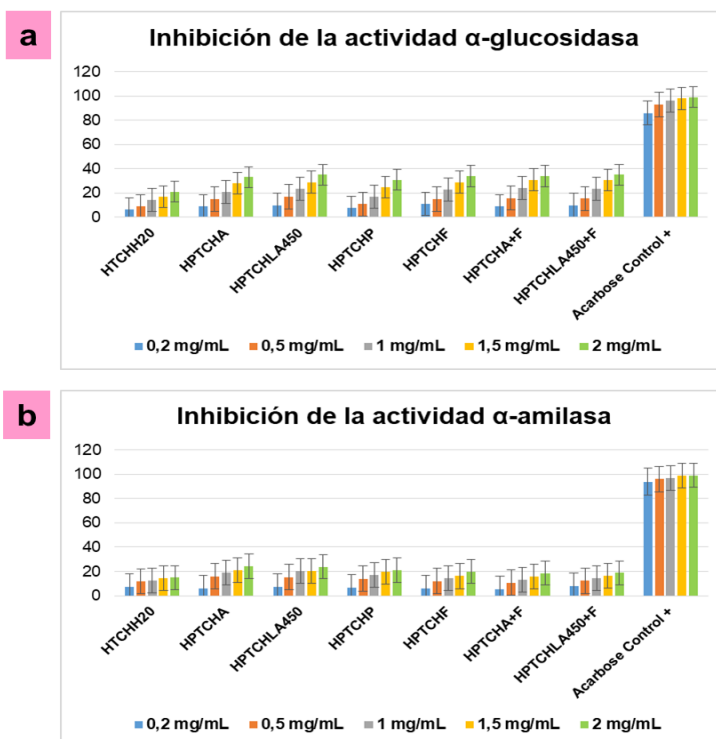
### 4.5.2 Actividad antidiabética

Las principales enzimas implicadas en la degradación de los carbohidratos en el tracto gastrointestinal son la  $\alpha$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -amilasa intestinales. Por lo tanto, la inhibición de estas dos hidrolasas puede reducir eficazmente la absorción de glucosa e inhibiendo el aumento de la concentración de glucosa sanguínea postprandial (**Oboh y col., 2010**).

Actualmente uno de los métodos más efectivos para el tratamiento de la diabetes consiste en la inhibición la  $\alpha$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -amilasa intestinal.

Como se muestra en la Figura-R.22, todos los HPTCH muestran una ligera actividad inhibidora de las dos hidrolasas, de manera dosis dependiente, al menos en el rango de 0,2 a 2,0 mg/mL. No observándose diferencias estadísticamente significativas entre los distintos HPTCH y el HTCH<sub>H2O</sub>. Si bien, estas inhibiciones son significativamente muy inferiores a la observada para el control positivo (Acarbosa). Por lo que se puede concluir que los

HPTCH no presentan ventaja alguna a la hora de intentar reducir los niveles postprandiales de glucosa. Nuestros resultados son contrarios a los reportados por otros autores que sí encuentran una inhibición apreciable de estas hidrolasas utilizando hidrolizados de otros hongos comestibles (**Mudgila y col., 2013; Harnedy y col., 2018**). A este respecto cabe indicar que estos autores utilizan hongos enriquecidos en selenio, por lo que la mejora de la actividad antidiabética de los hidrolizados de las proteínas de hongos enriquecidos en selenio podría atribuirse a la incorporación de selenio en los péptidos integrantes de los hidrolizados y a posibles cambios conformacionales de estos inducidos por el selenio, que favorecería la interacción con la  $\alpha$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -amilasa limitando su acción (**Chen y col., 2016**).



**Figura R.22** a) Inhibición de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa, b) Inhibición de la actividad  $\alpha$ -amilasa del Extracto acuoso y los HPTCH.



**Tabla R.17** Inhibición de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa por los hidrolizados de la HTCH (HPTCH).

mg/mL	HTCH <sub>H2O</sub>	HPTCH <sub>A</sub>	HPTCH <sub>LA450</sub>	HPTCH <sub>P</sub>	HPTCH <sub>F</sub>	HPTCH <sub>A+F</sub>	HPTCH <sub>LA450+F</sub>	Acarbose
<b>0,2</b>	6,4	9	10	8	11	9	10	86
<b>0,5</b>	9	15	17	11	15	16	15,5	93
<b>1</b>	14,1	21	23,3	17	23	24	23,6	96
<b>1,5</b>	17	28	29	25	29	31	30,6	98
<b>2</b>	21	33,1	35	31	34	34	35	99

**Tabla R.18** Inhibición de la actividad  $\alpha$ -amilasa por los hidrolizados de la HTCH (HPTCH).

mg/mL	HTCH <sub>H2O</sub>	HPTCH <sub>A</sub>	HPTCH <sub>LA450</sub>	HPTCH <sub>P</sub>	HPTCH <sub>F</sub>	HPTCH <sub>A+F</sub>	HPTCH <sub>LA450+F</sub>	Acarbose
<b>0,2</b>	7,3	5,9	7	6,4	6	5,1	7,8	94
<b>0,5</b>	11,9	16	15,4	14	12	10,8	12,3	96
<b>1</b>	12,6	19	20,1	17,3	14,3	12,9	14,7	97
<b>1,5</b>	14,2	21	20,2	19,6	16,1	15,6	16,2	99
<b>2</b>	15	24,2	23,9	21	19,8	18,7	18,9	99

### 4.5.3 Inhibición de la actividad tirosinasa

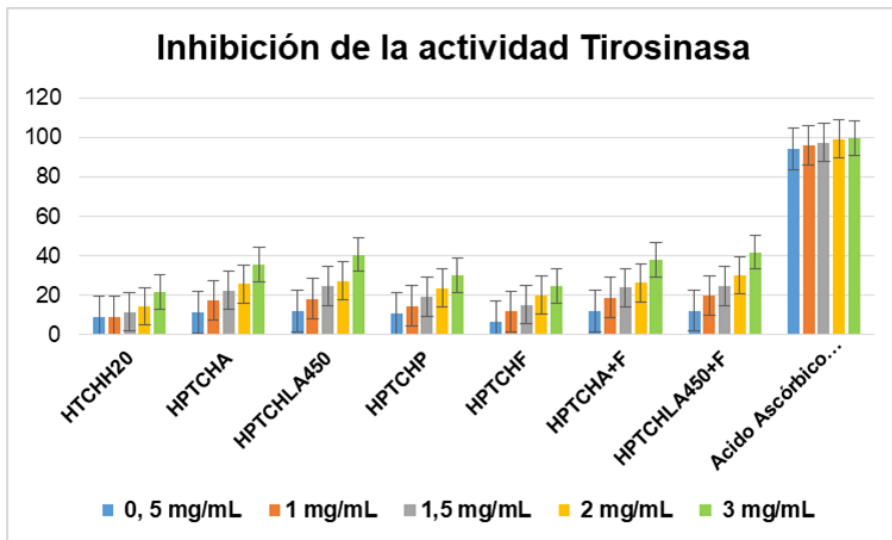
La tirosinasa (monofenol monooxigenasa, EC 1.14.18.1) es una enzima que cataliza la oxidación de fenoles (como la tirosina) y está extendida en plantas y animales. Esta enzima es una enzima cuprífera presente en tejidos de plantas y animales que cataliza la producción de melanina y otros pigmentos de la tirosina por oxidación, como el ennegrecimiento de una patata pelada o cortada expuesta al aire, o la aparición de manchas marrones en el champiñón al ser golpeado o dañado. En los organismos vivos es una enzima clave en el control de la síntesis de melanina. La actividad tirosinasa está estrechamente relacionada con algunos procesos fisiológicos importantes, y una sobreexpresión anormal de esta enzima puede conducir a la aparición de enfermedades pigmentarias en animales y en humano, como pecas, melanomas malignos, manchas de la edad y melasma (Souza y col., 2012).

La inhibición de la actividad tirosinasa podría reducir la síntesis de dopa-quinona a partir del L-DOPA, reduciendo de esta manera la síntesis de melanina y la deposición anormal de melanina, logrando así la eliminación de pecas y el blanqueamiento.

En la Figura-R.23 se muestra la inhibición de la actividad tirosinasa por los diferentes HPTCH, el HTCH<sub>H2O</sub> y un control positivo (ácido ascórbico). Todos los HPTCH inhiben claramente la actividad tirosinasa de una manera dosis dependiente, dentro del rango 0,5-3,0 mg/mL. Esta inhibición es mayor, estadísticamente significativa  $p < 0,05$ , que la presentada por el HTCH<sub>H2O</sub>, pero claramente menor que el control positivo. A pesar de ello, a concentraciones del orden de 1,5 g/mL y mayores la inhibición es del orden del 40%.

**Tabla R.19** Inhibición de la actividad Tirosinasa del Extracto acuoso y los HPTCH.

	<b>HTCH<sub>H2O</sub></b>	<b>HPTCH<sub>A</sub></b>	<b>HPTCH<sub>LA450</sub></b>	<b>HPTCH<sub>P</sub></b>	<b>HPTCH<sub>F</sub></b>	<b>HPTCH<sub>A+F</sub></b>	<b>HPTCH<sub>LA450+F</sub></b>	<b>Acido Ascórbico Control +</b>
<b>0,5 mg/mL</b>	8,9	11,2	11,9	10,8	6,4	11,9	12,3	94,2
<b>1 mg/mL</b>	9,2	17,5	18,3	14,6	11,8	18,8	19,9	96,1
<b>1,5 mg/mL</b>	11,6	22,5	24,8	19,3	15,3	23,9	24,7	97,3
<b>2 mg/mL</b>	14,4	25,6	27,3	23,6	20,1	26,4	30,2	99,2
<b>3 mg/mL</b>	21,6	35,7	40,7	30,1	24,8	37,8	41,9	99,4



**Figura R.23** a) Inhibición de la actividad Tirosinasa del Extracto acuoso y los HPTCH.

La inhibición de la tirosinasa por los HPTCH podría atribuirse a la quelación de los iones de cobre en el centro activo de la enzima (**Sánchez-Ferrer y col., 1995**) a través de interacciones electrostáticas con restos aminoacídicos de AAsCN.

Los HPTCH, debido a las actividades biológicas descritas serían claramente aplicables como nutraceuticas o complementos nutricionales en el tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, y en la industria alimentaria en la prevención de la oxidación de los alimentos evitando su deterioro y/o pardeamiento, estos hidrolizados, debido a su composición, también podrían encontrar aplicación en la agronomía moderna como biofertilizantes.

### 4.6 Aplicación como Biofertilizante

El uso de los biofertilizantes constituye una nueva alternativa del empleo de fertilizantes en el sector agrícola. Su finalidad es conseguir una mayor productividad y calidad de los productos, además de contribuir a la sostenibilidad de actividad productiva y al mantenimiento del ecosistema, todo esto debido a que en muchos casos ciertos vegetales, legumbres, hortalizas, etc., pueden verse amenazadas por enfermedades virales o factores ecológicos adversos al cultivo, ocasionando grandes pérdidas económicas (**Sadhukhan y col., 2018**).

Los biofertilizantes son productos obtenidos con técnicas respetuosas con el medioambiente, a partir de sustratos o subproductos enriquecidos que favorezcan el desarrollo de las plantas evitando así el uso de fertilizantes químicos que son muy costosos y causan daño al medioambiente (**Dahiya y col., 2018**).

Debido al importante contenido en aminoácidos, oligopéptidos y péptidos encontrados en los HPTCH, nos planteamos la utilización de estos como bioestimulante (biofertilizante), ya que potencialmente, debido a la presencia de estos componentes podrían ser beneficiosos para el desarrollo de las plantas. Por ello procedimos a ensayar la actividad de los HPTCH sobre la germinación y enraizamiento de semillas de pimiento (*Capsicum annuum*).

Para evaluar si los productos obtenidos (HTCH<sub>H2O</sub> Y HPTCH) pueden utilizarse como biofertilizantes, se realizaron ensayos de germinación con

semillas de pimiento (*Capsicum annuum*), en tubos con agar. Los tubos fueron tratados con diferentes concentraciones (1X, 5X y 10X) de HTCH<sub>H2O</sub> y HPTCH, como se describe en el correspondiente apartado de M&M.

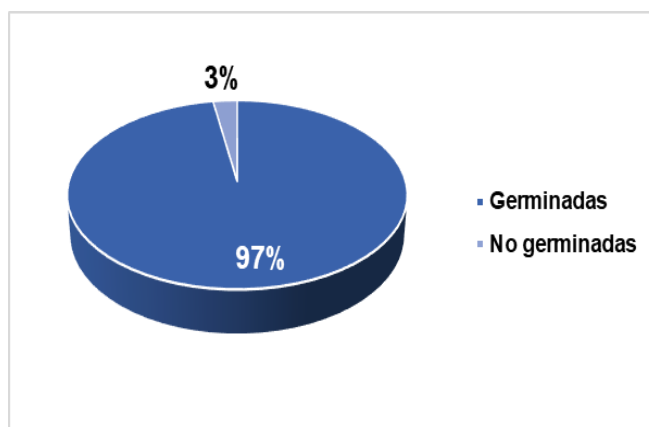
### 4.6.1 Uso de HTCH<sub>H2O</sub> y HPTCH como biofertilizantes.

#### – Evaluación de la viabilidad de las semillas

La prueba de tretazolio nos permitió identificar la viabilidad de las semillas, al observar la reacción que ocurre en las células vivas, ya que estas liberan hidrógeno debido a la actividad de la deshidrogenasa durante el proceso de respiración (Kauth y col., 2011; Ossenbach y col., 2007). Teniendo como resultado que, tras un tratamiento durante 15 o 30 min, el 98% de semillas de los lotes ensayados son viables y no muestran contaminación, lo que indica que si existe algún problema en la germinación no sería por parte de la semilla sino más bien por falta de nutrientes u otros factores. Tratamientos más largos sí muestran una ligera pérdida de viabilidad de las semillas (65 -71%). Por lo que se eligió como tiempo de tratamiento 15 min.

#### - Germinación de las Semillas con HTCH<sub>H2O</sub> y HPTCHs

Los ensayos se realizaron, en tubos de agar, utilizando 30 semillas de cada muestra (HTCH<sub>H2O</sub> y HPTCH) por ensayo. Una vez desinfectadas las semillas, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos, se sembraron en tubos con agar que contenían cada uno de los productos (HTCH<sub>H2O</sub> y HPTCH), y se determinó el porcentaje de germinación, que al finalizar el ensayo fue del 97% (Figura-R.24.).

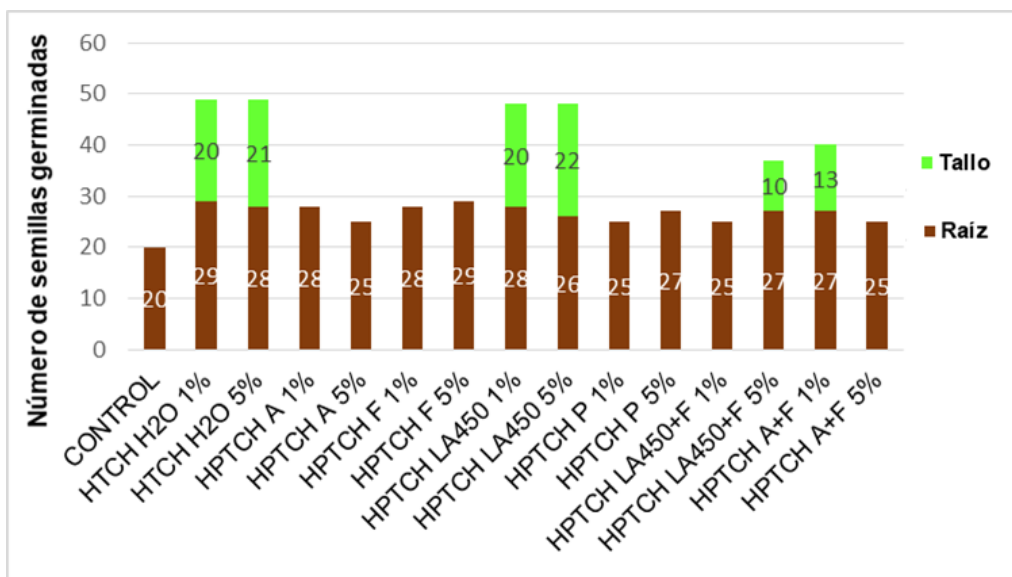


**Figura R.24** Porcentaje de germinación del ensayo con  $\text{HTCH}_{\text{H}_2\text{O}}$  y HPTCH.

El tiempo estimado para la germinación en este ensayo fue hasta el sexto día donde se observó que la mayoría de las semillas de cada muestra llegaron a germinar. Como se muestra en la Figura-R.25, en los tubos de agar con HPTCH entre el 83,3 y el 96,7% de semillas germinaron hasta el sexto día, incluso en algunas se observa ya la presencia de un pequeño tallo, como es el caso de los  $\text{HTCH}_{\text{H}_2\text{O}}$ , los  $\text{HPTCH}_{\text{LA}450}$ ,  $\text{HPTCH}_{\text{LA}450+\text{F}}$  y  $\text{HPTCH}_{\text{LA}450+\text{F}}$ , mientras que en el caso de los tubos con  $\text{HTCH}_{\text{H}_2\text{O}}$  únicamente el 66,7% de los tubos han germinado al sexto día.

Al finalizar el ensayo obtuvimos plántulas que se desarrollaron de forma normal diferenciándose unas de otras por la longitud de la raíz y del tallo. Como se observa en la Figura-R.26b en el caso de las plantas tratadas con  $\text{HTCH}_{\text{H}_2\text{O}}$  presentan raíces y tallos más largos que las plantas control (tratadas con  $\text{H}_2\text{O}$ , Figura-R.26a), además de presentar raíces más gruesa y con abundante vellosidades. Además, al 1% se observa mayor longitud de la raíz y del tallo que para el tratamiento al 5%. De igual manera se puede observar que la raíz posee mayor grosor y a la vez presenta un gran número de vellosidades, lo que estaría

indicando que la adición de este producto favorece el desarrollo de la planta, al menos al enraizamiento y al desarrollo del tallo.



**Figura R.25** Número de semillas que germinaron al sexto día.

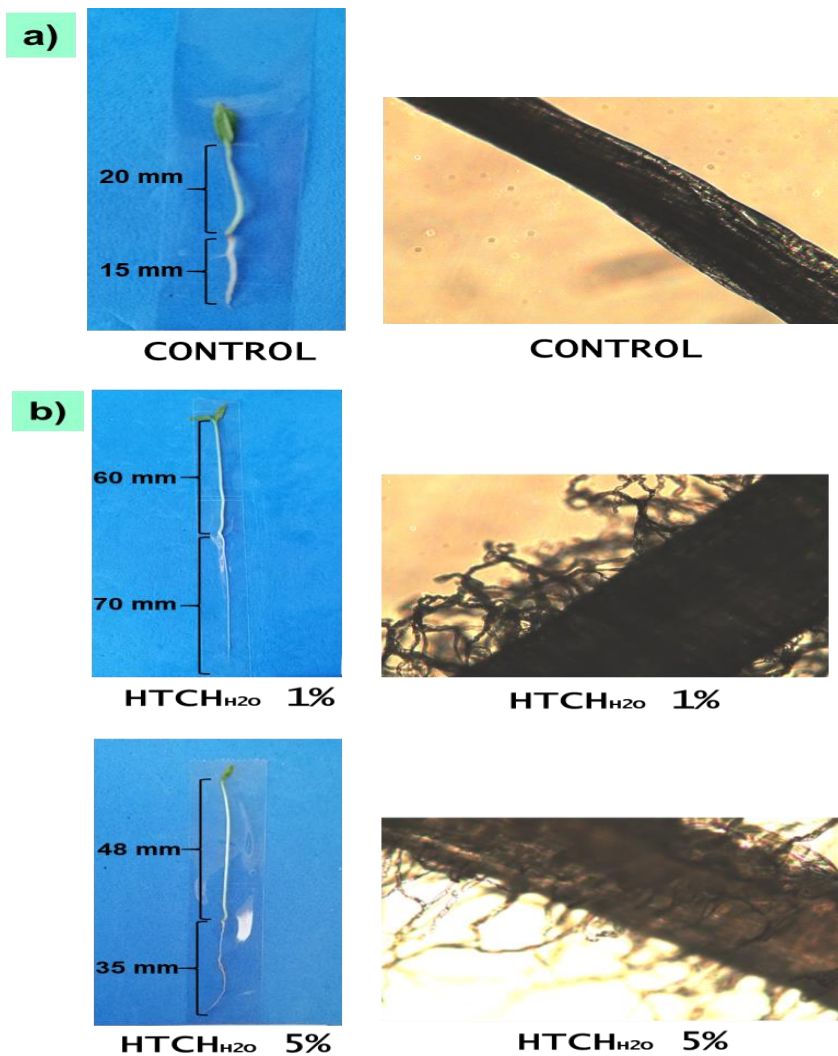
(Las barras color café representan el número de semillas que han germinado al sexto día y las barras de color verde corresponden al número de semillas germinadas con presencia de un pequeño tallo.)

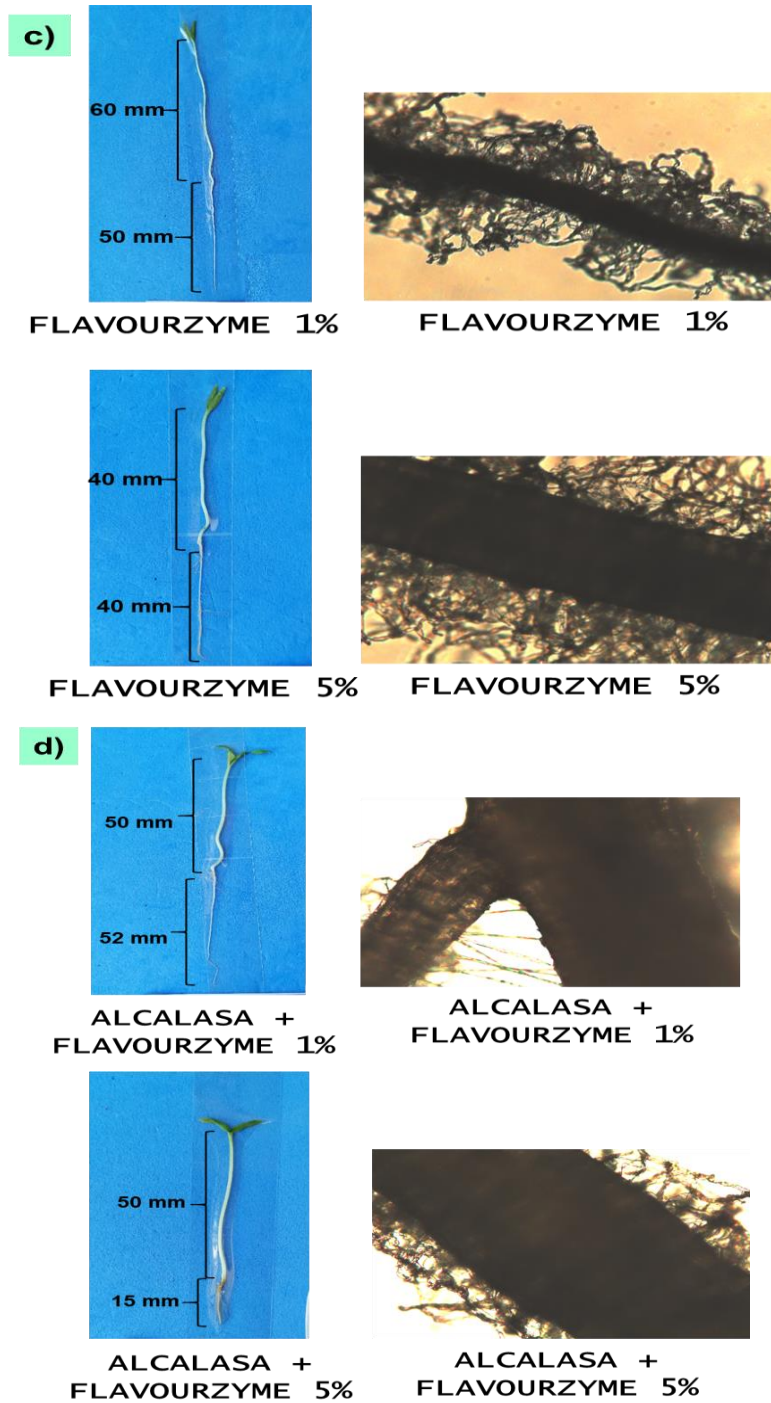
En el caso de los HPTCH, obtenidos por hidrólisis simple, se han obtenido resultados semejantes a los descritos más arriba, habiéndose obtenido los mejores resultados para el HPTCH<sub>F</sub> al 1%, si bien al compararlos con los obtenidos para el HTCH<sub>H2O</sub> al 1%, éste presenta una raíz ligeramente más fina y la longitud tanto de la raíz como del tallo también son ligeramente más cortas, aunque con más vellosidades y ramificaciones radiculares Figura-R.26c.

En los ensayos con los HPTCH obtenidos por hidrólisis secuencial, una endoproteasa seguido de una exoproteasa, se puede observar que las plántulas poseen una menor longitud tanto en HPTCH<sub>A+F</sub> al 1% como al 5%, pero en



ambos casos tanto la raíz como el tallo son más fuertes ya que presentan un grosor considerable, y en el caso del  $\text{HPTCH}_{\text{A+F}}$  al 5% se observa un mayor número de vellosidades que al 1% (Figura R.26d), aunque menor que en el caso de los HPTCH obtenidos por hidrólisis simple.





**Figura R.26** Raíces, tallos y vellosidades de plántulas crecidas en los diferentes ensayos al finalizar del mismo.

Estos resultados, iniciales, parecen estar apuntando que aunque tanto el  $\text{HTCH}_{\text{H}_2\text{O}}$  como los HPTCH favorecen al enraizamiento y al desarrollo de la plántula, en comparación con las plántulas tratadas con agua (control). Si bien, el tratamiento con el  $\text{HTCH}_{\text{H}_2\text{O}}$  favorece el desarrollo de las raíces, el tratamiento con los HPTCHs favorece el engrosamiento de las raíces y el desarrollo de vellosidades, estando favorecido el desarrollo de vellosidades en las plántulas crecidas en medios tratados con HPTCH obtenidos por hidrólisis simple (predominio de péptidos y oligopéptidos), mientras que el tratamiento con HPTCHs obtenidos por hidrólisis secuencial (predominio de aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos) parece favorecer el engrosamiento.

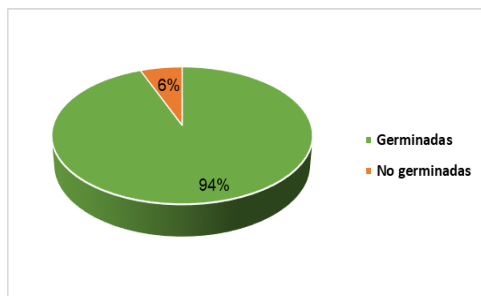
Así pues, podríamos concluir que el  $\text{HTCH}_{\text{H}_2\text{O}}$  presenta importantes propiedades para su uso como biofertilizante, un uso racional indicaría que probablemente diferentes mezclas entre el  $\text{HTCH}_{\text{H}_2\text{O}}$  y los HPTCHs y entre HPTCH simples y secuenciales, así como un uso temporal diferenciado (enraizamiento, desarrollo, floración, etc.) podría conducir a mejores resultados.

### **4.6.2 Uso del LE como biofertilizante (Valorización del LE)**

El LE, subproducto generado en el procesamiento del champiñón para conservas, debido al procedimiento de obtención cabía esperar que tuviera una composición semejante a la del extracto acuoso de la HTCH ( $\text{HTCH}_{\text{H}_2\text{O}}$ ) y por tanto también podría utilizarse como biofertilizante. Por ello procedimos a repetir el estudio de enraizamiento y germinación con este subproducto en tubos de agar.

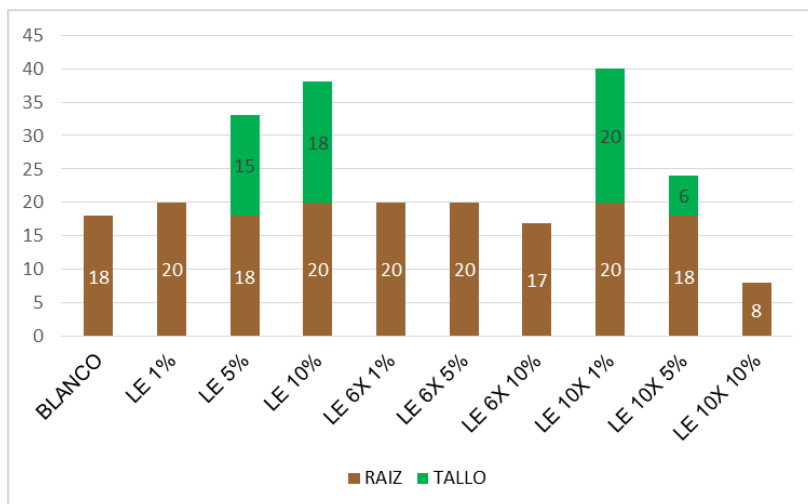
- Germinación de las Semillas con LE

En la Figura R.27 se muestra el porcentaje de semillas germinadas, que representó el 94%, valor muy semejante al obtenido con el  $HTCH_{H_2O}$  y los HPTCH.



**Figura R.27** Porcentaje de germinación en el ensayo con LE.

En este ensayo todas las semillas brotaron al sexto día, como se observa en la Figura R.28, y como en los casos del LE1X al 5% y del LE10X al 1 y 5% se observa la presencia del tallo.

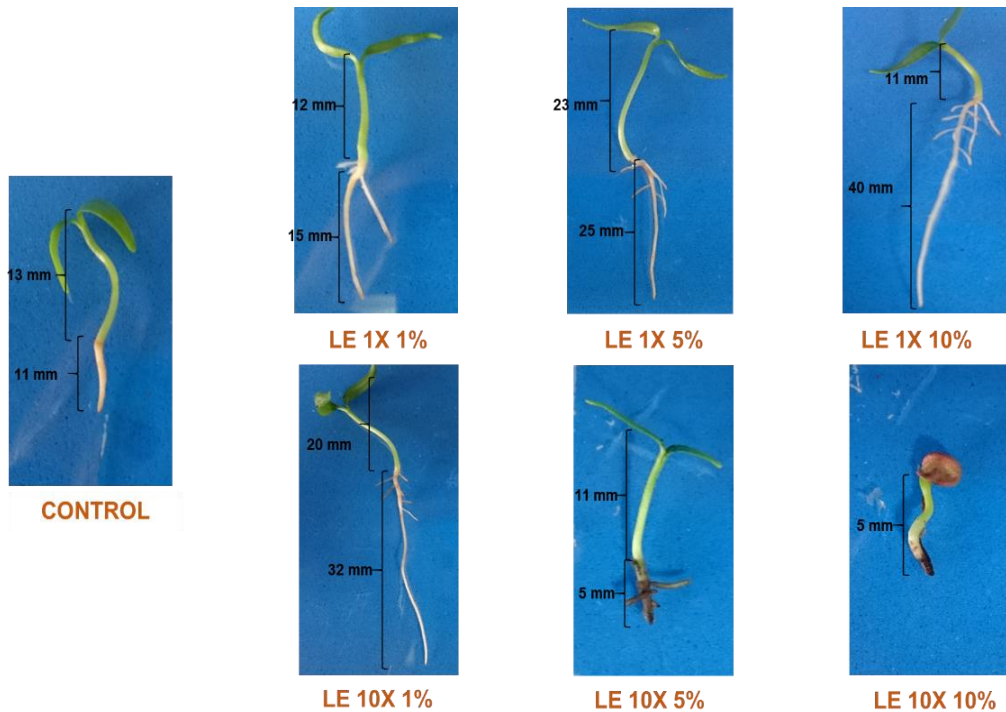


**Figura R.28** Tiempo necesario para la germinación y desarrollo de la planta en el día seis. (Las barras color cafés representan el numero de semillas que han germinado al sexto día y las barras de color verde corresponden al numero de semillas germinadas con presencia de un pequeño tallo.)

Los ensayos de germinación se llevaron a cabo durante 18 días donde ya se logró obtener plántulas con un tamaño adecuado.

En este ensayo los mejores resultados se obtuvieron del LE1X preparado al 5 y al 10% obteniendo una raíz con gran número de vellosidades y de mayor tamaño, al igual que el tallo. En el caso del LE las concentraciones elevadas y el exceso de este sustrato provoca que la raíz se atrofia e impida el desarrollo normal de la planta como se puede observar en la Figura-R.29 (LE10X 10%).

Una vez realizados estos ensayos de germinación se puede concluir que el LE al igual que los hidrolizados de la HTCH pueden ser utilizados como biofertilizantes. Pero al hacer la comparación entre estos dos, observamos que el LE preparado a concentraciones entre 5 y 10% es la mejor opción debido a que requiere de menos procesos y por lo tanto el costo es menor. Luego, teniendo en cuenta que estamos trabajando con un subproducto, esta sería una buena manera para su valorización, produciendo un producto de alto valor añadido, y contribuyendo al mantenimiento del medioambiente.



**Figura R.29** Plántulas obtenidas al finalizar el ensayo con LE preparados a distintas concentraciones.

Con el fin de obtener más información y analizar su comportamiento en suelo, pasamos al estudio en macetas con tierra, que una vez sembradas con las semillas, una por maceta, fueron regadas con cada uno de los preparados de LE anteriormente ensayados.

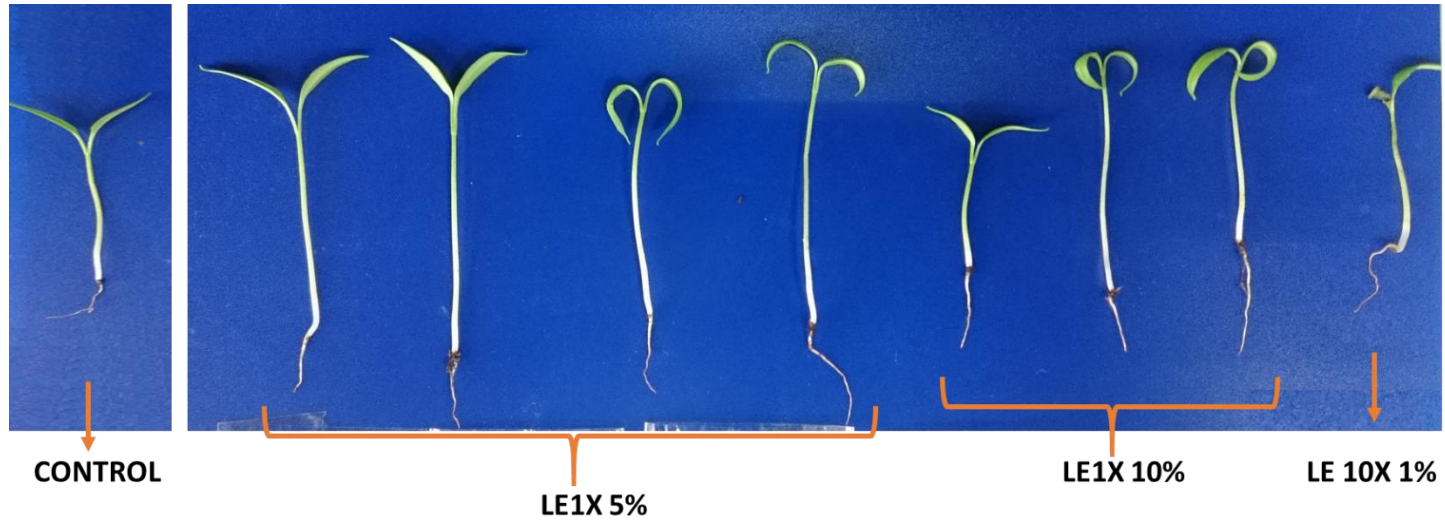
El ensayo se llevó a cabo durante 30 días, lograndose obtener plántulas con desarrollo de hojas. Al finalizar el ensayo se obtuvo un 45% de semillas que llegaron a germinar formando plántulas desarrolladas. Como se puede observar en la Figura-R.30 en cuanto al número de semillas ensayadas que fueron 5 en cada caso, solamente germinó en el blanco y en el LE10X 1% 1 semilla durante este periodo, y en el caso del LE1X 5% llegaron a germinar 4 de 5.

### DÍA 30



**Figura R.30** Ensayo de germinación de semillas de pimienta tratadas con LE, a distintas concentraciones, en tierra en el día 30.

Como se puede observar en la Figura-R.31 al analizar las plántulas obtenidas al finalizar el ensayo, las plántulas crecidas en tierra suplementada con LE a diferentes concentraciones muestran claramente un mayor desarrollo, tanto a nivel de raíz como de tallo e incluso folia. Estos resultados también muestran que los mejores resultados se logran cuando las plántulas son tratadas con LE1X al 5%, ya que es donde muestran un mayor desarrollo.en cuanto a la raíz y al tallo sin presentar ningún tipo de anomalía. Esto desde un punto de vista práctico es de un gran interés ya que no precisa de tratamiento alguno de concentración, lo que abarata el procedimiento. Si bien un cierto grado de concentración sí sería necesario ya que de esta manera se conserva mejor y ocuparía menos sitio, lo que para su almacenaje es fundamental; y a la hora de usarlo simplemente habría que diluirlo.



**Figura R.31** Plántulas obtenidas en el día 30 al finalizar el ensayo mediante el tratamiento con LE a distintas concentraciones.





# **CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

- ❖ Se han diseñado dos procesos biotecnológicos, basados en el uso de enzimas, encaminados a la valorización de subproductos derivados de la industria agroalimentaria. Logrando obtener un proceso eficiente y rentable que permite la obtención de productos de alto valor añadido.
- ❖ Se han preparado y caracterizado diferentes hidrolizados proteicos provenientes de los subproductos del champiñón con actividades biológicas y funcionales aplicables tanto como nutraceuticals como en la industria alimentaria como preservantes.
- ❖ Se han preparado y caracterizado diferentes hidrolizados proteicos de la harina de tallos de champiñón con actividad antioxidante, potencialmente utilizables en el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas que cursan con estrés oxidativo.
- ❖ Se han preparado y caracterizado diferentes hidrolizados proteicos de la harina de tallos de champiñón con una actividad antidiabética media, potencialmente utilizable en la prevención de la diabetes.
- ❖ Se han preparado y caracterizado diferentes hidrolizados proteicos de la harina de tallos de champiñón con actividad antitirosinasa, potencialmente utilizables en el retardo del deterioro por oxidación del champiñón y otros alimentos, lo que favorece el alargamiento de la vida media del producto.
- ❖ Se ha estudiado la aplicación de diferentes hidrolizados proteicos de la harina de tallos de champiñón como biofertilizante, constatando su efectividad tanto en el enraizamiento como en el desarrollo del tallo y folial.



# REFERENCIAS





## 6. REFERENCIAS

1. Adler-Nissen J (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science Publishers.
2. Aguilera, J.M. (2003). Drying and dried products under the microscope. *Food Science and Technology International*, 9(3), 137-143. doi.org/10.1177/1082013203034640.
3. Aguirre, L., Frias, J. M., Barry-Ryan, C., & Grogan, H. (2008). Assessing the effect of product variability on the management of the quality of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biology and Technology*, 49(2), 247-254.
4. Ahn, C. B., Kim, J. G., & Je, J. Y. (2014). Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 147, 78–83.
5. Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N., & Aluko, R. E. (2011). Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 6685-6702.
6. Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, R. J., Agboola, S. O., Mawson, A. J., He, R., Girgih, A., Aluko, R. E. (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 146, 500-506.
7. Anonimo Programa de Información de Alimentos Procesados. (2004). *Alimentos y Salud* (en línea).
8. Atkins, F. (1964). *El cultivo moderno de las setas*. 4ª edición. México. Compañía Editorial Continental S.A., 228 p.
9. Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., and Ferreira, I. C. F. R. (2008). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2742- 2747.
10. Basso, J. (1980). Como cultivar champiñones. *Chile Agrícola (Chile)* 5(50):192-193.
11. Beelman, R. B., Guthrie, B. D., & Royse, D. J. (1989). Influence of bacterial populations on postharvest deterioration of fresh mushrooms. *Mushroom Science*, 12(Part II), 655-666.
12. Bellesia, A., & Tagliazucchi, D. (2014). Cocoa brew inhibits in vitro  $\alpha$ -glucosidase activity: The role of polyphenols and high molecular weight compounds. *Food Research International*, 63,439–445.
13. Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Anal.Biochem.*, 1996, 239, 70-76.



14. Beyer D.M., (2017). Six steps to mushroom farming. Penn State Extension. Tomado de: <https://extension.psu.edu/six-steps-to-mushroomfarming>. Accedido el 11 junio 2019.
15. Biekman, E. S. A., Van Remmen, H. H. J., Kroese-Hoedeman, H. I., Ogink, J. J. M., & Schijvens, E. P. H. M. (1997). Effect of shrinkage on the temperature increase in evacuated mushrooms (*Agaricus bisporus*) during blanching. *Journal of Food Engineering*, 33(1-2), 87-99. doi.org/10.1016/S0260-8774(97)00044-7
16. Boa, E. Hongos silvestres comestibles: Perspectiva global de su uso e importancia para la población., FAO, Roma (2005). p. 163. ISBN: 92-5-305157-4.
17. Bougategf, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinellaaurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118, 559-565.
18. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
19. Burlo, F., J.M. Esteve, F. Martínez -Sánchez & A.A. Carbonell -Barrachina (2004). Métodos de conservación de *Agaricus bisporus* L. en fresco: 231-235. In: Da Graca, M. (Ed.). *Maturação e pós-colheita 2004*. Instituto Nacional de Investigacao Agrariae das Pescas. Olhao.
20. Burton, K.S., & Noble, R. (1993). The influence of flush number, bruising and storage temperature on mushroom quality. *Postharvest Biol. Technol.* 3(1): 39-47.
21. Buruleanu, L. C., Radulescu, C., Georgescu, A. A., Danet, F. A., Olteanu, R. L., Nicolescu, C. M., & Dulama, I. D. (2018). Statistical characterization of the phytochemical characteristics of edible mushroom extracts. *Analytical Letters*, 51:1039-1059.
22. Calonge, F.D. (2011). *Hongos medicinales*. Madrid: Editorial Mundi-Prensa. ISBN: 978-84-8476-508-0
23. Campos Casabón, J. C., & Arregui Álava, A. (2014). *Manual de buenas prácticas y Guía de Setas de Guadalajara*. Editorial: Diputación de Guadalajara.
24. Capasso, L. (1999). Laxatives and the Ice Man. *The Lancet*, 353(9156), 926. doi.org/10.1016/S0140-6736(05)75033-9.
25. Capelli, A. (1984). *Agaricus L. ex Fr. Fungi Europaei 1*, Italy: Librería Editrice Biella Giovanna. Saronno Pp. 123-125.
26. Casco-Lorence B., (2010). *Papel de los aminoácidos ramificados en la malnutrición asociada a enfermedades que cursan a través de vías hipercatabólicas*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
27. Chang, S. T., & Buswell, J. A. (1996). *Mushroom nutraceuticals*. *World Journal of*

- Microbiology and biotechnology, 12(5), 473-476.
28. Chang, S. T., & Miles, P. G. (1992). Mushroom biology a new discipline. *Mycologist*, 6(2), pp. 64-65.
  29. Chang, S.T., & Wasser, S.P. (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. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v14.i2.10
  30. Chang, S.T. (2005) Witnessing the development of the mushroom industry in China. In: Tan Q, Zhang J, Chen M, Cao H, Buswell JA (eds) *Proceedings of the 5th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products 8-12 April 2005, Shanghai, China, Acta Edulis Fungi*, 12 (supplement). 3-19.
  31. Chang, S.T. (2008). Descripción general del cultivo y la utilización de hongos como alimentos funcionales, PCK Cheung (Ed.), *Mushrooms as functional foods*, John Wiley & Sons Inc. , Nueva Jersey, pp. 1 – 33. ISBN: 978-0-470-05406-2.
  32. Chen, C., You, L. J., Abbasi, A. M., Fu, X., Liu, R. H., & Li, C. (2016). Characterization of polysaccharide fractions in mulberry fruit and assessment of their antioxidant and hypoglycemic activities in vitro. *Food & Function*, 7(1), 530–539.
  33. Choudhary, M. I., Shah, S. A. A., Atta-ur-Rahman, Khan, S. N., & Khan, M. T. H. (2010). Alpha-glucosidase and tyrosinase inhibitors from fungal hydroxylation of tibolone and hydroxytibolones. *Steroids*, 75(12), 956–966.
  34. Clemente, A., Sánchez-Vioque, R., Vioque, J., Bautista, J., Millán, F., 1997. Chemical composition of extracted dried olive pomaces containing two and three phases. *Food Biotechnology* (11): 273-291.
  35. Chen, G.-T., Zhao, L., Zhao, L.-Y., Cong, T., & Bao, S.-F. (2007). In vitro study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 357–362.
  36. Colmenares Cruz S., Sánchez J.E., Valle Mora j., (2017). *Agaricus bisporus* production on substrates pasteurized by self heating *AMB Expr* (2017) 7:135 DOI 10.1186/s13568-017-0438-6
  37. Cooke, M.C. (1871). *Handbook of British Fungi: with full descriptions of all the species, and illustrations of the genera. Vol 1.* London: Macmillan and Company. p. 1-488.
  38. Cremades, O., Diaz-Herrero, M. M., Carbonero-Aguilar, P., Gutierrez-Gil, J. F., Fontiveros, E., Rodríguez-Morgado, B., Parrado, J., & Bautista, J. (2012). Preparation and characterisation of selenium-enriched mushroom aqueous enzymatic extracts (MAEE) obtained from the white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food chemistry*, 133(4), 1538-1543. doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.046
  39. Cremades, O., Diaz-Herrero, M. M., Carbonero-Aguilar, P., Gutierrez-Gil, J. F.,

- Fontiveros, E., & Bautista, J. (2015). White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology. *Food Bioscience*, 10, 42-47. doi.org/10.1016/j.fbio.2015.01.001
40. Dahiya S., Kumar A.N., Sravan J.S., Chatterjee S., Sarkar O., Mohan S.V., (2018). Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy *Bioresource Technology* 248:2-12
41. De Pradena, J.M. (1996). Estudio bromatológico para la caracterización del champiñón. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
42. Deacon, J.W. (1990) *Introducción a la micología moderna*. México, D.F.: Ed. Limusa, p.350. ISBN: 9681826418, 9789681826413.
43. Devece, C., Rodríguez-López, J.N., Fenoll, J.T., Catalá, J.M., De los Reyes, E. y García-Cánovas, F. Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem*, 47: 4506-4511, 1999.
44. DONOSO, J. (1989). Hongos: Clasificación, identificación, relación hongo/árbol, introducción de especies comestibles exóticas. In.: *Antecedentes sobre hongos comestibles en Chile*. Pontificia Universidad Católica de Chile, Sede Regional Temuco. p: 6-30.
45. Edwards, J., (1984) *The Roman cookery of Apicius*. Vancouver: Hartley & Marks.
46. Eo, S. K., Kim, Y. S. et al. (2000). Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *Journal of Ethnopharmacology* 72: 475-481. doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00266-X
47. FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, <http://www.fao.org/corp/statistics/en>. Fecha de consulta 2018.
48. FAO, 2018a. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, *FAO Global Statistical Yearbook*. Fecha de consulta 2018.
49. FAO, 2018b. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, *FAO Regional Statistical Yearbooks*. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Fecha de consulta 2018.
50. FAO, WHO, (1991). Protein quality evaluation, report of joint FAO/WHO expert consultation (p. 23). Rome, Italy: Food and Agricultural Organization of the United Nations.
51. Fericgla, J.M<sup>a</sup>., Hoffmann, A., Samorini, G., Escohotado, A., Ott, J., Obiols, J., Camí, J., Barbanj, M., Riva, J., (2000) *Los Enteógenos y la Ciencia*. Nuevas aportaciones científicas al estudio de la droga. Abya Yala. Universidad Politecnica Salesiana. Quito. 169 p.

52. Fernández Michel, F. 2005. Manual práctico de producción comercial de champiñón. Apuntes, recopilación de datos y experiencias adquiridas en el cultivo comercial de champiñones. Guadalajara, Jalisco- México. (feb. 2005). (On Line).
53. Fletcher, J.T., White, P.F., Gaze, R.H. (1991); Champiñones: control de las enfermedades y plagas, primera edición, Editorial Acribia S.A. impreso en España, Zaragoza – España, 280 pág. ISBN: 978-84-200-0702-1.
54. Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Pegg, R. B., & Kong, F. (2013). Antioxidant and enzyme inhibitory activities of blueberry anthocyanins prepared using different solvents. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 61(18), 4441–4447.
55. Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
56. García, A., & Sánchez, J.A., (2009). Setas de la Península Ibérica y de Europa. Ed. Everest. 840 p. ISBN: 8424170954, 9788424170950.
57. García-Mendoza, C. (2000). Algunos aspectos estructurales y funcionales de la pared celular de *Agaricus bisporus* y sus aplicaciones más inmediatas. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 66,1-19.
58. Garcia Ortiz, L. R., & Muñoz, R. (2002). Evaluación de tres materiales como sustrato y dos materiales como tierra de cobertura para el cultivo del champiñón (*Agaricus bisporus* (Lange) Sing.) (No. T1533). ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA.
59. Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., Li, H., Adebisi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Kinetics of enzyme inhibition and antihypertensive effects of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 1767–1774.
60. Gonzaga, M. L. C., Ricardo, N. M., Heatley, F., & Soares, S. D. A. (2005). Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers*, 60(1), 43-49. doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.11.022
61. González, J.A. (2002). Hombres, dioses y hongos: hacia una visión etnobotánica del mito. Vol 10. Editorial Edaf. ISBN: 84-4141045-3.
62. Gopalakrishnan, C., Pawar, R. S., & Bhutani, K. K. (2003). Development of *Agaricus bisporus* as a nutraceutical of tomorrow. In III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants-Volume 6: Traditional Medicine and Nutraceuticals 680 (pp. 45-47).
63. Harnedya P.A., Parthasarathy V., McLaughlin Ch.M., O'Keeffe M.B., Allsopp P.J., McSorley E.M., O'Harte F.P.M., FitzGerald R.J., (2018). Atlantic salmon (*Salmo salar*) co-product-derived protein hydrolysates: A source of antidiabetic peptides

- Food Research International 106:598–606.
64. Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105, 1422-1432. doi.org/10.1017/S0953756201004725.
  65. He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., y Aluko, R. E., (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, 5, 219-227.
  66. Hicks, K. B. & Moreau R. A. (2001). Phytosterols and Phytostanols: Functional Food Cholesterol Busters. *Food Technology* 55: 63-67.
  67. *Historia natural XII-XVI de Plinio el Viejo.*, 2010. Editorial Gredos. ISBN: 9788424915254.
  68. Hwang C-F., Chen Y-A., Luo C., Chiang W-D., (2016). Antioxidant and antibacterial activities of peptide fractions from flaxseed protein hydrolysed by protease from *Bacillus altitudinis* HK02. *International Journal of Food Science & Technology* 51(3): n/a-n/a. DOI: 10.1111/ijfs.13030
  69. Imbach, E. J. (1946). *Squamanita Schreieri* (Tricholoma X). *Schuppen-Wulstling*. *Schw. Z. Pilzk*, 20, 130-131.
  70. Jin, D.-X., Liu, X.-L., Zheng, X.-Q., Wang, X.-J., & He, J.-F. (2016). Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 204, 427–436.
  71. Khanna P.K., (2003). *Mushroom growing*. A.P. Singh (Ed.), *Mushroom Cultivation*, Punjab Agricultural University Press, Ludhiana (2003), pp. 1-60.
  72. Kim, G. Y., Lee, M. Y., Lee, H. J., Moon, D. O., Lee, C. M., Jin, C. Y., Choi, Y.H., Jeong, Y.K., Chung, K.T., Lee, J.C., Choi, I. H., & Park, Y.M. (2005). Effect of water-soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *International immunopharmacology*, 5(10), 1523-1532. doi.org/10.1016/j.intimp.2005.02.018
  73. Kolayli, S.; Ocak, M.; Kucuk, M. and Abbasoglu, R. Does caffeine bind to metal ions?. *Food Chem.*, 2004, 84, 383-388.
  74. Kotwaliwale, N., Bakane, P. y Verma, A. Changes in textural and optical properties of oyster mushroom during hot air drying. *Journal of Food Engineering*, 78:1207-1211, 2007.
  75. Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Song, C. H., Cho, K. Y., & Pang, G. (2009). Vitamin D2 formation and bioavailability from *Agaricus bisporus* button mushrooms treated with ultraviolet irradiation. *J. Agric. Food Chem.*, 57(8), 3351-3355. DOI: 10.1021/jf803908q
  76. Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Pang, G., Teal, A., & Biggs, T. (2011). Concentration of vitamin D2 in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) exposed to pulsed UV light. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7),

- 976-979. doi.org/10.1016/j.jfca.2011.02.007
77. Lange, J.E (1926). Studies in the agarics of Denmark. Part VI. Psalliota, Russula. Dansk botanisk Arkiv 4 (12): 1-52.
  78. Lebeque Y., Morris HJ., Beltran Y., Llauro G., Gaimé-Perraud J., Meneses M., Moukha S., Bermudez R.C., y García N., (2018). Proximal Composition, Nutraceutical Properties, and Acute Toxicity Study of Culinary-Medicinal Oyster Mushroom Powder, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes). INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICINAL MUSHROOMS 20:1185-1195.
  79. López Contini, E. (1990); Cultivo del champiñón, la trufa y otros hongos comestibles, primera edición, Aedos editorial S.A., Madrid – España, 132 pág. ISBN 10: 8470033042 / ISBN 13: 9788470033049.
  80. Lowi, B. (1974). *Amanita muscaria* and the thunderbolt legend in Guatemala and Mexico. *Mycologia* 66, 188-190.
  81. Lowry, O. H. (1951). Rosebrough, NJ, Farr, AL, and Randall, RJ Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem*, 193(1), 265-275.
  82. Mattila, P., Salo-Väänänen, P., Könkö, K., Aro, H., & Jalava, T. (2002). Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6419-6422.
  83. McGee, C. F. (2018). Microbial ecology of the *Agaricus bisporus* mushroom cropping process. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(3), 1075-1083. doi.org/10.1007/s00253-017-8683-9.
  84. Mehrotra, R.S., & Aneja, K.R. (1990). An introduction to mycology. New age international publishers. ISBN: 81-224-0089-2.
  85. Memarpoor-Yazdi, M., Mahaki, H., and Zare-Zardini, H. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from *Zizyphus jujuba* fruits. *Journal of functional foods*. 5: 62-70.
  86. Merz M., Eisele T., Berends P., Appel D., Rabe S., Blank I., Stressler T., and Fischer L., (2015). Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. *J. Agric. Food Chem*. 63:5682–5693.
  87. Miles P.G. & Chang S.T. (1997). *Mushroom biology: concise basics and current developments*. World Scientific. ISBN: 981-02-2877-5
  88. Ministerio de Agricultura, (2014). *Avances, Superficie y Producciones de Cultivos*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid. Ministry of Agriculture, Food and Environment (Spain), Spain, pp. 55, Translated as: Progress, Area and Crop Production.
  89. Moore, S. & Stein, W.H. (1973). Chemical structures of pancreatic ribonuclease and deoxyribonuclease. *Science* 180, 458-464.

90. Mudgila P., Kamala H., Yuen G.C., Maqsooda S., (2018). Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates. *Food Chemistry* 259:46–54.
91. Najafian, L., & Babji, A. S. (2014). Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 9, 280-289.
92. Oboh, G., Akinyemi, A. J., Ademiluyi, A. O., & Adefegha, S. A. (2010). Inhibitory effects of aqueous extract of two varieties of ginger on some key enzymes linked to type-2 diabetes in vitro. *Journal of Food & Nutrition Research*, 49(1), 14-20.
93. Ossenbach, C., Arce, J., & Warner, J. (2007). Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: Deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas. *Tierra Tropical*, 3(1), 47-59.
94. Özçelik, E., & Pekşen, A. (2007). Hazelnut husk as a substrate for the cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). *Bioresource technology*, 98(14), 2652-2658.
95. Parrado, J., Millan, F., Hernández-Pinzón, I., Bautista, J., y Machado, A. (1993). Caracterización de hidrolizados enzimáticos de la proteína del girasol. *Diario de química agrícola y alimentaria*, 41 (11), 1821-1825.
96. Polat, E., Uzun, H. I., Topçuoğlu, B., Önal, K., Onus, A. N., & Karaca, M. (2009). Effects of spent mushroom compost on quality and productivity of cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown in greenhouses. *Afr J Biotechnol*, 8(2): 176-180. Disponible en: <http://www.acta.org.co/piap/alimento/revista4.htm#enlatado>
97. Quer, P. F., & Davit, S. (1962). Plantas medicinales: El Dioscórides renovado (p. 543). Labor. Barcelona: Ediciones península 1999. ISBN: 9788483072424.
98. Quintard, A. M. (1977). Champiñones. Técnicas para el cultivo en sacos plásticos. *El Campesino*. v, 108(4), 40-45.
99. Rao P.S., Mayur A., Harisha N.B., Bajaj R. and Mann B., (2018). Comparison of OPA and pH stat methods for measurement of degree of hydrolysis of alcalase and flavourzyme digested casein. *Indian J Dairy Sci* (2018)71(1):107-109.
100. Reis, FS, Martins, A., Barros, L., y Ferreira, IC (2012). Propiedades antioxidantes y perfil fenólico de los hongos cultivados más apreciados: un estudio comparativo entre muestras in vivo e in vitro. *Toxicología alimentaria y química*, 50(5), 1201-1207.
101. Rice-Evans, C., and Miller, N. J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymology* 234, 279-293.

102. Roberts, J. S., Teichert, A., & McHugh, T. H. (2008). Vitamin D2 formation from post-harvest UV-B treatment of mushrooms (*Agaricus bisporus*) and retention during storage. *J. Agric. Food Chem.*, 56(12), 4541-4544. DOI: 10.1021/jf0732511
103. Rojas, Á., Gallego, P., Gil-Gómez, A., Muñoz-Hernández, R., Rojas, L., Maldonado, R., Gallego-Durán, R., García-Valdecasas, M., Del Campo, José A., Bautista, J., & Romero-Gómez, M. (2018). Natural Extracts Abolished Lipid Accumulation in Cells Harboring non-favourable PNPLA3 genotype. *Annals of hepatology*, 17(2), 242-249.
104. Roncero, I. (2015). Propiedades nutricionales y saludables de los hongos. Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de La Rioja (CTICH).
105. Royse, D. J., Baars, J., & Tan, Q. (2017). Current overview of mushroom production in the world. *Edible and medicinal mushrooms: Technology and applications*, 5-13. doi.org/10.1002/9781119149446.ch2
106. Royse, D. J. (2007). I. Consumo y Produccion de *Agaricus Bisporus* en el mundo. *Agaricus Bisporus*, 7.
107. Sadhukhan j., Martinez-Hernandez E., Murphy Richard J., Ng D.K.S., Hassim M.H, Ng K.S., Kin W.Y., Jaye I.F., Hang M.Y.L.P.H., Andiappan V., (2018). Role of bioenergy, biorefinery and bioeconomy in sustainable development: Strategic pathways for Malaysia. *RENEWABLE & SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS* 81:1966-1987:
108. Salas, P. y Drager, J. (1981). El cultivo del champiñón. *Tecnología y agricultura (Chile)* julio-agosto 15:19-22.
109. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., and Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76, 270-276.
110. Sarmadi, B. H., y Ismail, A., (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31, 1949–1956.
111. Samorini, G., & Zanarini, R. (2001). Los alucinógenos en el mito: relatos sobre el origen de las plantas psicoactivas. Barcelona: La Liebre de Marzo.
112. Sánchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F., y García-Carmona, F., (1995). Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1247(1), 1–11.
113. Sánchez, J. E., & Royse, D. (2001). El cultivo de *Pleurotus* spp. *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* Primera edición, editorial San Cristóbal de las Casas, impresión en México, Chiapas – México, 289 pág.
114. Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (5), 1321-1337. DOI: 10.1007/s00253-009-2343-7
115. Santoyo, S., Ramírez-Anguiano, A. C., Reglero, G., & Soler-Rivas, C. (2009).



- Improvement of the antimicrobial activity of edible mushroom extracts by inhibition of oxidative enzymes. *International Journal of Food Science and Technology* 44(5): 1057-1064. doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01896.x
116. Sapan C.V., Lundblad R.L., Price N.C., (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Bitechnol Appl Biochem* 29:99-108.
117. Schäffer J., Møller FH. (1939). Beitrag zur Psalliota Forschung. *Annales Mycologici* (in German) 36 (1): 64-82.
118. Schimpf, U., y Schulz, R. (2016). Industrial by-products from white-rot fungi production. Part I: Generation of enzyme preparations and chemical, protein biochemical and molecular biological characterization. *Process Biochemistry*, 51(12), 2034-2046.
119. Shi, Y., Kovacs-Nolan, J., Jiang, B., Tsao, R., & Mine, Y. (2014). Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from eggshell membrane proteins and its protective capacity in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, 10, 35-45.
120. Souza, P. M., Elias, S. T., Simeoni, L. A., Paula, J. E. D., Gomes, S. M., Guerra, E. N. S., Fonseca, Y.M., Silva, E.C., Silveira, D., Magalhães, P.O. (2012). Plants from Brazilian cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. *PloS one*, 7(11), e48589.
121. Steineck, H. (1972). Cultivo comercial del champiñón. Zaragoza. España. Editorial Acribia. 112 p.
122. Tang, C.-H., Wang, X.-S., & Yang, X.-Q. (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 114, 1484–1490.
123. Toovey, F.W. (1963). Cultivo del champiñón: Manuales de técnica agropecuaria. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 152 p.
124. Toovey, F.W. (1987), Cultivo del Champiñón, segunda edición, Editorial Acribia S.A. impreso en España, Zaragoza – España, 152 pág. ISBN: 8420002046, 9788420002040.
125. Toth, B., Patil, K. y Hwan-Soo, J. Carcinogenesis of 4-(hydroxymethyl) benzenediazonium (tetrafluoroborate) of *Agaricus bisporus*. *Cancer Res.*, 41: 2444, 1981.
126. Tudela, J. (1952) Fray Bernardino de Sahagún, VV. AA., *Diccionario de Historia de España desde sus orígenes hasta el fin del reinado de Alfonso XIII.*, Tomo II, p. 1091-1092.
127. Uzun, I. (2004). Use of spent mushroom compost in sustainable fruit production. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 12, 157-165.
128. Vedder, P.J.C. (1978), Cultivation. In *the Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, 377-392, Ed: by S.T. Chang and W.A. Hayes. Academic Press, New

- York, San Francisco.
129. Vedder, P.J.C. (1996). Cultivo moderno del champiñón. Ediciones Mundi-Prensa. 369 p. ISBN: 8471140748, 9788471140746
130. Wang, Q., Li, W., He, Y., Ren, D., Kow, F., Song, L., Yu, X., (2014). Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*). *Food Chemistry*, 145, 991– 996.
131. Wasson, R.G. (1957). En busca del hongo mágico. *Revista Life en Español*. 3 de Junio de 1957.
132. Xu, T., B Beelman, R., & D Lambert, J. (2012). The cancer preventive effects of edible mushrooms. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 12(10), 1255-1263.
133. Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X. D., Zhong, H., Wang, S., Sun, W., Zhou, Q. (2012). Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chemistry*, 134, 1360-1367.
134. Zheng, R., Jie, S., Hanchuan, D., & Moucheng, W. (2005). Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *International immunopharmacology*, 5(5), 811-820. doi.org/10.1016/j.intimp.2004.11.011
135. Zumwalt R.W., Absheer J.S., Kaiser F.E., Gehrke C.W., (1987). Acid hydrolysis of proteins for chromatographic analysis of amino acids. *J Assoc Off Anal Chem*. 70:147-51.
- 136.



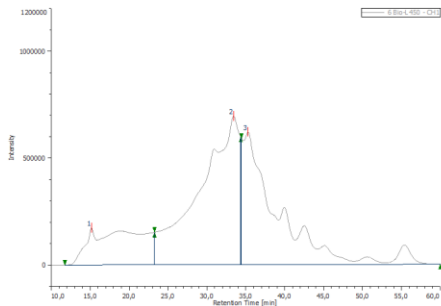
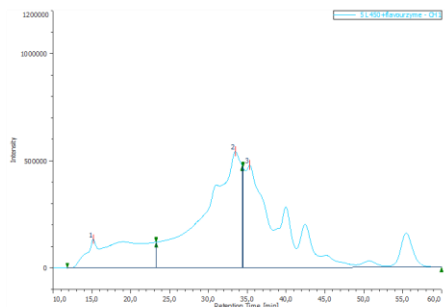
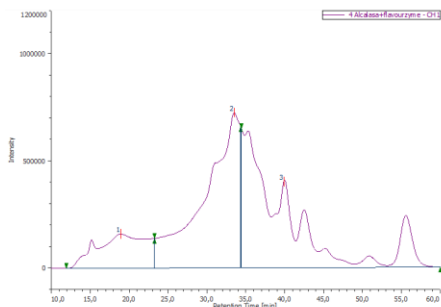
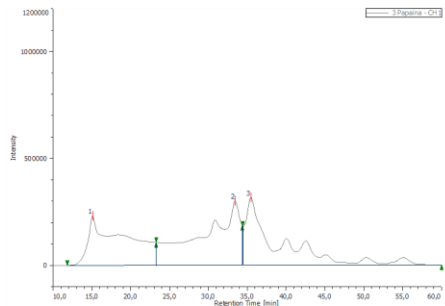
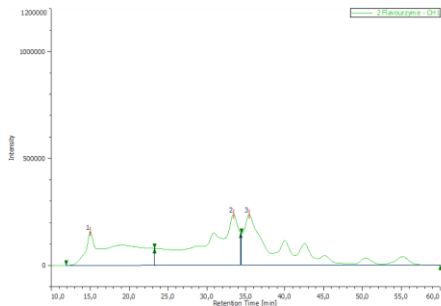
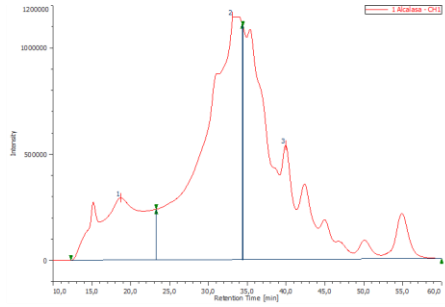
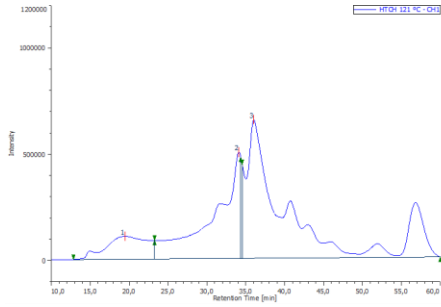
# ANEXOS

---

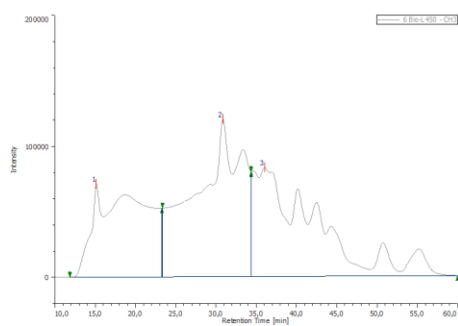
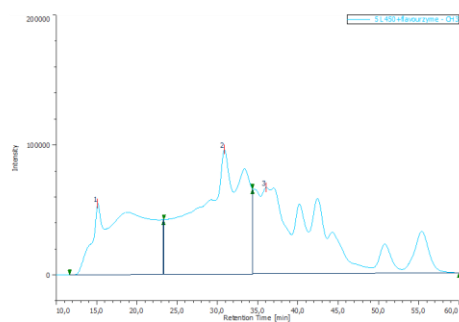
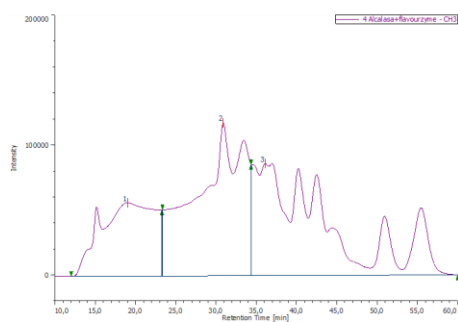
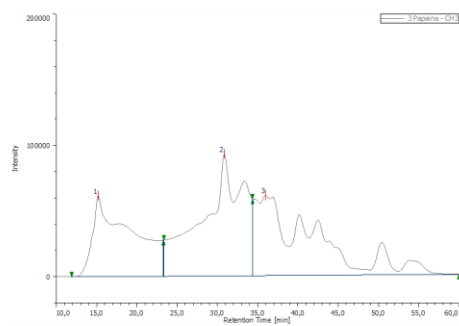
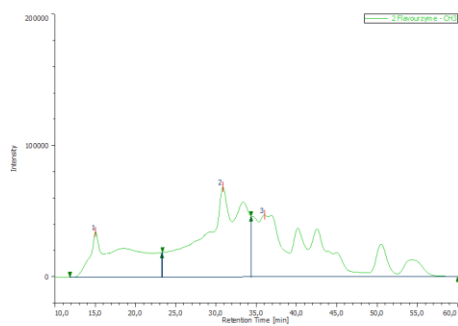
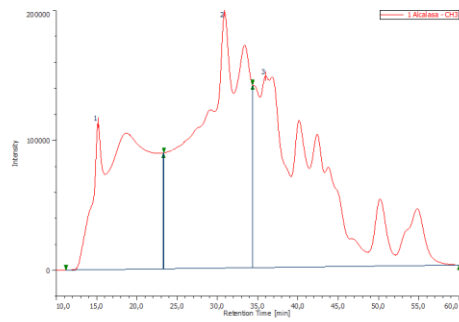
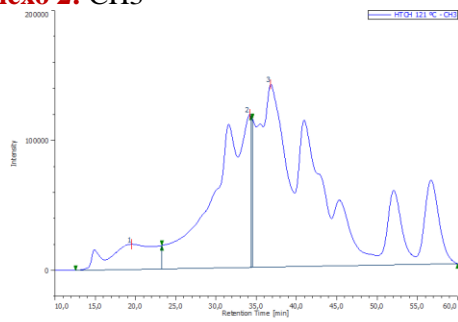


• ANEXOS

**Anexo 1: CH1**



## Anexo 2: CH3



**Anexo 3:**

**TINCION CON PLATA COMPATIBLE CON MS**

Recomendamos preparar 250 ml de cada solución utilizando reactivos de alta calidad, libre de queratinas y contaminantes. Utilizar guantes y recipientes limpios.

1- FIJACION

50% metanol, 5% ácido acético durante 15 minutos.

2-SENSIBILIZACION

30 % metanol, 7 % acetato de sodio, 0,02 % tiosulfato de sodio durante 5 minutos.

3-TEÑIDO

0,1 % nitrato de plata durante 20 minutos

4-LAVADOS

3 lavados de 1 minuto con agua miliQ.

5-REVELADO

2 % carbonato de sodio, 0,05 % formalina (formaldehído al 35%). Agitar 20-30 segundos (se pone amarilla la solución) y cambiar por solución fresca. Repetir hasta lograr el grado de tinción deseado.

6-FINALIZACION

1,5 % EDTA en agua miliQ o se puede utilizar una solución 5 % ácido acético en agua.

7-LAVADOS

3 lavados de 1 minuto con agua miliQ



### Anexo 4:

#### Composición de los geles discontinuos de poliacrilamida.

##### 1. Gel de Separación o corrido 12%

Acrilamida 30%	6 mL
Bis-acrilamida 1%	2,37 mL
Tampón de Separación 4X (pH 8,8)	3,81 mL
H <sub>2</sub> O	2,82 mL
TEMED	30 µL
APS (Persulfato amónico 50% p/v)	30 µL
Volumen final	15 mL

##### 2. Gel de concentración o empaque 5%

Solución A (Acrilamida 30%- Bisacrilamida 1%)	1,67 mL
Solución C (Tampón de empaque 4x pH 6,8 )	1 mL
H <sub>2</sub> O	7,33 mL
TEMED	25 µL
APS (Persulfato amónico 50% p/v)	40 µL
Volumen final	10 mL

**Anexo 5: PAGE-SDS****ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE ACRLAMIDA  
EN TRIS-GLICINA****SOLUCIONES****Soluciones stock****1. Tris-HCl 100 mM (pH 6,8):**

Tris	1,211 g
H <sub>2</sub> O	80 mL
Ajustar el pH a 6,8	
H <sub>2</sub> O csp	100 mL

**2. SDS 10% (p/v):**

SDS	10 g
H <sub>2</sub> O csp	100 mL

**3. Azul de Bromofenol 0,5% (p/v):**

Azul de Bromofenol	0,25 g
H <sub>2</sub> O	50 mL

**Soluciones de trabajo****1. Acrilamida 30% (p/v):**

Acrilamida	30 g
H <sub>2</sub> O	100 mL

**2. Bis-acrilamida 1% (p/v):**

Bis-acrilamida	0,5 g
H <sub>2</sub> O	50 mL

**3. Running buffer 4X:**

1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	36 g
H <sub>2</sub> O	150 mL
Ajustar pH 8,8	
0,4% SDS	8 mL de SDS al 10%
Revisar pH	
H <sub>2</sub> O csp	200 mL

### 4. Solución A (Solución stock de acrilamida, T= 30%, C= 2,7%)

Acrilamida	29,2 g
Bis-acrilamida	0,8 g
H <sub>2</sub> O csp	100 mL

Durante la preparación de esta solución trabajar siempre con guantes y en campana. (Acrilamida es Neurotóxica)

### 5. Stacking buffer 4X (Solución C):

0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	6,05 g
H <sub>2</sub> O	50 mL
Ajustar pH 6,8	
0,4% SDS	4 mL de SDS al 10%
Revisar pH	
H <sub>2</sub> O csp	100 mL

### 6. Tampón de electroforesis 1X:

Tris-HCl 25mM	3 g
Glicina 190mM	14,258 g
SDS 0,1%	10 mL de SDS al 10%
H <sub>2</sub> O	900 mL
Ajustar pH a 8,4 con HCl gota a gota	
H <sub>2</sub> O csp	100 mL

Estable a temperatura ambiente varias semanas. Preferible preparar cada semana.

### 7. Tampón de muestra 4X (de carga, de disociación, Mixer):

0,02M Tris-HCl pH 6,8	2 mL de Tris-HCl 100mM
20% β-mercaptoetanol	2 mL
4,6% SDS	0,46 g
40% glicerol	4 mL de glicerol al 99%
0,01% azul de Bromofenol	0,3 mL de AdB al 0,5% (p/v)
H <sub>2</sub> O csp	10 mL
Hacer alícuotas y guardar a -20 °C	

**Anexo 6: XIII EUCHIS & VIII SIAQ****PREPARATION OF FUNGAL CHITIN FROM AGROINDUSTRIAL BY-PRODUCTS: APLICATION TO EDIBLE MUSHROOMS (*Agaricus bisporus*) BY-PRODUCTS.**

**Alberto Renato Inca Torres, Anabell Del Rocío Urbina Salazar, Gonzalo Falcón García, Pilar Carbonero Aguilar, and Juan Bautista Palomas.**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. 41012-Sevilla, Spain.*

The use of chitin-oligosaccharides for use as potential elicitors requires abundant chitin rich materials, readily available and cheap (1). For this purpose, the production of enriched chitin fractions from by-products of the edible mushroom processing industry are of great interest if appropriated procedures were developed (2).

Traditional methods for the commercial preparation of chitin involve alternate hydrochloric acid and alkali treatment, followed by a bleaching stage with chemical reagents to obtain a colorless product. These processes are highly contaminant. Therefore, the developments of environmental friendly processes are of high interest. In this work we report on preliminary results obtained with an enzymatic procedure, environmental friendly, based on the use on proteases and glucanases that lead to fungal chitin fraction with a chitin concentration  $> 80\pm 2\%$ .

**References**

- (1). Gianfranco Romanazzi, Simona Marianna Sanzani, Yang Bi, Shiping Tian, Porfirio Gutiérrez Martínez, Noam Alkan, (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 82-94
- (2). K.S. Matsumoto, R.G. Guevara-González, I. Torres-Pacheco, (2006). Fungal chitinases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, pp. 289–304

### Anexo 7: IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia

---

#### **“In vitro” study of mushroom ergothioneine enriched aqueous extracts (M-ERG-EAE) against oxygen activated substances.**

Alberto Renato Inca-Torres<sup>1,2</sup>, Anabell Del Rocío Urbina-Salazar<sup>1,2</sup>, Gonzalo Falcón-García<sup>1</sup>, Olga Cremades de Molina<sup>1</sup>, and Juan Bautista<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/ Profesor 7 García González 2, 41012 - Sevilla, Spain, [jdbaut@us.es](mailto:jdbaut@us.es);* <sup>2</sup> *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Panamericana Sur km 9 1 1/2, EC060155 - Riobamba, Ecuador, [jannethjara@hotmail.com](mailto:jannethjara@hotmail.com).*

Ergothioneine (ERG), 2-mercapto-L-histidine betaine, is a dietary component acting as antioxidant and cytoprotectant. ERG scavenges hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide anion (•O<sub>2</sub><sup>-</sup>), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), lipid peroxides, hydroxyl radical (•OH) and nitric oxide (NO) derivatives (1). ERG exhibits potential applications as a food additive and as an antioxidant for the treatment and/or prevention of oxidative stress related diseases (2).

Commercial ERG are mainly synthetic, however natural ERG is preferred by consumers. In this work we present a natural product enriched in natural ERG in the form of extract, M-ERG-EAE, obtained from the edible mushroom (*Agaricus bisporus*) using enzymes and membrane technology (MAE) (3). This product can be incorporated in solid or liquid foods or used as a component of cosmetic creams such as sunscreen creams.

“In vitro” studies show that M-ERG-EAE, as pure ERG, scavenged the superoxide anion radical (•O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), preventing the formation of the high dangerous radical •OH and preventing the damage in biomolecules, mainly proteins, nucleic acids and lipids.

From these results, we concluded that M-ERG-EAE, as pure ERG, scavenged •O<sub>2</sub><sup>-</sup> and <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, reducing the formation of the high dangerous radical •OH mainly in presence of transition metals such as Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>+</sup>.

#### References:

- (1) Servillo L., D’Onofrio N., Casale R., Cautela D., Giovane A., Castaldo D., Balestrieria M.L. (2017). Ergothioneine products derived by superoxide oxidation in endothelial cells exposed to high-glucose. *Free Radical Biology and Medicine*, 108:8–18.
- (2) Halliwell B., Cheah I.K., Drum C.L. (2016). Ergothioneine, an adaptive antioxidant for the protection of injured tissues? A hypothesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470:245–250.
- (3) Cremades O., Diaz-Herrero M.M., Carbonero-Aguilar P., Gutierrez-Gil J.F., Fontiveros E., Bautista J. (2015). White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology. *Food Bioscience*, 10:42 – 47.

## Anexo 8: III JORNADAS DOCTORALES DE FARMACIA

### REVALORIZACION DE LOS SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA DE HONGOS Y SETAS COMESTIBLES. Aplicación a la obtención del antioxidante natural Ergotioneina y de Biofertilizantes ricos en aminoácidos y oligopéptidos.

Alberto Renato Inca-Torres

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*

#### Introducción

La producción de setas comestible en España, destinadas al consumo en fresco o en forma de conservas, representa entre el 7 y el 8% de la producción mundial, estimada para el año 2017 en 10.317.092 Tm (1). Este gran volumen de producto genera entre el 25 y el 30% de sub-productos, constituido fundamentalmente por tallos y setas no comercializables, que o no se usan o mal usan. Sin embargo, debido a su composición, podrían ser materia prima para la obtención de diversos productos de alto valor añadido, utilizables en la industria químico-farmacéutica, alimentaria, cosmética o en la moderna agronomía. Este sub-producto es rico en proteínas (23-32%, p.s.), carbohidratos (65-72%, p.s.) y en diversas sustancias beneficiosas para la salud (ergotioneina, ergosterol –precursor de la vitamina-D2- (2,3).

Para este fin, en el presente trabajo se describe un proceso biotecnológico basado en el uso de enzimas para la obtención de: i) hidrolizados proteicos potencialmente utilizables en agronomía y en cosmética; ii) productos nutracéuticos enriquecidos en ergotioneina (antioxidante), potencialmente utilizables en la industria médico-farmacéutica y cosmética; iii) nano-quitina utilizable en la industria químico-farmacéutica.

#### Objetivos

1. Diseño de procesos biotecnológicos para la producción y obtención de compuestos de interés industrial, médico-farmacéutico, cosmético y agronómico a partir de subproductos de la industria de hongos y setas comestibles. 2. Obtención de hidrolizados proteicos potencialmente utilizables en agronomía y en cosmética. 3. Obtención de productos nutracéuticos enriquecidos en ergotioneina (antioxidante). 4. Obtención de nano-quitina.

#### Material y Métodos

**Preparación de harina de tallos de champiñón (HTCH):** Secado en túnel de aire caliente (50°C) y molienda en un molino de cuchillas, con un tamiz de 0,5 mm.

**Preparación de extractos brutos:** Los extractos brutos se han preparado mediante hidrólisis enzimáticas en un PH-stat con control de pH, temperatura y agitación, utilizando una relación E/S de 0,3%. Los diferentes extractos enriquecidos en un compuesto en particular se han llevado a cabo mediante fraccionamiento por ultrafiltración o cromatográficos en batch. **Técnicas analíticas:** La composición de los distintos extractos y producto se ha llevado a cabo por los procedimientos clásicos de la AOAC. La

ergotioneina se ha determinado por HPLC, el ergosterol por HPCL-MS, el aminograma se ha obtenido en un autoanalizador (Beckmann, USA), etc.

### **Resultados y Discusión**

La HTCH al 10% resuspendida en tampón fosfato pH 8,5 se ha hidrolizado en un pH-stat con cuatro proteasas: Alcalasa, Neutrasa, Papaína, L-450, obteniéndose los correspondientes hidrolizados, que debido a su composición aminoacídica y peptídica constituye un producto utilizable como biofertilizante, que favorece tanto el desarrollo radicular como de las vellosidades de las mismas. Los mejores resultados se han obtenido con la proteasa L-450.

El enriquecimiento de los hidrolizados proteicos y del extracto acuoso en ergotioneina proporciona un producto (nutracéutico) potencialmente aplicable en el tratamiento de diversas patologías y en cosmética.

### **Bibliografía**

- (1) Royse et al., (2017). In: Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications. Edited by Cunha Zied Diego and Arturo Pardo-Giménez, Wiley Online Library.
- (2) Cremades et al., (2015). *Food Bioscience* 10:42–47.
- (3) Bishop et al., (2015). *Phytochemistry* 114:56–65.

## Anexo 9:



## Innovation in Pharmacy: Advances and Perspectives.

1st Global Congress of Pharmacy Faculties. September 24-28th, Salamanca, Spain  
2018

### Preparation of Nanochitin from Crawfish (*Procambarus clarkii*) by-products.

Alberto Renato INCA-TORRES<sup>a,b\*</sup>, Anabell del Rocío URBINA-SALAZAR<sup>a,b</sup>, and Juan BAUTISTA<sup>a</sup>.

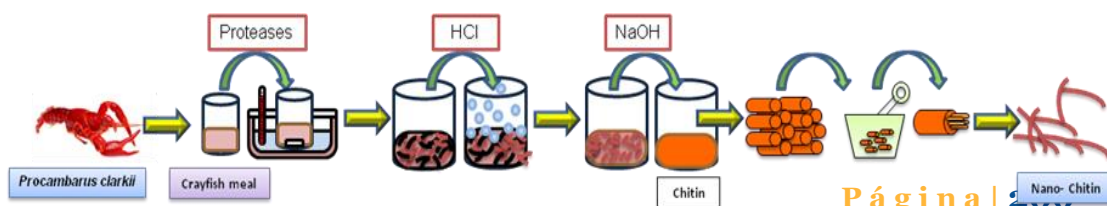
<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González nº2, 41012 Sevilla, Spain, [jdbaut@us.es](mailto:jdbaut@us.es)

<sup>b</sup> Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Panamericana Sur km 1 1/2, Riobamba, Ecuador, [jannethjara@hotmail.com](mailto:jannethjara@hotmail.com)

#### Abstract:

Nanochitin fibers (NChC) were prepared from crawfish chitin (*Procambarus clarkii*) by-products. Raw chitin has been obtained by two different processes: **Process A** consists of a first deproteinization with a protease treatments, followed by a demineralization *in situ* by lactic acid fermentation (1) and a second deproteinization by alkaline treatment; **Process B** consists of acid demineralization step, followed by an enzymatic treatment with proteases and a final alkaline treatment. The concentration of raw crab chitin obtained from Process-A and -B determined as N-acetyl-glucosamine is  $85 \pm 1.8\%$  and  $83 \pm 2.3\%$ , being a chitin of good quality, similar to that commercially available for food and medical uses. Subsequently, the preparation of chitin nanofibers were carried out disintegrating the chitin aggregates by a milling process. After a treatment cycle with a wet-type grinder, the chitin suspension formed a gel; disintegration was achieved due to a high surface-to-volume ratio. Obtaining highly uniform chitin fibers with a width of approximately 10 nm which still maintained their original chemical and crystalline structures (2,3). The obtained product can be used for industrial applications in pharmacy, cosmetic, agriculture and wastewater treatments.

#### Graphical abstract





### REFERENCES

1. Bautista et al., (2001). *Process Biochemistry*, 37: 229-234.
2. Abe K., et al., (2007). *Biomacromolecules*. 8: 3276–3278.
3. Ifuku S., (2014). *Molecules*, 19: 18367-18380.

#### **Financial support and/or acknowledgments**

Spanish Ministry of Science and Innovation (project RTC-2015-4039-2), FEDER funds of the European Union. CITIUS, Universidad de Sevilla, Servicio de Biología, Invernadero y Servicio de Microanálisis.

**Anexo 10: XIII EUCHIS & VIII SIAQ****Production of chitinases by submerged fermentation in media formulated with colloidal chitin of fungi.****Anabell Del Rocío Urbina Salazar, Alberto Renato Inca Torres, Pilar Carbonero Aguilar, Gonzalo Falcón García and Juan D. Bautista.***Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. 41012-Sevilla, Spain.***ABSTRACT**

Production of chitinases is essential for obtaining chitin-oligosaccharides with potential use as elicitors in biocontrol (1). Chitinase production by *Bacillus licheniformis* grown in different culture medium formulated with powder chitin (pCH), colloidal chitin (cCH and fungal chitin (fCH) as the main carbon source was studied. The growth of this microorganism produced higher chitinase activity in a medium formulated with fungal (*Agaricus bisporus*) chitin (fCH) than in the other culture media (2). *Bacillus licheniformis* shows the highest chitinase productivity after 8 days of growth with a productivity of 81.25 mU/L/day. Chitinase production, under these conditions, was studied by electrophoretic methods, in which two bands with molecular mass around 90 and 74 kDa are detected. These results show that the culture of *B. licheniformis* in a medium formulated with fCH, a cheap and abundant fermentation medium, could be a good procedure for the regular production of glycosidases, particularly chitinases at practical and/or industrial scale.

**References**

- (1) N.N. Nawani, B.P. Kapadnis (2005) Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs Process Biochemistry, Volume 40, Issue 2, Pages 651-660.
- (2) Shailesh R. Waghmare, Jai S. Ghosh. (2010) Chitobiose production by using a novel thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* strain JS isolated from a mushroombed. Carbohydrate Research Volume 345, Issue 18, Pages 2630-2635.

### Anexo 11: IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia

---

#### **Mushroom ergothioneine enriched aqueous extracts (M-ERG-EAE) suppress TNF- $\alpha$ and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts.**

Anabell del Rocío Urbina-Salazar<sup>1,2</sup>, Alberto Renato Inca-Torres<sup>1,2</sup>, Pilar Carbonero Aguilar<sup>1</sup>, Olga Cremades de Molina<sup>1</sup>, Juan Bautista<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/ Profesor 7 García González 2, 41012 - Sevilla, Spain, [jdbaut@us.es](mailto:jdbaut@us.es);* <sup>2</sup> *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Panamericana Sur km 9 1 1/2, EC060155 - Riobamba, Ecuador, [jannethjara@hotmail.com](mailto:jannethjara@hotmail.com).*

Ergothioneine (ERG), is a dietary antioxidant that scavenges hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical ( $\bullet\text{OH}$ ) and nitric oxide (NO) derivatives [1]. ERG exhibits potential applications as a food additive and as an antioxidant for the treatment and/or prevention of oxidative stress related diseases [2]. Natural ERG is preferred by consumers rather than the synthetic.

In this work we study the nature of the antioxidant activity and investigate the effect of M-ERG-EAE, a natural product enriched in natural ERG in the form of extract, M-ERG-EAE, obtained from the edible mushroom (*Agaricus bisporus*) [3], on UV-induced cellular response.

In cultured fibroblasts, M-ERG-EAE suppressed TNF- $\alpha$  upregulation by UV-B radiation. In addition, in fibroblasts exposed to UV-A, M-ERG-EAE suppressed the expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) protein by nearly 50% and reduced MMP-1 mRNA expression.

From these results, we concluded that M-ERG-EAE, as pure ERG, scavenges reactive oxygen species generated by both type-I and type-II photosensitization and suppressed both TNF- $\alpha$  expression and MMP-1 at their translational level. M-ERG-EAE may reduce skin antiaging effects after UV irradiation by the scavenging of  $\bullet\text{O}_2^-$  and <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, and reducing signals for protease and inflammatory activity.

#### **References:**

- (1) Servillo L., D'Onofrio N., Casale R., Cautela D., Giovane A., Castaldo D., Balestrieria M.L. (2017). Ergothioneine products derived by superoxide oxidation in endothelial cells exposed to high-glucose. *Free Radical Biology and Medicine*, 108:8–18.
- (2) Halliwell B., Cheah I.K., Drum C.L. (2016). Ergothioneine, an adaptive antioxidant for the protection of injured tissues? A hypothesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470:245–250.
- (3) Cremades O., Diaz-Herrero M.M., Carbonero-Aguilar P., Gutierrez-Gil J.F., Fontiveros E., Bautista J. (2015). White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology. *Food Bioscience*, 10:42 – 47.

## Anexo 12:



## *Innovation in Pharmacy: Advances and Perspectives.*

1st Global Congress of Pharmacy Faculties. September 24-28th, Salamanca, Spain  
2018

### **Preparation of Fungal-Nano chitin crystals: Application to Mushroom (*Agaricus bisporus*) by-products.**

Anabell del Rocío URBINA-SALAZAR<sup>a,b,\*</sup>, Alberto Renato INCA-TORRES<sup>a,b</sup>, and Juan BAUTISTA<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González nº2, 41012 Sevilla, Spain, [jdbaut@us.es](mailto:jdbaut@us.es)

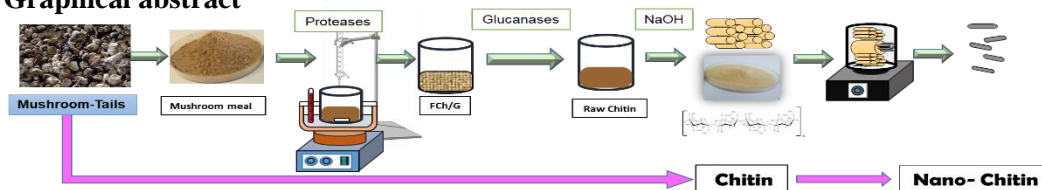
<sup>b</sup> Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Panamericana Sur km 1 1/2, Riobamba, Ecuador, [jannethjara@hotmail.com](mailto:jannethjara@hotmail.com)

#### **Abstract:**

Chitin is a crystalline polysaccharide of high molecular weight, found in crustacean shells, insect cuticles and in yeast, green algae and cell walls of fungi. It occurs as a highly-organized micro- and nano-fibril structure [1]. Transformation of micro-fibrils in nano-crystals can be achieved dissolving the amorphous regions followed by acidic breaking [2,3]. Functionalized fungal-chitin nanocrystals (FChNC) can be used in the medical-pharmaceutical and food industry do to it antifungal activity [4].

In this work we report on FChNC preparation using fungal chitin (*Agaricus bisporus*) as raw material, obtained by a sequential process based on the use of proteases, glucanases [5]. The concentration of raw fungal chitin obtained by this process, determined as N-acetyl-glucosamine, is  $83 \pm 1.8\%$ , being a chitin of good quality, similar to that commercially available for food and medical uses. Preparation of fungal nano-chitin fibres (FNChF) was obtained disintegrating chitin aggregates in a wet-type grinder, generating chitin gel-suspension. Disintegration was achieved due to a high surface-to-volume ratio. Obtained uniform chitin fibers with a width of approximately 10 nm which still maintained their original chemical and crystalline structures [6]. These fibrils form highly crystalline regions and disordered (amorphous) regions that can be turned in nanocrystals via top-down methods such as acid hydrolyses by dissolving the amorphous regions [2,3]. Functionalization of FNChC allows it uses in different composites with medico-pharmaceutical and food uses.

## Graphical abstract



## References

- [1] Salaberria A.M., et al., (2015). *Eur. Polym. J.* 68:503–515.
- [2] Salaberria A.M., et al., (2015). *React. Funct. Polym.* 89:31–39.
- [3] Paillet, M. and Dufresne, A., (2001). *Macromolecules* 34:6527–6530.
- [4] Lopez, O., et al., (2014). *LWT Food Sci. Technol.* 57:106–115.
- [5] Cremades et al., (2012).
- [6] Ifuku S., (2014). *Molecules.* 19:18367-18380

## Financial support and/or acknowledgments

Spanish Ministry of Science and Innovation (project RTC-2015-4039-2), FEDER funds of the European Union. CITIUS, Universidad de Sevilla, Servicio de Biología, Invernadero y Servicio de Microanálisis.

**Anexo 13: XIII EUCHIS & VIII SIAQ****USE OF CRAYFISH (*Procambarus clarkii*) CHITIN AS CARBON SOURCE FOR THE PRODUCTION OF CHITINASES BY SUBMERGED FERMENTATION****Pilar Carbonero Aguilar, Gonzalo Falcón García, Anabell Urbina Salazar, Alberto Inca Torres and Juan Bautista**

There is an increasing interest in chitinases for its uses in biocontrol and control of plagues, so as for the production of chitino-oligosaccharides (elicitors) (1). But an effective practical uses required a viable production of this enzymes. For that purpose it is necessary to have an abundant, easily acquired, seasonally independent and cheap fermentation media, obtained by environmentally friendly processes. Such a fermentation media can be obtained from crayfish (*Procambarus clarkii*) sub-products by treatment with enzymatic and chemical procedures which originate chitin enriched fraction. These chitin enriched fraction can be used as carbon sources and as an inductor for chitinases production by fermentation procedures, using defined media culture (Media-I, -II, -III and -IV) inoculated with a genetically modified *Bacillus licheniformis* (2).

Production of chitinase was studied in the these medias: Media-I: Coloidal Chitin (positive control); Media-II: *P. clarkii*-Chitin (65.3±2,7 %); Media-III: *P. clarkii*-Chitin (78±3,2 %) and Media-IV: *P. clarkii*-Chitin (23.1±1.03. %). Our results show that the production of chitinase activity is higher than that observed with colloidal chitin (prepared from commercial chitin, and used as positive control). Chitinase productivity after 7 days of growth was of 73.25 mU/L/day. Secretion of chitinase to culture medium was studied by electrophoretic methods, and two bands with molecular mass around 91 and 75 kDa were detected. These results show that the growth of *B. licheniformis* in a medium formulated with *P. clarkii*-Chitin, could be a good procedure for the regular production of chitinases.

**References**

- (1). S. Das, D. Roy, R. Sen., (2016). Utilization of Chitinaceous Wastes for the Production of Chitinase. *Advances in Food and Nutrition Research*. Volume 78, pp. 27–46
- (2). Saima, M. Kuddus, Roohi, I.Z. Ahmad, (2013). Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 11, 39–46

### Anexo 14: XIII EUCHIS & VIII SIAQ

#### **Production of Crawfish (*Procambarus clarkii*) enriched fractions by enzymatic procedures for fermentation uses and chitin-oligosaccharides.**

Falcón-García G., Carbonero-Aguilar P., **Inca-Torres A.R.**, Urbina-Salazar A.R., and Bautista J.

Currently, chitin, chitosan, and their derivatives are widely used in chemistry, medicine, pharmacy, cosmetics, food technology, water treatment, etc. [1,2].

A prerequisite to increase the use of chitin is the development of environmental friendly manufacturing processes, or the development of profitable processes to recover chitin and other products such as proteins, protein-hydrolyzates and pigments, if crustacean-processing waste products are used as starting material [3]. Traditional methods for the commercial preparation of chitin from crustacean shell (exoskeleton) involve alternate hydrochloric acid and alkali treatment stages to remove calcium carbonate and proteins, respectively, followed by a bleaching stage with chemical reagents to obtain a colourless product. These processes are highly contaminant [2].

Therefore, the development of environmental friendly processes is of high interest.

The in-situ production of lactic acid at low cost from agroindustrial by-products, and protease treatment could contribute to the development of this type of processes for the recovery of chitin.

In this work, we report on the in-situ production of lactic acid using crayfish meal supplemented with brewer's grains soluble as fermentation media, for the demineralization of crayfish exoskeleton followed by protease treatment as deproteinization step.

(1) Fatma Gassara, Candice Antzak, Chandran Matheyambath Ajila, Saurabh Jyoti Sarma, Satinder Kaur Brar, M. Verma. Chitin and chitosan as natural flocculants for beer clarification Journal of Food Engineering 166 (2015), 80–85

(2) Imen Hamed , Fatih Ozogul, Joe M. Regenstein. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. Trends in Food Science & Technology 48, (2016), 40–50

(3) J. Bautista\*, M. Jover, J.F. Gutierrez, R. Corpas, O. Cremades, E. Fontiveros , F. Iglesias, J. Vega. Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production, Process Biochemistry 37 (2001) 229–234

**Anexo 15:**

*5th International Conference Enzymes in the Environment. Ecology, Activity and Application. Bangor, Gales, Reino Unido. 2016*

**OBTAINING A SOIL BIOSTIMULANT FROM SEWAGE SLUDGE: EFFECT ON SOIL BIOCHEMISTRY**

Bruno RODRIGUEZ-MORGADO\* (bromo@us.es); Pablo CABALLERO JIMENEZ; **Alberto Renato INCA TORRES**; Anabell URBINA SALAZAR; Juan PARRADO RUBIO\*, *Dept. Biochemistry and Molecular Biology, University of Seville, Spain*; Manuel TEJADA MORAL, *Dept. Crystallography, Mineralogy and Agricultural Chemistry, University of Seville, Spain*

Sewage sludge is a byproduct of wastewater treatment plants. These sludges present a serious problem because current management consists mainly in composting, a process that requires large amounts of space and time, resulting in a final product with low added-value. In order to promote a more dynamic use of sewage sludge while increasing their added-value, we implemented a fermentative technology using *Bacillus licheniformis*, a microorganism widely used in industry, that excreted different hydrolytic enzymes, which together with the *Bacillus* itself have a great potential in soil applications. We studied both the production of various enzymes associated with geochemical cycles, such as proteases, cellulases, lipases, etc., and the total production of extracellular proteins by proteomic analysis thereof. Finally, we have applied these fermented products as edafic biostimulants, evaluating its effect on the biochemical properties of soil, mainly in enzymatic activities related to microbiota, such as dehydrogenase, phosphatase and glucosidase.

**References**

- Parrado, J., Rodriguez-Morgado, B., Tejada, M., Hernandez, T., & Garcia, C. (2014). Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme and microbial technology*, 57, 1-7.
- Tejada, M., García-Martínez, A. M., Rodríguez-Morgado, B., Carballo, M., García-Antras, D., Aragón, C., & Parrado, J. (2013). Obtaining biostimulant products for land application from the sewage sludge of small populations. *Ecological engineering*, 50, 31-36.



## Anexo 16:

Journal of Biotech Research [ISSN: 1944-3285]

2018; 9: 14-26

**Hydrolytic enzymes production by *Bacillus licheniformis* growth on fermentation media formulated with sewage sludge**

Alberto Renato Inca-Torres<sup>1, 2</sup>, Anabell Del Rocío Urbina-Salazar<sup>1, 2</sup>, Gonzalo Falcón-García<sup>1</sup>, Pilar Carbonero-Aguilar<sup>1</sup>, Bruno Rodríguez Morgado<sup>1</sup>, Juan Parrado<sup>1</sup>, Juan Bautista<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Seville, C/ Professor García González nº2, 41012-Seville, Spain. <sup>2</sup>Polytechnical High School of Chimborazo, Faculty of Science, Panamericana Sur km 1 1/2, EC060155- Riobamba, Ecuador.

Received: January 23, 2018; accepted: March 27, 2018.

In this work, the production of hydrolytic enzymes by *Bacillus licheniformis* grown in media formulated with sewage sludge as the main carbon and nitrogen source with induction by keratins has been studied. The three main types of enzymes of industrial interest produced were proteases, lipases and cellulases. The addition of an inductor, keratin in our case, improves the production of these enzymes to reach a productivity of 16.89 mU/mL-day, 0.25 mU/mL-day, and 0.51 mU/mL-day for proteases, lipases and cellulases, respectively. The secretion of proteins and enzymes into the fermentation media was studied by electrophoretic and proteomic methods, which revealed the presence of proteases, lipases, and cellulases in the fermentation media, among other excreted proteins. Our results show that the growth of *B. licheniformis* in fermentation media formulated with sewage sludge as the main carbon and nitrogen sources, supplemented with keratin from feather meal as an inductor could be used for the industrial production of these enzymes, particularly of proteases.

**Keywords:** Hydrolytic enzymes; *Bacillus licheniformis*; sewage sludge; proteases; lipases; cellulases.

**Abbreviations:** GRAS: generally regarded as safe; CDDGs: corn dried distillers grains with solubles; TCA: trichloroacetic acid; DNS: dinitrosalicylic acid; EA: enzymatic activity; p-NPG: p-nitrophenyl-β-glucopyranoside; MUB: Modified Universal Buffer; CBB: Coomassie Brilliant Blue.

\*Corresponding author: Juan Bautista, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Seville, C/ Professor García González nº2, 41012-Seville, Spain. Phone: +34 954556834. E-mail: [jbauti@us.es](mailto:jbauti@us.es).

### Introduction

Industrial application of enzymes began in the mid-sixteen centuries, although its stable implementation was not achieved until the mid-twenty centuries, between 1950-1960 [1]. The main industrial applications of enzymes are in the production of food, textiles and detergents, representing approximately 90% of the market volume. Other applications, such as organic synthesis, medical and pharmaceutical applications, agronomic uses, etc., are much less used [2]. However, recently, the application of

enzymes in agricultural and environmental applications has experienced a significant increase, mainly due to the development of new production methods using cheap culture media derived from agricultural products and urban residues [3].

Most industrial enzymes are bacterial enzymes, although fungal enzymes have lately become increasingly important, both quantitatively and qualitatively. Bacterial enzymes produced by the genus *Bacillus* are of special interest for both research and industrial applications due to the

high rate of growth of these bacteria and their ability to secrete a high volume of enzymes into culture medium (20-25 g/L) [4]. In addition, these microorganisms are "generally regarded as safe" (GRAS). The *Bacillus* strains considered of industrial interest are the species *B. licheniformis* and *B. subtilis*.

One of the major bottlenecks for the industrial application of enzymes is the high production cost, while the cultivation medium may represent 30-40% of total production costs [5]. This has produced great interest in the development of efficient and cheap cultivation media. Among the media developed to address this issue, those derived from agroindustrial byproducts (whey, brewers grains, rice bran, defatted sunflower flour, and corn dried distillers grains with solubles (CDDGs)) and urban wastes (water and sewage sludge) are two types of promising substrates [6]. In addition to the economic benefit associated with the use of agroindustrial byproducts and urban waste, another important advantage is the resulting contribution to environment maintenance [7, 8]. In industrialized countries, the high rates of production of household and industrial liquid waste results in a high polluting effect [9, 10]. The treatment of these wastes in depuration plants generates two main products: purified water and sewage sludge. While the purification of water has received great attention, much less attention has been devoted to the management of sewage sludge, which is a dangerous source of environmental pollution if not treated properly. However, it has recently been shown that sewage sludge, when adequately processed, may serve as a useful substrate in the treatment and regeneration of soil and/or as an inexpensive cultivation media for the production of microorganisms and enzymes [11]. Sewage sludge is one of the most abundant and inexpensive substrates available for the culture of microorganisms and has practically zero cost.

Sewage sludge may be processed to modify and/or adjust its physical, chemical, and biological properties to yield acceptable material

for use as fertilizer and/or culture medium for the production of substances of high added value [12, 13]. Currently, sewage sludge is transformed mainly into bio-fertilizer, while only a small portion is used for the production of high value-added products such as enzymes. The goal of this work was to study the use of sludge from water treatment plants as a cultivation medium for the production of hydrolytic enzymes (proteases, cellulases, lipases, acid phosphatase, and  $\beta$ -glucosidase) using *Bacillus licheniformis*.

## Materials and methods

### Microorganisms

*Bacillus licheniformis* strain 21415 provided by the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) was used for the production of enzymes in this study. The bacteria were stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and refreshed in LB medium (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, and 10 g/L NaCl, adjusted to pH 7) 24 h before inoculation. Briefly, after thawing at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight, 2 mL of bacteria was inoculated into a flask containing 30 mL of LB medium at pH 7 and  $37^{\circ}\text{C}$ , and then grown until the transmittance at 620 nm reached 20%.

### Substrates: Sludge samples, medium composition, and fermentation

Sludge samples were provided by the experimental treatment plant of Carrión de los Céspedes (Sevilla, Spain) of the CENTA Foundation. Thickened sludge with a humidity of  $90\pm 1.5\%$  was used both alone and in the preparation of cultivation medium (table 1). Culture medium was sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  for 30 min prior to inoculation to eliminate pre-existing sludge bacteria. Six hundred mL sterile media was inoculated with 30 mL inoculums and grown over 14 days at  $37^{\circ}\text{C}$  with constant agitation (150 rpm). During growth, 10 mL samples were taken each day and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use for measurement of biomass and enzymatic activities, including protease, cellulase, lipase, acid phosphatase, and  $\beta$ -glucosidase.

**Table 1.** Compositions of culture media formulations.

Media	Sludge (g)	Inductor (g)	
		Feathers	Inoculum (mL) <i>B. licheniformis</i>
M1	600	0	0
M2	600	0	30
M3	588	12	30

**Sample preparation**

Samples were thawed at 4°C and either used directly for biomass determination or centrifuged at 12,000 × g for 20 min to obtain the supernatant used for enzyme activity assays.

**(1) Determination of biomass.**

Biomass was determined indirectly by measuring the protein content of samples at different growth times using the Bradford method [14]. Biomass concentration was determined in µg/mL by interpolation from a standard curve plotting biomass (µg/mL) against protein concentration (µg/mL) (Figure 1).

**(2) Enzymatic assays**

The supernatant obtained after centrifugation was used for determination of enzyme activities.

**Protease activity assay**

The total extracellular protease activity was determined following the method described by Beynon and Bond [15]. Briefly, 250 µL of the sample was mixed with 250 µL of a reaction mixture containing 0.1 g azocasein and 0.2 mL of ethanol dissolved in 4.8 mL of 0.1 M phosphate buffer at pH 7. Samples were then incubated for 10 min at 40°C. The reaction was then terminated by adding 2.5 mL of 5% (w/v) TCA solution. The reaction mixture was centrifuged at 10,000 × g for 2 min. The absorbance of the supernatant at 440 nm was measured. One unit of proteolytic activity was defined as the amount of enzyme required to produce an increase in optical density of 0.001.

**Cellulase activity assay**

The total cellulase activity was determined by the method described by Galindo [16], modified for application to cellulolytic enzymes. Briefly,

250 µL of a 2% soluble microcrystalline cellulose (Avicel PH-101, Sigma- Aldrich, Barcelona, Spain) solution in 0.1 M acetate buffer (pH 5) was incubated with 250 µL of the sample for 2 hours at 37°C. The reaction was stopped by adding 1 mL of DNS reagent, and the mixture was heated to 95°C for 10 min. The reaction mixture was then cooled to room temperature and the absorbance at 575 nm was measured. A standard curve was obtained using glucose for used in the calculation of cellulase activity. One unit of cellulase activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 mg/mL of reduced sugars into the test solution.

**Lipase activity assay**

The total extracellular lipase activity was determined using a modified version of the method described by Kilcawley et al. [17]. Briefly, 1.75 mL of buffer (0.1 M sodium phosphate pH 7, 0.15 M NaCl, and 0.5% (v/v) Triton-X) was mixed with 0.25 mL of sample that had been previously centrifuged for 30 min at 12,000 × g, along with 20 µL of 50 mM p-nitrophenol laurate in acetonitrile. This mixture was then incubated for 30 min at 37°C. Afterward, the mixture was cooled in an ice bath for 5 min, then centrifuged for 1 min at 9,000 × g. The supernatant absorbance at 400 nm was measured. Activity was quantified using the molar extinction coefficient of p-nitrophenol (14,800 /M-cm) at 400 nm. The activity units were defined as one unit corresponding to the release of 1 nmol of p-nitrophenol/min-mg protein under the test conditions.

**β-glucosidase activity assay**

The β-glucosidase activity was determined using the colorimetric method described by Eivazi and Tabatabai [18] with slight modifications. Into 250 µL of the sample, 2 mL of modified universal buffer (MUB, pH 6) and 0.5 mL of p-nitrophenyl-β-glucopyranoside 25 mM (7.53 mg/mL) were added. The mixture was then incubated at 37°C for 30 to 60 min. The reaction was stopped by placing the mixture in an ice bath. Subsequently, 2 mL of 0.5 M NaOH was added and the solution absorbance at 400 nm was measured. The

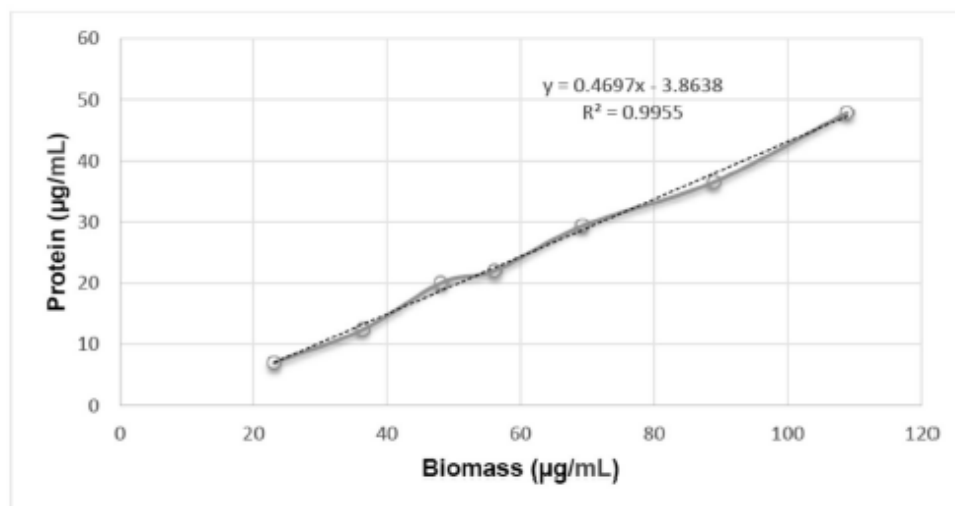


Figure 1. Standard curve of biomass versus protein concentration for *Bacillus licheniformis* grown in a defined medium.

enzymatic activity (EA) was expressed in  $\mu\text{mol/g}$  of sample-min and was calculated by the following formula:

$$EA = C \times V / T \times G$$

where C is the concentration of liberated p-nitrophenyl (mM); V is the sample volume (mL); T is the incubation time (min); and G is the sample weight (g). One  $\beta$ -glucosidase unit of activity was defined as the amount of  $\beta$ -glucosidase needed to release 1 nmol p-nitrophenol from p-nitrophenyl- $\beta$ -glucopyranoside in 1 min under the specified conditions.

#### Acid phosphatase activity assay (APHA)

Acid phosphatase activity was determined by the method established by Tabatabai and Bremner [19] with slight modifications. The procedure was initiated by creating a mixture containing 250  $\mu\text{L}$  of sample, 2 mL of MUB, pH 6, and 0.5 mL of p-nitrophenyl-phosphate 25 mM (9.28 mg/mL). This mixture was incubated at 37°C for 30-60 min. Afterward, the samples were cooled in an ice bath to stop the reaction. Then, 2 mL of 0.5M NaOH was added to the sample and the

solution absorbance at 400 nm was measured. The EA was expressed in  $\mu\text{mol/g}$  of sample-min and was calculated by the following formula:

$$EA = C \times V / T \times G$$

where, C is the concentration of liberated p-nitrophenyl (mM); V is the sample volume (mL); T is the incubation time (min); and G is the sample weight (g). One phosphatase unit of activity was defined as to the amount of acid phosphatase needed to release 1 nmol p-nitrophenol from p-nitrophenyl-phosphate in 1 min under the specified conditions. Spectrophotometric detection of the artificial molecule p-nitrophenol manifesting yellow as a product of acid phosphatase activity was used to quantify the enzyme activity in these samples.

#### Protein assay

Protein concentration was quantified by the method described by Bradford, using bovine serum albumin as the protein standard [14].

#### SDS-PAGE protein profiling

The extracellular protein profile was investigated by SDS-PAGE analysis. After acid-acetone

precipitation of the supernatant obtained after fermentation broth centrifugation at 12,000 × g, the pellet was solubilized in sample preparation buffer (1 mM Tris-HCl, pH 6.8) containing 5% (w/v) SDS and 7% (v/v) β-mercaptoethanol. The samples were kept at room temperature for 2 h and then centrifuged at 12,000 × g for 15 min. The supernatant was collected and run on 12% SDS-PAGE gel in triplicate, with each run containing 20 μL of supernatant (approximately 50 μg of protein) and 5 μL of loading buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% (v/v) glycerol, 10% (w/v) SDS, and 5% (v/v) bromophenol blue). The samples were boiled for 5 min, centrifuged at 10,000 × g for 10 min, and cooled before being loaded on the gel. Electrophoresis was carried out at constant intensity (25 mA) using a Tris-glycine buffer system containing 0.1% SDS until the bromophenol front ran off of the gel. After completion of electrophoresis, the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and/or silver staining solution (GE Healthcare, Barcelona, Spain) and digitized on a Gel Doc™ XR + Imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### Zymogram analysis

Proteolytic activity was detected via electrophoresis on 12% polyacrylamide gels prepared with 1% SDS and 0.1% (w/v) gelatin. After completion of electrophoresis, the gels were incubated in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 2% (v/v) Triton X-100 at 35°C for 1 h, and then again in the same buffer without detergent at 35°C for 3 h. After CBB staining and subsequent destaining, proteolytic activity was determined from the presence of non-stained zones and bands on the stained background composed of nondigested gelatin [20].

#### Proteomics

A proteomics study was carried out according to the procedure described in Parrado et al. [21]. Briefly, to remove contaminants such as cells and debris in suspension, the samples were centrifuged at 12,000 × g for 20 min and the supernatants were recovered. Then, 10 μL of the supernatant was treated with 40 μL of methanol

and vortex mixed for approximately 1 min. 10 μL of chloroform was added and the mixture was shaken again for 1 min before 30 μL of Milli-Q water was added and mixed well. The mixture was centrifuged at 14,000 × g for 5 min and the supernatant was removed. 30 μL of methanol was added to the pellet and the mixture was vortexed again for 1 min. Samples were centrifuged at 16,000 × g for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellets were dried by lyophilization. The pellet proteins were resuspended in Milli-Q water. A total of 30 μg of resuspended protein was added into 30 μL of 6 M urea, 200 mM ammonium bicarbonate, 10 mM DTT and allowed to remain at room temperature for 30 min for protein reduction. 10 μL of 100 mM iodoacetamide was added to promote protein alkylation, and the samples were kept at room temperature in the dark for 30 min. Samples were then dialyzed against Milli-Q water until the urea concentration was below 0.1 M and subsequently treated with trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in a protein-to-enzyme ratio of 50:1. Digestion was carried out at 37°C overnight. The mixture was then acidified with TFA and concentrated using a Speed C18/18 column (Applied Separations, Allentown, PA, USA). Peptides were eluted in 400 μL of 70% acetonitrile containing 0.1% TFA. After the samples were completely dried, they were resuspended in 15 μL of 5% acetonitrile containing 0.1% formic acid for use in tandem liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis. LC-MS analysis was performed in a Surveyor HPLC system in tandem with a Finnigan LTQ mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). A total of 5 μL of sample was injected into a C18 PepMap100-Precolumn Cartridge (Dionex, Netherlands) for pre-concentration and washing, then resolved in a Biobasic C18 75 μm × 10 cm column (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Peptides were eluted at a nominal post-split flow rate of 250 L/min using a 120-min gradient of 5% acetonitrile with 0.1% formic acid to 40% acetonitrile with 0.1% formic acid. The LTQ mass spectrometer was run in positive-ion mode using the nanospray source. The spray voltage was set

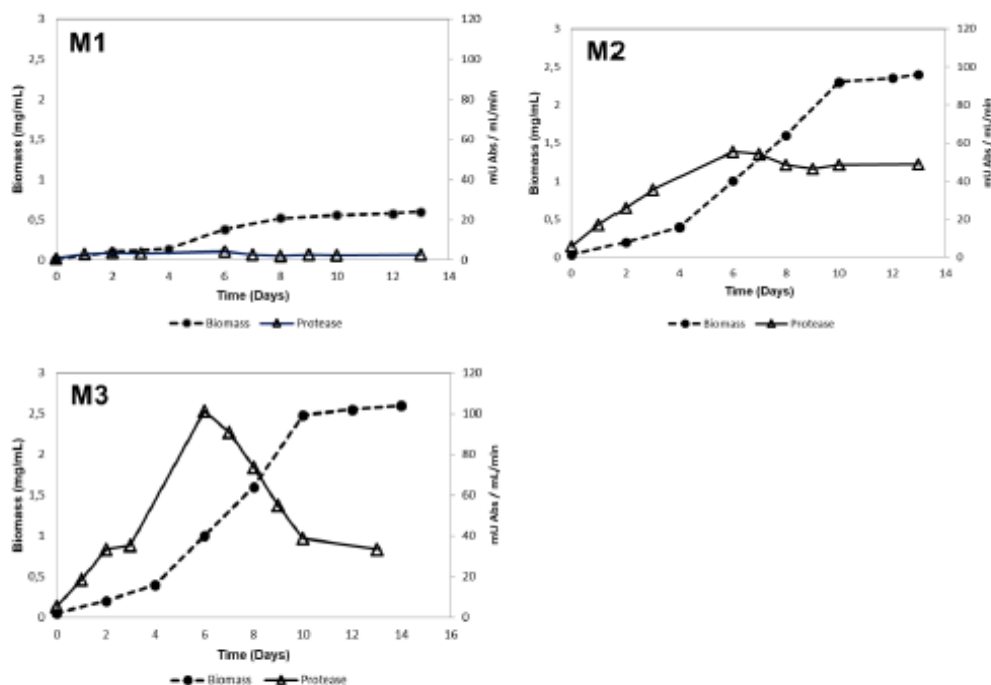


Figure 2. Biomass and protease production by *B. licheniformis* grown in media formulations M1, M2, and M3.

at 2 kV, and the capillary temperature was set to 170°C. The samples were scanned in the range of 400–1500 m/z using the full scan mode, and data-dependent MS/MS analysis with collision-induced dissociation (CID) was performed on the top five ions with dynamic exclusion. The data was converted to SEQUEST format (DTA) and compared against the NCBI database (version 11/10/2007) using an in-house MASCOT (Matrixscience, London, UK) search engine with taxonomy restrictions set to Firmicutes and with carboxymethylated cysteine as a fixed modification.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 13.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All experiments were completed in triplicate, and the mean of the three data sets is presented for each experiment. A level of significance of  $\alpha < 0.05$  was used to calculate significant

differences. One-way ANOVA analysis revealed that the results of the triplicate analyses for each experiment did not differ significantly.

#### Results and discussion

In an attempt to find an abundant and cheap cultivation medium for the production of hydrolytic enzymes using *Bacillus licheniformis*, we present in this work the results obtained from the use of sewage sludge as the main fermentation source in the culture of *B. licheniformis*. As observed in figures 2 to 4, measurement of the protein production indicated that the microorganism grew well, although the biomass production was not high (2.76  $\mu\text{g/mL}$ ). Biomass estimation was carried out by protein determination using the Bradford method. As figure 1 shows, a linear relationship ( $R^2 = 0.995$ ) between protein concentration and

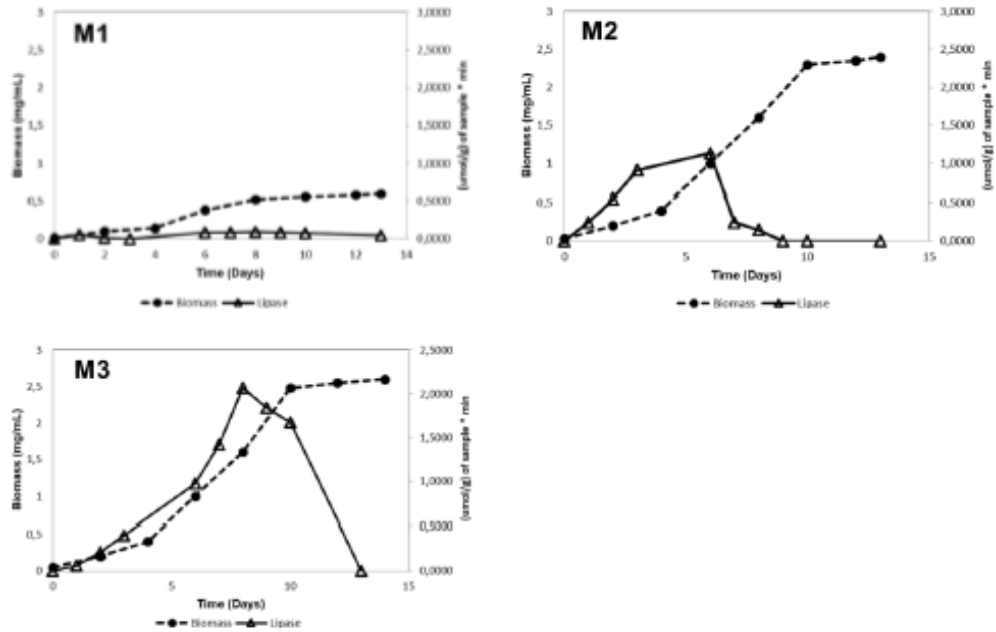


Figure 3. Biomass and lipase production by *B. licheniformis* grown in media formulations M1, M2, and M3.

dry biomass was observed, from which biomass concentration can be estimated by interpolation. Figures 2 to 4 also show hydrolase production by *B. licheniformis* grown in media M1, M2, and M3, specifically, proteases, lipases, and cellulases. Among these hydrolases, proteases are of the highest industrial interest. Proteases (EC 3.4.21-24 and 99) are industrially useful hydrolytic enzymes that cleave peptide bonds between amino acid residues and are the dominant enzyme in the worldwide market. Two-thirds of the proteases produced annually are used in the detergent industry. Microbial proteases, especially from *Bacillus* species, have traditionally comprised the predominant portion of industrial enzymes on the market. The major application of microbial proteases is in the formulation of various detergents, which constitutes a significant share of worldwide enzyme sales [22]. Many bacteria in the genus *Bacillus* excrete large amounts of enzymes into culture medium. Alkaline serine protease, one of

the most important enzymes industrially, is excreted into culture medium by strains of *B. licheniformis* or *B. pumilus* [23]. These alkaline proteases (i.e., subtilisin) operate in a high alkaline pH range of 8.5-10 and are thus optimal for use in the formulation of detergents. In addition to their use in the detergents industry [24], these alkaline proteases have several other industrial applications, including in the production of foods, pharmaceuticals, leathers, and diagnostic reagents [25]. Proteases are also used for the bioconversion of chitinous materials as a waste-treatment alternative for the disposal of shellfish wastes [26, 27]. As shown in figure 2, *B. licheniformis* produces extracellular proteases during exponential growth and at the start of the stationary growth phase [28], after which point the production decreased. The analysis of the results obtained in medium M2 (without the addition of feather meal) and M3 (with added feather meal) show that the production of proteases by *B. licheniformis* is induced by the

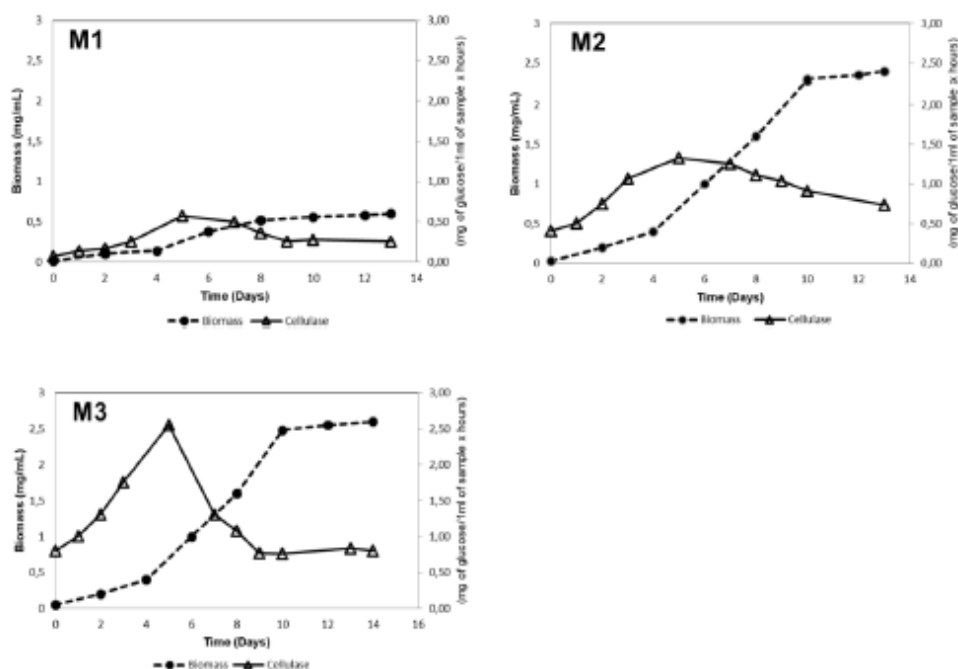


Figure 4. Biomass and cellulase production by *S. licheniformis* grown in media formulations M1, M2, and M3.

presence of feather meal. In both cases, it was also observed that the protease production activity became decreased if the stationary growth phase was prolonged. Therefore, we harvested the fermentation after 6 days of growth. The productivity at the point of harvesting was 16.89 mU/mL·day in medium M3 and 9.22 mU/mL·day in medium M2. Our results are in accordance with those previously reported by other authors [21, 28, 29, 30]. Extracellular protease production in microorganisms is highly influenced by media components, including variations in the carbon/nitrogen ratio, presence of some easily metabolizable sugars such as glucose [28, 29], and presence of metal ions [30]. In addition to these factors, several other properties such as aeration, inoculum density, pH, temperature, and incubation time were also found to affect the amount of extracellular protease produced [31, 32]. Glucose and peptone were found to be important factors in

enhancing the formation of alkaline protease, specifically (figure 2). Protease production is only of industrial interest if the microorganisms that produce substantial amounts of extracellular enzymes can be grown well in an easily prepared and low-cost medium. The use of sewage sludge amended with the soluble sugar fraction of agroindustrial by-products (beer bagasse, sugar bagasse, rice bran, etc.) as fermentation media, such as media sample M2 and M3 in this study, to achieve these requirements could substantially improve the industrial production of proteases (Bautista et al., unpublished results). The recovery of proteases from fermentation broth was carried out by continuous centrifugation of the fermentation broth on a non-foaming disc centrifuge and subsequent recovery of the filtrate and discarding of the cake. The clear filtrate was then concentrated by ultrafiltration using a 50 kDa ultrafiltration membrane, and the resulting



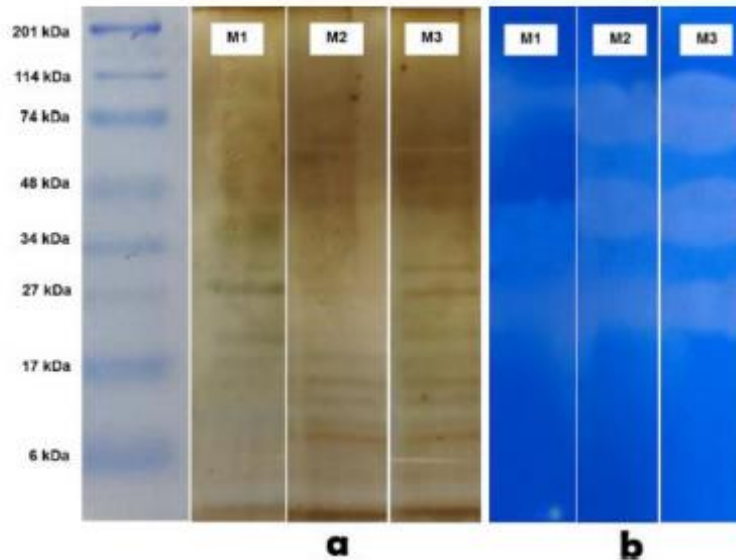


Figure 5. Electrophoretic separation by SDS-PAGE analysis of protein secreted by *B. licheniformis* grown in media formulations M1, M2, and M3. (a: silver staining; b: activity staining (zymogram)). (Molecular weight standards: Myosin 201 kDa,  $\beta$ -Galactosidase 114 kDa, BSA 74 kDa, Ovalbumin 48 kDa, Carbonic anhydrase 34 kDa, Soybean trypsin inhibitor 27 kDa, Lysozyme 17 kDa, Aprotinin 6 kDa).

ultraconcentrate was precipitated with the addition of 80% ethanol. The precipitate was then lyophilized or dried with air at 30-40°C. Lipases are a group of enzymes of which the main function is the hydrolysis of triacylglycerol in a lipid-water interphase. This group of enzymes is of special interest in many industrial sectors, such as the detergent industry, food-industry and chemical and pharmaceutical industry [33]. *B. licheniformis* has been described as a major producer of lipases; therefore, we also studied the production of lipases by this microorganism in the media formulated with sewage sludge used in this work. Figure 3 shows the production of lipases in the three tested media formulations. These results show that the addition of feather meal also induced the production of lipases. This induction could be attributed to the relatively high fat content of the feather meal (8.4%). However, in this case an important difference was observed in lipase production by *B. licheniformis* in the two media

formulations. In medium M2, the production of lipase was observed from the beginning of bacteria growth, while in medium M3, the production increased drastically after 4 days of growth. In both formulations, the lipase production level was maintained between days 5-9, after which point the lipase concentration in the medium decreased sharply, probably due to the actions of proteases. Therefore, the lipase productivity at day 8 was used to evaluate lipase production and was estimated as 0.25 mU/mL-day (figure 3). The production of enzymes that degrade cellulosic material, such as cellulases, is of great importance in the development of new biorefinery approaches to produce biofuels and high value-added products through fermentation. Therefore, the development of abundant and cheap sources of cellulose-degrading enzymes is necessary. For this reason, we also tested the production of cellulases by *B. licheniformis* in media formulated with sewage sludge. Figure 4 shows the production of

cellulases by *B. licheniformis* grown in media formulations M1, M2, and M3. The production of cellulase in medium M2 started at the beginning of bacteria growth, likely due to the presence of cellulosic materials in the sewage sludge. Cellulase production reached a maximum after 5 days of bacteria growth, with a productivity of 0.51 mU/mL·day. Surprisingly, the addition of feather meal also induced the production of cellulolytic enzymes, although this induction was less pronounced than that seen for proteases and lipases. The cause of this induction remains obscure. In addition to protease, lipase and cellulase activities, other enzyme activities, such as those of  $\beta$ -glucosidase and acid phosphatase, were also tested in the supernatant from the growth of *B. licheniformis* in media formulations M1, M2, and M3. No enzymatic activities beyond those of proteases, lipases, and cellulases were detected (figure 4).

Proteases, lipases and cellulase are inherently produced by *B. licheniformis*, but in the presence of feather meal, the production of these enzymes was clearly enhanced, particularly in the case of proteases and lipases [21]. Induction of the production of these enzymes with hydrolytic activities suggests that these enzymes are involved in the utilization of insoluble C- and N-sources for *B. licheniformis* survival when soluble C- and N-sources are low. Other enzymes are likely also involved in this adaptation process; therefore, we analyzed the set of proteins excreted (secretome) by *B. licheniformis* using electrophoretic and proteomic techniques.

The proteins produced by *B. licheniformis* grown in the media formulations M1, M2, and M3 were separated by SDS-PAGE analysis and are shown in figure 5. As these results show, the excretion of proteins/enzymes into the growth medium was greater in mediums M3 and M2 than in M1 as a result of the enhanced growth of *B. licheniformis*. Zymographic analysis showed that in both M2 and M3, three main protease zones can be detected—one approximately 75 kDa and other two approximately 34 and 27 kDa. In order

to study the set of proteins secreted by *B. licheniformis* grown in media formulated with sewage sludge (M2 and M3), we used a proteomic approach based on the shotgun procedure. In the presence of a culture medium that includes feather meal as an inductor, *B. licheniformis* is capable of excreting various kinds of enzymes in order to degrade the components of the medium and, thus obtain nutrients required for survival [34-37] (figure 5). Most *Bacillus sp.* initiate a series of transitional responses that are designed to maintain or restore growth under different environmental conditions, including the induction of macromolecular hydrolases, such as proteases, lipases, and polysaccharidases. Enzymatic induction through addition of materials to the substrate has been described for *Bacillus*. For example, xylene addition induces the excretion of xylanases and other glycoside hydrolases [38], and substrates formulated with olive oil, an important inductor and source of lipids, induces the synthesis and excretion of lipases [34]. The results obtained in this study show that feather meal can be used as a N-source for the growth of *B. licheniformis* and can also act as a strong inducer of the secretion of hydrolytic enzymes, specifically, proteases, lipases, and to a lesser extent, cellulases, and other proteins and enzymes. The proteins and enzymes secreted by *B. licheniformis* grown in medium M3 was characterized by a proteomic approach using the shotgun procedure, and the results are shown in table 2. The analysis of exocellular proteins excreted by *B. licheniformis* in medium M3 showed a relatively low diversity of proteins compared to that found in other fermentation media, such as dextrose broth [21] (table 2). The main proteins and/or enzymes secreted were hydrolases (> 80%), and of these, the protease keratinase (KerA) is of special relevance. This enzyme is typically produced when *B. licheniformis* is grown in a media with primarily insoluble N-sources, such as keratins. In addition to promoting the hydrolysis of keratins, keratinase is capable of hydrolyzing a broad range of protein substrates and, therefore, has many potential agricultural and industrial

Table 2. Identified extracellular proteins/enzymes secreted by *Bacillus licheniformis* grown in medium M3.

Protein name	Mass (Da)	Score	Queries	
			Matched	emPAI*
KerA, Subtilisin precursor	31,266	640	18	1.02
Chain A, Chitosanase	435	468	16	0.44
Glycoside hydrolase family 14 protein	79,565	419	9	0.22
Glycoside hydrolase family 18 protein	66,111	273	5	0.10
Gamma-glutamyltranspeptidase (Ggt)	54,048	221	3	0.10
Flagellin	3,201	218	5	0.21
Extracellular serine protease	85,573	184	5	0.08
Hypothetical protein BL00275	14,050	173	9	0.24
Putative acylaminoacyl-peptidase YuxL	73,549	109	2	0.04
Chitosanase	50,616	348	11	0.37
Intracellular serine protease	33,888	232	7	0.45
Superoxide dismutase	22,530	187	11	0.51
Metalloreulation DNA-binding stress protein	17,909	157	4	0.19
Metal-dependent hydrolase	24,831	122	2	0.10
Chitosanase	19,722	116	3	0.17

applications. Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT, E.C. 2.3.2.2) was another minor protein found in the fermentation solutions examined. This protein catalyzes the transfer of the  $\gamma$ -glutamyl moiety from  $\gamma$ -glutamyl compounds to a variety of amino acids and dipeptide acceptors [39, 40]. The hydrolytic and glutaminase activities involved in this process are used in the food industry for debittering amino acids. GGT has also been suggested to assist subtilisin during its action on keratin [41]. *B. licheniformis* was found to secrete extracellular GGT and keratinase during keratin degradation processes. Keratinase in the presence of GGT exhibits an extended substrate spectrum, cleaving all types of keratins. The complex thus exhibits better catalytic properties when GGT is present, a characteristic which can be exploited in various biotechnological applications [42].

### Conclusion

These results demonstrate the successful culture of *B. licheniformis* in a medium formulated with sewage sludge as the main source of carbon and nitrogen with added feather meal (keratin) as an inductor. This formulation is a cheap and abundant fermentation medium that can be used for the regular production of hydrolases, particularly proteases and lipases, on a large scale in relatively short culture periods of 5 and 8 days. The subsequent recovery of these enzymes through continuous centrifugation and concentration by ultrafiltration, followed by fractionation with ethanol (actually underway), could be a promising process for the preparation of products with high proteolytic and/or lipolytic activity for inclusion in enzymatic formulations for food production and agro-industrial uses.

### Acknowledgments

We are grateful to the Spanish Ministry of Science and Innovation for the financial support of this work (project RTC-2015-4039-2), which

has partial financial support from the FEDER funds of the European Union.

### Reference

1. Polains J, MacCabe A. 2007. Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications. *Industrial Enzymes*. 461-476.
2. Hasan F, Shah AA, Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 39:235-251.
3. Aehle, Wolfgang. 2007. *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Ed. 3rd. Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
4. Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50:1-17.
5. Gessesse A. 1997. The use of Nug meal as a low cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme. *Bioresour. Technol.* 63:59-61.
6. Mukhtar H, Haq I. 2013. Comparative Evaluation of Agroindustrial By-products for the Production of Alkaline Protease by Wild and Mutant Strains of *Bacillus subtilis* in Submerged and Solid State Fermentation. *Scientific World Journal*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/538067>.
7. Romero EJ, Bautista JD, García-Martínez A.M, Cremades O, Parrado J. 2007. Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones. *Process Biochem* 42:1492-1497.
8. Zhang XZ, Sathitsuksanoh N, Zhu Z, Zhang YHP. 2011. One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*. *Metab. Eng.* 13:364-372.
9. Castells X. 2012. *Reciclaje de residuos industriales*. Ed. 2da. Spain. 1-28.
10. Fjällborg B, Dave G. 2003. Toxicity of copper in sewage sludge. *Environ Int.* 28:761-769.
11. Colomer Mendoza FJ, Gallardo Izquierdo A, Robles Martínez F, Bovea Ma D, Prats L. 2011. Waste water treatment plants: Possibilities of recovery for different digested sewage sludges. *Eng.* 14-3:177-190.
12. Buwei. 1990. Swiss Federal Department of the Interior, Environmental Protection Agency, personal communication.
13. García C, Gil F, Hernández T, Trasar C. 2003. *Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en suelos. Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana*. Editorial Mundi-Prems. España.
14. Bradford MM. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 73:248-250.
15. Beynon RJ, Bond JS. 1989. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford: IRL Press at Oxford University Press. 55
16. Galindo J. 2001. Fermentación microbiana ruminal y pasaje hacia las partes bajas del tracto gastrointestinal de árboles, arbustos y leguminosas. Memorias del curso "Sistemas

- silvopastoriles, una opción sustentable". *Tantakín*, Mérida. 132.
17. Kilcawley KN, Wilkinson MG, Fox PF. 2002. Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme Microb. Technol.* 31:310-320.
  18. F Eivazi, Tabatabai M. 1990. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biol. Biochem.* 22:891-897.
  19. Tabatabai MA, Bremner JM. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1:301-307.
  20. Jellouli K, Ghorbel-Bellaj O, Ayed HB, Manni L, Agrebi R, Nasri M. 2011. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochem* 46:1248-1256.
  21. Parrado J, Rodríguez-Morgado B, Tejada M, Hernández T, García C. 2014. Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme Microb. Technol.* 57:1-7
  22. Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:381-395.
  23. Ward OP, *Proteinases*, in: *Microbial Enzymes and Biotechnology* (W. M. Fogarty, ed.), Applied Science, London, pp. 231-317.
  24. Maurer KH. 2004. Detergent proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15:330-334.
  25. Gupta R, Beg QK, P Lorenz. 2002a. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:13-32.
  26. Yang JK, Shih IL, Tzeng Y M, Wang SL. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 26:406-413.
  27. Manni L, Jellouli K, Ghorbel-Bellaj O, Agrebi R, Haddar A, Sellami Kamoun A, Nasri M. 2010. An oxidant- and solvent-stable protease produced by *Bacillus cereus* SV1: application in the deproteinization of shrimp wastes and as a laundry detergent additive. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 160:2308-2321.
  28. Kole MM, Draper I, Gerson DF. 1988. Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. *J Chem Technol Biotechnol.* 41:197-206.
  29. Ferrero MA, Cartro GR, Abate CM, Baigori MD, Sineriz F. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:327-332.
  30. Varela H, Ferrari MD, Belobrajdic L, Weyrauch R, Loperena ML. 1996. Short communication: effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:643-645.
  31. Hameed A, Keshavarz T, Evans C S. 1999. Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *J Chem Technol Biotechnol.* 74:5-8.
  32. Nehete PN, Shah VD, Kothari RM. 1985. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. *Biotechnol. Lett.* 7:413-418.
  33. Patel AK, Singhania RR, Pandey A. 2016. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Edited by: Brahmachari G, Demain AL, Adrio JL. Chapter 2, pp. 13-41, Academic Press.
  34. Sinchaikul S, Sookkheo B, Topanuruk S, Juan HF, Phutrakul S, Chen ST. 2002. Bioinformatics, functional genomics and proteomics study of *Bacillus* sp. *J. Chromatogr. B* 771:261-87.
  35. Voigt B, Scheweder T, Becher D, Ehrenreich A, Gottschalk G, Feesche J, Maurer KH, Hecker M. 2004. A proteomic view of cell physiology of *Bacillus licheniformis*. *Proteomics.* 4:1463-1480.
  36. Harwood C, Cranenburgh R. 2007. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.* 16:73-79.
  37. Van Dyk JS, Sakka M, Sakka K, Pietschke BI. 2010. Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1. *Enzyme Microb. Technol.* 47:112-118.
  38. Chu PW, Yap MN, Wu CY, Huang CM, Pan FM, Tseng MJ, Chen ST. 2000. A proteomic analysis of secreted proteins from xylan-induced *Bacillus* sp. strain K-1. *Electrophoresis.* 21:1740-1745.
  39. Suzuki H, Izuka S, Minami H, Miyakawa N, Ishihara S, Kumagai H. 2003. Use of bacterial glutamyltranspeptidase for enzymatic synthesis of glutamyl compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6399-6404.
  40. Wu Q, Xu H, Zhang L, Yao J, Ouyang P. 2006. Production, purification and properties of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from a newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 43:113-117.
  41. Tiwary E, Gupta R. 2010a. Subtilisin-gamma-glutamyl transpeptidase: a novel combination as ungual enhancer for prospective topical application. *J Pharm Sci.* 99:4866-4873.
  42. Tiwary E, Gupta R. 2010b. Improved catalytic efficiency of a monomeric  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis* in presence of subtilisin. *Biotechnol. Lett.* 32:1137-1141.

## Anexo 17:

Waste and Biomass Valorization  
<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0328-4>

ORIGINAL PAPER



## Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium

Anabell del Rocio Urbina-Salazar<sup>1,2</sup> · Alberto Renato Inca-Torres<sup>1,2</sup> · Gonzalo Falcón-García<sup>1</sup> · Pilar Carbonero-Aguilar<sup>1</sup> · Bruno Rodríguez-Morgado<sup>1</sup> · José A. del Campo<sup>2</sup> · Juan Parrado<sup>1</sup> · Juan Bautista<sup>1</sup>

Received: 24 January 2018 / Accepted: 7 May 2018  
 © Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

### Abstract

**Purpose** The aim of this work was to evaluate the use of chitin-rich mushroom (*Agaricus bisporus*) by-products chitin/glucan enriched fraction (M-Ch/G-F) as main carbon source for the production of chitinases by three different microorganisms (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* and *Bacillus licheniformis*), in an attempt to obtain these enzymes using a cheap and abundant fermentation medium.

**Methods** Microorganisms were grown in submerged fermentation using different media formulated with chitin powder (Ch<sub>p</sub>), colloidal chitin (Ch<sub>c</sub>) and M-Ch/G-F as the main carbon source, respectively. Enzyme productivity and secretion (secretome) was studied by electrophoretic and proteomic methods.

**Results** All microorganisms produced higher chitinase activity in a medium formulated with M-Ch/G-F as a carbon source compared to medium formulated with Ch<sub>p</sub> or Ch<sub>c</sub>. *T. harzianum* showed the highest chitinase productivity (261.5 mU L<sup>-1</sup> per day). Chitinase production was monitored by electrophoretic and proteomic methods. Electrophoretic method allowed the detection of 28 different proteins—three different chitinases with 82, 50 and 31 kDa. Proteomic analysis could identify 161 different proteins: 60 of them hydrolases, and 80% having glycolytic activity—5 of them were chitinases. These results show that cultivation of *T. harzianum* in a cheap and abundant fermentation medium represents a good procedure for large scale production of chitinases.

**Conclusions** Our results show that cultivation of *T. harzianum* in a culture medium formulated with M-Ch/G-F, a cheap and abundant fermentation medium, is a good procedure for large scale production of glycosidases, particularly chitinases within a relatively short cultivation period of 6 days.

### Graphical Abstract



**Keywords** Chitin-rich mushroom byproduct · *Trichoderma harzianum* · *Bacillus licheniformis* · *Agaricus bisporus* · Chitinase

✉ Juan Bautista  
 jlbaut@us.es

Extended author information available on the last page of the article

### Abbreviations

M-Ch/G-F Mushroom chitin/glucan enriched fraction  
 Mm Minimal medium  
 GlcNAc *N*-acetylglucosamine  
 Ch<sub>p</sub> Chitin powder

Published online: 14 May 2018

Springer

Ch <sub>c</sub>	Colloidal chitin
PDB	Potato dextrose broth

## Introduction

Chitin is the most abundant organic compound in nature after cellulose; it is a key structural component of most crustaceans, mollusks, insects, fungi, algae and marine invertebrates, constituting 75% of the weight of these microorganisms [1, 2]. Enormous amounts of this insoluble linear  $\beta$ -1,4-linked polymer of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) are synthesized in the biosphere, and about  $10^{11}$  metric tons are produced annually only in the aquatic biosphere [3].

Chitin is found in three polymorphic forms that differ in their molecular arrangement:  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -chitin [4].  $\alpha$ -Chitin is the most abundant, with an antiparallel configuration form. It presents a highly ordered crystalline structure, caused by strong H-bonding, which leads to a rigid, intractable and insoluble structure. It is assumed that chitin plays a skeleton role.  $\beta$ -Chitin, with a parallel configuration and weak H-bonding, is unstable and soluble in water; while  $\gamma$ -chitin is a mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chitin and presents intermediate properties [5]. The latter two have more flexible mechanical properties and are easily degraded by enzymes (chitinases).

The enzymatic hydrolysis of chitin to acetyl-D-glucosamine is carried out by a two-hydrolases system: chitinases and chitobiases. Chitinases are enzymes that degrade chitin, being synthesized mainly by bacteria and fungi, and according to the mechanism, are classified into two broad categories: endochitinases (EC 3.2.1.14) and exochitinases. The former randomly divided chitin into the internal sites of the reducing end, thereby forming the dimeric di-cetylchyllobiose and the low molecular mass soluble multimers of GlcNAc, such as chitotriose, chitotetraose and chitopentose. The exochitinases act on the non-reducing end of the chain, and are divided into two subcategories: chitobiosidases (EC 3.2.1.29), involved in the catalysis of the progressive release of di-acetylchyllobiose from the non-reducing end of the chitin microfibril, and the *N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52), that cleaves the oligomeric products of endochitinases and chitobiosidases generating GlcNAc [6].

These enzymes have high potential applications in the pharmaceutical, food and agronomic industry, and can be used in biocontrol against phytopathogenic fungi or to enhance insecticidal activity because they are not toxic, biodegradable, and biocompatible [2]. They can be used for biological control on plants because their mechanism against infection of fungal pathogens, which allows their use as an alternative pesticide, avoiding the use of chemical pesticides that are expensive, pollute the environment and produce resistance to certain pathogens.

One of the major bottlenecks for the industrial application of enzymes is the high production cost, where culture media may represent up to 40% of the total production costs [7]. Thus, great interest in the development of efficient and cheap cultivation media has arisen. Among the media developed to address this issue, those derived from agro-industrial byproducts are of special interest, and in particular those based on the use of mushroom byproducts due to the high growth rate of *Trichoderma* on media formulated with this substrate, its abundance, low cost and independence of the annual season.

Among the microorganisms that produce chitinases, *Bacillus* and *Trichoderma* species are of industrial interest. *Bacillus licheniformis* is a gram-positive microorganism isolated from soil and plant material [8] and used in large-scale industrial production of exoenzymes, as it can secrete large amounts of proteins [9]. *Trichoderma* spp., a common soil fungus belonging to Mitosporic Fungi group, is used in agriculture as biological control agent because of its properties as biopesticide and biofertiliser.

The aims of this study were: (i) to produce chitinolytic enzymes in a cheap and abundant fermentation media (mushroom byproducts); and (ii) to investigate enzyme expression patterns of chitinolytic-producing microorganisms of industrial interest: *B. licheniformis*, *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*, growing on different cultivation media formulated with chitin-rich byproducts, using electrophoretic and proteomic methods for monitoring production.

## Materials and Methods

### Microorganisms

*Bacillus licheniformis* ATCC 21415 was obtained from American Type Culture Collection, stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and refreshed 24 h before inoculation in LB medium ( $10\text{ g L}^{-1}$  peptone,  $5\text{ g L}^{-1}$  yeast extract, and  $10\text{ g L}^{-1}$  NaCl, adjusted to pH 7), and incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . *T. atroviride* CEC-T03 and *T. harzianum* CEC-T24 were obtained from Spain Type Culture Collection (Burjasot, University of Valencia, Spain).

### Culture Medium and Growth Conditions

Microorganisms were grown in seven different culture media in aerobiosis, with mechanical stirring, whose composition is shown in the Table 1. 150 mL of medium, pH 7.0 for *B. licheniformis*, and pH 6.0 for *Trichoderma*, was dispensed into 500 mL flasks and sterilized at  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min. The flasks were inoculated in triplicate and grown for 14 days as described below. Minimal medium (Mm) is composed by the following components:  $8.2\text{ g L}^{-1}\text{ Na}_2\text{HPO}_4$ ,

## Waste and Biomass Valorization

**Table 1** Composition of the culture media

Culture medium	Mm (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Ch <sub>p</sub> (%)	Ch <sub>c</sub> (%)	M-Ch/G-F (%)	PDB (%)	Czapeck medium
H <sub>2</sub> OCh <sub>p</sub>	–	150	1	–	–	–	–
H <sub>2</sub> OCh <sub>c</sub>	–	150	–	1	–	–	–
M <sub>m</sub> Ch <sub>p</sub>	150	–	1	–	–	–	–
M <sub>m</sub> Ch <sub>c</sub>	150	–	–	1	–	–	–
PDBCh <sub>c</sub>	–	–	–	1	–	150	–
Czapeck'sCh <sub>c</sub>	–	–	–	1	–	–	150
M-Ch/G-F	150	–	–	–	2	–	–0

Ch<sub>p</sub> chitin powder, Ch<sub>c</sub> colloidal chitin, M<sub>m</sub> minimal medium, PDB Potato Dextrose Broth, M-Ch/G-F mushroom Chitin/Glucan enriched fraction

Mm composition: 8.2 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.8 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 g L<sup>-1</sup> NaCl, 2 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mushroom peptone 10 g L<sup>-1</sup> and 10 mL L<sup>-1</sup> of trace element solution

Composition of trace element solution (g L<sup>-1</sup>): 0.55 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.67 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.10 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.17 g ZnCl<sub>2</sub>, 0.043 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.06 g CoCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and 0.06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

3.8 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 g L<sup>-1</sup> NaCl, 2 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mushroom peptone 10 g L<sup>-1</sup> and 10 mL L<sup>-1</sup> of trace element solution; and the composition of trace element solution (g L<sup>-1</sup>) is: 0.55 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.67 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.10 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.17 g ZnCl<sub>2</sub>, 0.043 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.06 g CoCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and 0.06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.

### Preparation of Carbon Sources

#### Preparation of Colloidal Chitin

Colloidal chitin (Ch<sub>c</sub>) was prepared according to the method described by Ramírez et al. [10] with slight modifications. Briefly, 10 g of chitin powder were mixed with 200 mL of cold concentrated HCl (37%), maintaining constant and vigorous agitation for 24 h at 4 °C. Then, 96% ethanol was added to a final volume of 2 L and stirred vigorously. After 24 h incubation at –20 °C, the suspension was centrifuged at 5000×g for 20 min. Finally, the precipitate was washed with distilled water until the pH of the supernatant reach a value of 7 ± 0.1, and the former dissolved in the appropriate buffer.

#### Preparation of Mushroom Chitin/Glucan Enriched Fraction (M-Ch/G-F)

M-Ch/G-F was prepared according to the procedure described by Bautista et al. [11]. Briefly, 1000 g of mushroom (*Agaricus bisporus*) meal was suspended in 10 L of 100 mM phosphate buffer of pH 7.8 and treated with Alcalase (Novozyme) in a 1/50 enzyme/substrate (w/w) ratio and hydrolyzed for 3 h at 55 °C. The hydrolysate was centrifuged at 4 °C for 15 min at 10,000×g, the supernatant was discarded and the precipitate was treated three times with 10 L of tap water and autoclaved at 121 °C for 20 min, cooled at room temperature in a water bath at 22 °C, and centrifuged

at room temperature for 15 min at 10,000×g. The supernatant was discarded and the precipitate used as M-CH/G-F.

### Bacillus licheniformis Growth

*Bacillus licheniformis* was grown on sterilized culture media, prepared as shown in Table 1, inoculated with 15 mL of inoculum grown in brain heart infusion (BHI)-broth at 37 °C and pH 7 until fermentation-broth reach a 30% of transmittance (approximately for 18 h), and grown for 14 days at 37 ± 1 °C with constant stirring (150 rpm). Aliquots of 5 mL were taken every day, and stored at –20 °C until use for biomass and enzymatic activity analyses.

### Trichoderma Growth

*Trichoderma atroviride* and *T. harzianum* were grown in the culture media described above (Table 1). 2 mL of an aqueous 2% (w/v) MgCl<sub>2</sub> spore suspension (1 × 10<sup>7</sup> spores mL<sup>-1</sup>) of *T. atroviride* or *T. harzianum* grown on solid Czapek medium containing 4% glucose as a carbon source was used to inoculate 500 mL Erlenmeyer flasks containing 150 mL medium, and grown for 14 days at 28 ± 1 °C with constant stirring (150 rpm). Aliquots of 5 mL were taken every day, and stored at –20 °C until use for biomass and enzymatic activity analyses.

### Biomass Assay

Biomass was determined directly in the thawed samples. For *B. licheniformis*, the growth was followed by direct measurement of transmittance of the samples 1:100 diluted with water. Biomass concentration was determined by interpolation from a standard curve of biomass against %T. For *T. harzianum* and *T. atroviride* biomass was estimated indirectly by quantifying ergosterol [12]. Biomass concentration



was calculated by interpolation in a standard curved biomass against ergosterol.

### Enzymatic Assays

For determination of the enzymatic activity samples were centrifuged at  $12,000\times g$  for 20 min, and the obtained supernatants were used for enzymatic assays and electrophoretic analysis.

### Chitinase Assay

Chitinase activity was determined by measuring the reducing sugars produced from colloidal chitin, using the dinitrosalicylic acid (DNS) method [13]. Briefly, the reaction mixture, consisting of 0.25 mL of 1% (w/v) colloidal chitin, 0.25 mL of Tris-HCl (pH 7.4) and 0.50 mL of enzyme sample, was incubated at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by adding 1 mL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) aqueous solution, and the mixture heated for 10 min in a boiling water bath. After cooling, the absorbance of the solution was determined at 575 nm using an Ultrospec 2100pro UV/Visible spectrophotometer (GE Healthcare, Barcelona, Spain). In parallel, the same volume of deionized water was used negative control. One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme that produced 1 mg mL<sup>-1</sup> of reducing sugar per 1 h at 37 °C. The concentration of the reducing sugar was determined by interpolation in a standard curved prepared with GlcNAc.

**Preparation of Dinitrosalicylic Acid Aqueous Solution** Ten grams of DNS were dissolved in 200 mL of 2 M NaOH solution. Subsequently, 300 g of sodium potassium tartrate, 5 g of steamed phenol, and 5 g of sodium sulfite were added to 800 mL of hot deionized water. The volume was adjusted to 1 L using pre-cooled deionized water to obtain DNS aqueous solution.

### Protein Assay

Protein was quantified by the method of Bradford with bovine serum albumin as standard [14].

### SDS-PAGE Protein Profiling

Extracellular protein profile was obtained by SDS-PAGE. After precipitation with HCl-acetone, pH 2.0, the pellet was solubilized in the buffer used for sample preparation—1 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 5% (w/v) SDS and 7% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol. Samples were kept at room temperature for 2 h, and then centrifuged at  $12,000\times g$  for 15 min. Supernatant was collected and run in triplicate on 12% gel, each replicate containing 20  $\mu$ L of supernatant (approximately

50  $\mu$ g of protein) and 5  $\mu$ L of loading buffer—0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% (v/v) glycerol, 10% (w/v) SDS, 5% (v/v) bromophenol blue. Samples were boiled for 5 min, centrifuged at  $10,000\times g$  for 30 s and cooled before being loaded on the gel. Electrophoresis was carried out at constant intensity (25 mA) using a Tris-glycine buffer system containing 0.1% SDS until the bromophenol front ran out the gel. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) and/or silver staining (GE Healthcare, Barcelona, Spain) and digitized on Gel Doc™ XR+ Imaging system (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Gels for proteomic analysis were not stained.

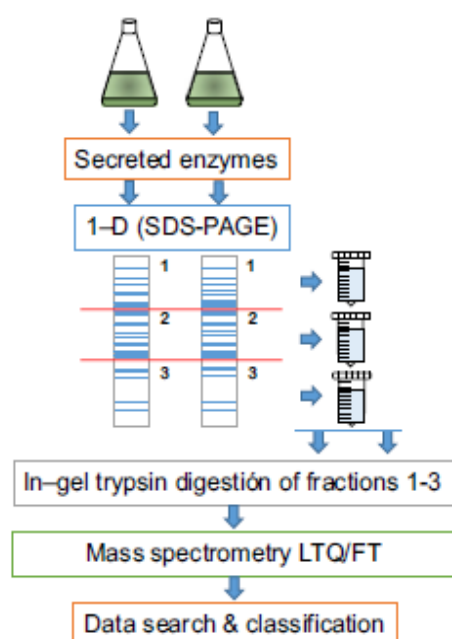
### Zymogram Analysis

For zymogram analysis of chitinase, 10% separating gel containing 0.1% colloidal chitin as the substrate of chitinase was used to detect chitinase activity. Samples were mixed with loading buffer without reducing agent and heated prior to loading in the electrophoresis gel. After electrophoresis, gel was incubated in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) at 4 °C for 18 h. Chitinase activity on the gel was visualized by staining with 0.1% Congo Red followed by de-staining with 1 M NaCl. The lytic zone on the gel observed at daylight against a dark red background indicated the presence of active enzyme [15].

### Proteomic Study

The global process followed in this study is schematically shown in Fig. 1.

Briefly, protein preparations (50  $\mu$ g proteins per line) were separated by electrophoresis in 12% SDS polyacrylamide gels as described above. Each of the unstained gel lanes was divided into three slices and each slice placed in a different tube. After fractionation of each slice in smaller pieces, it was individually "in gel" processed, following the protocol described in [16]. Each slice was incubated in 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 30% (v/v) acetonitrile at 30 °C for 120 min. The proteins within the pieces were reduced with 10 mM dithiothreitol for 20 min. After washing with 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, the gels were alkylated by incubation in 20 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in the dark. The alkylated samples were washed with 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and dehydrated with 100% ACN. Proteins in gel were digested with sequencing-grade modified porcine trypsin (Promega, Madrid, Spain) in 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> at 37 °C overnight. Tryptic peptides were extracted twice from the gel pieces with 50% (v/v) ACN, and dried by vacuum in a Savant. The dried peptides were stored at -80 °C until analysis by nano-liquid chromatography coupled to mass spectrometry (nLC-MS/MS). Briefly, the digested peptides were resuspended in Milli-Q water and desalted with



**Fig. 1** Scheme of the experimental design used for proteomic analysis of *T. harzianum*-294 secretome

buffer-A (99.9% water + 0.1% formic acid) onto a Zorbax 300 SB-C18, 5 × 0.3 mm, peptide trap column (Agilent, Madrid, Spain) for 10 min. Bound peptides were eluted onto a 10 cm × 75 μm Picofrit column packed with Microm Magic C18 AQ and eluted over 120 min with a gradient of 5% buffer-B (99.9% acetonitrile + 0.1% formic acid) to 50% buffer-B in 75 min, then 50% buffer-B to 90% buffer-B from 75 to 79 min using a Thermo Electron Surveyor HPLC. The peptides were eluted into a Thermo Electron LTQ/FT mass spectrometer at a flow rate of 250 nL min<sup>-1</sup>. Survey scans were taken at a resolution of 100,000 and the top ten ions in each survey scan were subjected to automatic low-energy collision-induced dissociation (CID) in the linear trap (LTQ). Fragment tolerance was set at 0.80 Da (monoisotopic), and the parent tolerance was of 200 ppm (monoisotopic). Complete and partial residue modifications were allowed as well as point mutations and two missed cleavage sites. For probabilistic validation of protein identifications in the *T. harzianum* proteome (v. 2.0, DOE Joint Genome Institute) Scaffold version 01.07.00 (Proteome Software, Portland, Oregon) was applied, using for that purpose the X-Tandem and Protein Prophet computer algorithms [17,

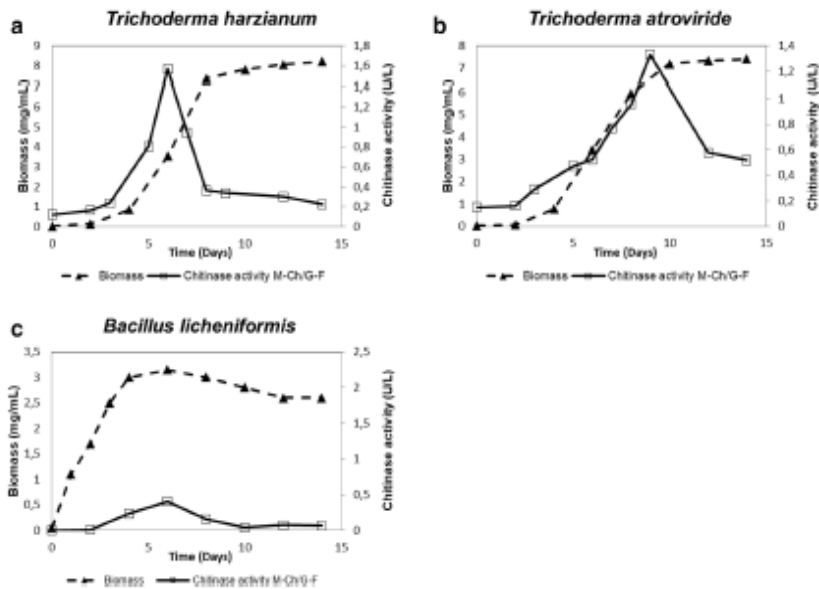
18]. Minimum criteria for positive identification were set at least two peptides and a probability > 95%.

## Results and Discussion

The biotechnological interest of lytic enzymes (chitinases, β-glucanases and others) is mainly due to its high potential applications in pharmaceutical, food and agronomic industry, and particularly because they can be used in biocontrol against phytopathogenic fungi or to enhance insecticidal activity in pests treatments. Consequently, the production of these enzymes in high quantities at low costs is very desirable.

Usually these enzymes are produced in the presence of specific substrates (chitin, glucans, etc.) by specific inductive mechanisms. Therefore, the main studies on the secretion of these enzymes have been conducted using inactivated mycelium or cell walls of different pathogens, such as *Guignardia citricarpa* [19], *Pythium* sp., *Sclerotium rolfsii* or *Rhizoctonia solani* [20] as specific substrates (main carbon source). However, few studies have been carried out using abundant and cheap substrates such as chitin-rich agroindustrial byproducts to improve the production of these lytic enzymes (chitinases and glucanases, ...). In this respect, the production of chitinase and β-glucanase activities by *B. licheniformis*, *T. harzianum* and *T. atroviride* growing for 14 days in culture medium containing chitin-rich substrates (chitin powder, colloidal chitin and M-Ch/G-F as carbon sources) was studied. Figure 2a, b, and c shows typical growth curves of *T. harzianum*, *T. atroviride* and *B. licheniformis* grown on a medium formulated with M-Ch/G-F as main carbon source. Similar results, but with lower biomass production were obtained for the other culture media. Table 2 summarizes the results obtained after 14 days of growth in the different culture media under study.

As shown in Table 2, the growth of *T. harzianum* and *T. atroviride* in the culture medium formulated with M-Ch/G-F is significantly greater than in the Czapeck's/Ch<sub>c</sub>, PDB/Ch<sub>c</sub> or Mm/Ch<sub>c</sub> culture medium; while *B. licheniformis* growth is similar in a culture medium formulated with PDB/Ch<sub>c</sub> or M-Ch/G-F. However, the growth of all three microorganisms is better in colloidal chitin than in chitin powder as carbon source, probably due to the amorphous structure present in colloidal chitin that facilitate the action of chitinase, in contrast to the crystalline structure of chitin powder. Greater growth observed for the three microorganism studied in the culture medium formulated with M-Ch/G-F as main carbon source can be explained by the presence of chitin and glucans as carbon source, which, probably, could be used easier by the microorganism by liberating fermentable sugar in a more efficient manner than from chitin.



**Fig. 2** Time course study of Biomass (spaced dashed line with triangle) and chitinase activity (dashed line with square) of: **a** *T. harzianum*, **b** *T. atroviride*, and **c** *B. licheniformis*, grown on a medium with M-Ch/G-F as main carbon source

**Table 2** Biomass production in the different culture media after 14 days growth

Culture medium	<i>T. harzianum</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>T. atroviride</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>B. licheniformis</i> (mg mL <sup>-1</sup> )
H <sub>2</sub> O/Ch <sub>p</sub>	–	–	0.2±0.2
H <sub>2</sub> O/Ch <sub>c</sub>	–	–	1.3±0.1
Mm/Ch <sub>p</sub>	0.7±0.2	0.5±0.3	0.4±0.1
Mm/Ch <sub>c</sub>	3.2±0.4	2.9±0.2	2.3±0.3
PDB/Ch <sub>c</sub>	4.6±0.5	3.7±0.3	2.6±0.2
Czapeck'w/Ch <sub>c</sub>	0.2±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1
M-Ch/G-F	8.2±0.6	7.4±0.4	2.7±0.4

Ch<sub>p</sub> chitin powder, Ch<sub>c</sub> colloidal chitin, Mm minimal medium, PDB Potato Dextrose Broth, M-Ch/G-F mushroom Chitin/Glucan enriched fraction

Figure 2(a, b and c, biomass curves) shows the growth of *T. harzianum*, *T. atroviride* and *B. licheniformis* in a culture medium formulated with M-Ch/G-F as main carbon source. Figure 2(a, b and c, activity curves) also shows the production of chitinase by the three studied microorganisms grown in a culture medium with M-Ch/G-F as main carbon source. These results show that *Trichoderma* produced more chitinase activity than *B. licheniformis* grown in the same

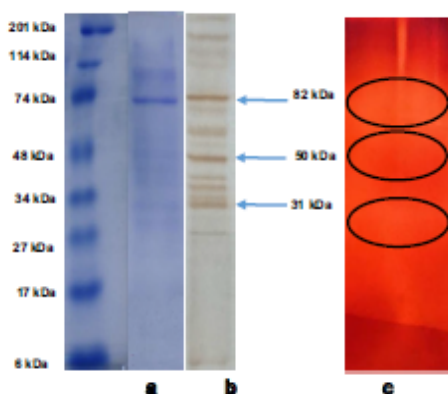
culture medium. In all three cases a maximum of production is observed 261.5 mU L<sup>-1</sup> per day, 147.6 mU L<sup>-1</sup> per day and 67.83 mU L<sup>-1</sup> per day at day 6, 9 and 6, after which the activity is drastically reduced, probably owing to induction of protease production [21]. It was also observed that the production of chitinase is lower in the culture medium formulated with colloidal chitin than in that formulated with M-Ch/G-F as main carbon source (results non shown). The production of β-glucanases, the other main group of enzymes involved in the degradation of mycelial walls of pathogen, is also induced in the culture medium with M-Ch/G-F as main carbon source [11].

Taking into account the above results, we focused our work on *Trichoderma* as source for production of chitinase using M-Ch/G-F as carbon source for formulation of culture medium. Our results using M-Ch/G-F are similar to those described by other groups using chitin-rich substrates such as fungi cell walls [19, 20]. These results suggest that the regulation of the expression of chitinases and β-glucanases in these fungi can be influenced by the amount and complexity of the chitin and β-glucan present in the culture medium. Fungal cell walls are composed mainly by β-1,3 and β-1,6-glucans (a glucose polymer) linked to chitin (GlcNAc polymer) via β-1,4 bonds. This chitin/glucan complex is linked to other polysaccharides whose composition varied

with the species (galactomannan, mannan and galactosaminogalactan). These polysaccharides constitute 80–85% of the mass of cell wall, while glycoproteins constitute the remaining 20–15% [22].

The chitinases and glucanases enzymes are constitutively produced by *Trichoderma*, but in the presence of their substrates (chitin, chitinoligosaccharides, glucans, glucanoligosaccharides) the production of these enzymes is clearly induced [23, 24]. The induction of the hydrolytic activities (chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase) suggests that these enzymes may be involved in the mycoparasitism process of *T. harzianum* and *T. atroviride* against pathogen fungi. In relation to this behavior, it is known that chitin and  $\beta$ -1,3-glucans are structural components of the fungal wall, suggesting that chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase produced by *T. harzianum* and *T. atroviride* are important elements of cell lysis enzymes during mycoparasitic action [21, 25]. But probably other enzymes are also involved in the process of cell wall lysis of pathogens (mycoparasitism). To obtain more information about the involvement of these and other proteins in the mycoparasitism and/or cell lysis mechanisms, we studied the set of proteins excreted (secretome) by *T. harzianum* using electrophoretic and proteomic techniques.

Proteins of *T. harzianum* growth on the culture medium formulated with M-Ch/G-F separated by SDS-PAGE are shown in Fig. 3. As this figure shows, while only 14 bands are clearly distinguished in Coomassie Blue stained gel, in the silver stained gel 28 bands could be clearly detected; three of them with molecular mass 82, 50 and 31 kDa could



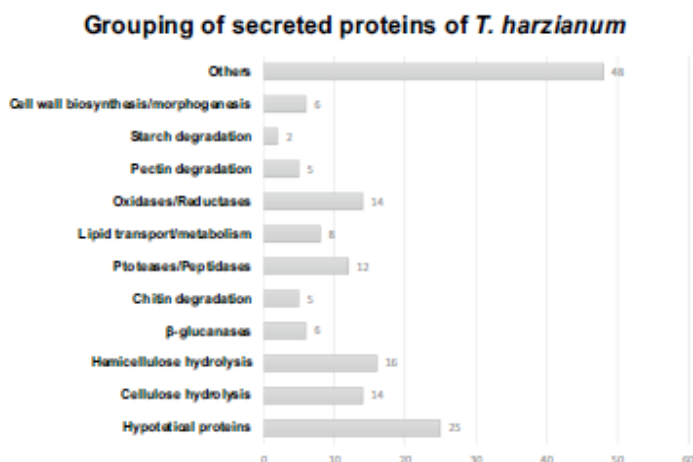
**Fig. 3** Electrophoretic separation by SDS-PAGE of proteins secreted by *T. harzianum* growth on an M-Ch/G-F formulated culture medium. Molecular weight standards: myosin 201 kDa,  $\beta$ -galactosidase 114 kDa, Bovine Serum Albumin 74 kDa, ovalbumin 48 kDa, carbonic anhydrase 34 kDa, soybean trypsin inhibitor 27 kDa, lysozyme 17 kDa, aprotinin 6 kDa [a Coomassie Blue staining; b silver staining and c activity staining (zymogram)]

correspond to chitinases secreted by *T. harzianum* in the culture medium. However, when the gel lanes were divided into three slices and each slice was individually “in gel” processed with trypsin and the digested samples analyzed by proteomic procedures, 161 *T. harzianum* specific proteins were identified, versus the 91 proteins identified when *T. harzianum* was grown in a colloidal chitin formulated culture medium (results not shown). This behavior is probably due to the presence of glucans as carbon source in the culture medium formulated with M-Ch/G-F, which could induce the production of  $\beta$ -glucanases.

The current understanding of the enzymes involved in the effective hydrolysis of complex substrates is greatly facilitated by the modern proteomics and bioinformatics techniques. The first proteomic investigation into the secretome of *Trichoderma*, specifically in *T. reesei* [26], identified 36 proteins, the majority of them linked to cellulose and hemicellulose hydrolysis. More recently, studies using iTRAQ-systems have enabled quantitative analysis of the secretome, in which 636 secreted proteins were identified, 230 of them (36%) associated with cellulolytic and proteolytic enzymes [27]. In this study, a proteomic approach using nLC-MS/MS was used to analyze the *T. harzianum* secretomes growth for 6 days (maximum production of chitinase activity) on a culture medium with M-Ch/G-F as main carbon source. In total, 357 proteins were identified in the supernatant—161 of them proteins specific of *T. harzianum*, and the rest (196 proteins) proteolytic fragments of the specific proteins, probably generated by the secretion of proteases and peptidases to the growth medium. Within the *T. harzianum* secretome, N-terminal Sec-dependent secretion signals [28] were identified in silico for 85 proteins (52.8% of the total proteins detected), with 76 secreted proteins being predicted for *T. harzianum*. The presence of more than 47.2% of the proteins in the secretome without predicted secretion signals indicates possible cell lysis, cell death or non-classic secretory mechanisms.

The proteins secreted by *T. harzianum* in a culture medium formulated with M-Ch/G-F as main carbon source were grouped according to their biological function (Fig. 4). As can be observed, within the *T. harzianum* secretome, 60 proteins (37.3% of total secreted proteins) were identified as having hydrolytic activity, and 80% of them having glycolytic activity (cellulase, hemicellulase, glucanase, chitinase, pectinase and starch degrading enzymes), relevant to cellulose, hemicellulose, glucan and chitin degradation. In addition to the glycolytic-related enzymes, the *T. harzianum* secretome contained a set of proteases and peptidases (12 proteins), involved in lipid transport and metabolism (8 proteins), proteins implicated in oxidation/reduction processes (14 proteins), in cell wall biosynthesis and morphogenesis (6 proteins), and 48 proteins with no-clear function. Of special interest for us are the five chitinases described in

**Fig. 4** Grouping of secreted proteins of *T. harzianum* grown on a culture medium formulated with M-Ch/G-F as main carbon source, according to its biological function



this work which can be related with the three bands found by electrophoretic studies.

## Conclusions

The obtained results show that cultivation of *T. harzianum* in a culture medium formulated with M-Ch/G-F, a cheap and abundant fermentation medium, is a good procedure for large scale production of glycosidases, particularly chitinases within a relatively short cultivation period of 6 days. Enzyme recovery by ultrafiltration, followed by ethanol fractionation, represents a promising process for the preparation of products with high chitinolytic activity (further studies underway). Immobilization of these enzymes on nano- or micro-particles as appropriate vehicle for their application as powders or sprays for the treatment of insect pests or other applications in biocontrol is a pending goal.

**Acknowledgements** We are grateful to the Spanish Ministry of Science and Innovation for the financial support of this work (Project RTC-2015-4039-2), which has partial financial support from the FEDER funds of the European Union. J.A. del Campo was supported by *Nicolás Monardes Program* from Servicio Andaluz de Salud (SAS). The authors thank Paula Bautista for assistance in the preparation of the manuscript.

## References

- Shaikh, S.A., Deshpande, M.V.: Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 468–475 (1993). <https://doi.org/10.1007/BF00328035>
- Barboza-Corona, J.E., Reyes-Rios, D.M., Salcedo-Hernández, R., Bideshi, D.K.: Molecular and biochemical characterization of an endoquitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki HD-73. *Mol. Biotechnol.* **39**, 27–29 (2008). <https://doi.org/10.1007/s12033-007-9025-4>
- Tsujiho, H., Orikoshi, H., Shiotani, K., Hayashi, M., Umeda, J., Miyamoto, K., Imada, C., Okami, Y., Inamori, Y.: Characterization of chitinase C from marine bacterium *Aeromonas* sp. strain 0-7, and its corresponding gene and domain structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 472–478 (1998)
- Fortuna-González, J.M.: Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. thuringiensis*. Doctoral thesis. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México, (2010)
- Sastoque, C.: Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. Tesis para optar el título de microbiólogo industrial, agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia (2005)
- Sahai, A.S., Manocha, M.S.: Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *Microbiol.* **11**, 317–338 (1993). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00004.x>
- Gessesse, A.: The use of Nug meal as a low cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme. *Bioresour. Technol.* **62**, 59–61 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00059-X)
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore (1986)
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P.: Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* **50**, 1–17 (2004). <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Ramírez, M.G., Avelizapa, L.I., Avelizapa, N.G.R., Camarillo, R.C.: Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *J. Microbiol. Methods* **56**, 213–219 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.011>
- Bautista, J.: CHAMPI-D. Project RTC-2015-4039-2 (2015)
- Göts, S., Schumann, R., Hübner, N., Karsten, U.: Fungal and algal biomass in biofilms on artificial surfaces quantified by ergosterol and chlorophyll *a* as biomarkers. *Int. Biodeterior.*

- Biodegradation **60**, 50–59 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.biode.2006.10.003>
13. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428 (1959)
  14. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
  15. Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jaruseanee, N., Buranabanyat, B.: Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnol. J.* **133**, 50–57 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.09.005>
  16. Carbonero-Aguilar, P. Estudio de la oxidación de proteínas en ratas con encefalopatía hepática: una aproximación Proteómica. Doctoral thesis. Universidad de Sevilla. Sevilla, Spain (2012)
  17. Craig, R., Beavis, R.C.: A method for reducing the time required to match protein sequences with tandem mass spectra. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2310–2316 (2003). <https://doi.org/10.1002/rcm.1198>
  18. Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E., Aebersold, R.: A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 4646–4658 (2003). <https://doi.org/10.1021/ac0341261>
  19. de Lima, F.B., Félix, C., Osório, N., Vitorino, A.A., Domingues, P., Correia, A., da Silva-Ribeiro, R.T., Esteves, A.C.: Secretome analysis of *Trichoderma atroviride* T17 biocontrol of *Gaïgnardia citricarpa*. *Biocontrol Sci.* **99**, 38–46 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.003>
  20. Giese, E.C., Corradi da Silva, M.I., Barbosa, A.M.: Fungal glucanase: production and application of  $\beta$ -1, 3 and  $\beta$ -1, 6-glucanases. *Rev. Biotechnol. Cienc. Desenvol.* **30**, 97–104 (2003)
  21. Mohamed, H.A.A., Wafaa, M.H., Attallah, A.G.: Genetic enhancement of *Trichoderma viride* to over produce different hydrolytic enzymes and their biocontrol potential against root rot and white mold diseases in plants. *Agric. Biol. J. N. Am.* **1**, 273–284 (2010)
  22. Latgé, J.P.: Tasting the fungal cell wall. *Cell. Microbiol.* **12**, 863–872 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01474.x>
  23. Rana, I.A., Loerz, H., Schaefer, W., Becker, D.: Over expression of chitinase and chitosanase genes from *Trichoderma harzianum* under constitutive and induced promoters in order to increase disease resistance in wheat (*Triticum aestivium*). *Mol. Plant Breed.* **3**, 37–49 (2012). <https://doi.org/10.5376/mpb.2012.03.0004>
  24. Gajera, H.P., Vakharia, D.N.: Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolated during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. *Braz. J. Microbiol.* **43**, 43–52 (2012). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100005>
  25. Kubicek, C.P., Mach, R.J., Peterbauer, C.K., Lorito, M.: *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Plant Pathol. J.* **83**, 11–23 (2001). <http://www.jstor.org/stable/41998018>
  26. Herpoël-Gimbert, I., Margeot, A., Dolla, A., Jan, G., Mollé, D., Lignon, S., Mathis, H., Sigoillot, J.C., Monot, F., Asther, M.: Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. *Biotechnol. Biofuels* **1**, 1–12 (2008). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-18>
  27. Adav, S.S., Chao, L.T., Sze, S.K.: Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Mol. Cell Proteomics.* **11**, 1–15 (2012). <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.012419>
  28. Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Von Heijne, G., Brunak, S.: Improved prediction of signal peptide: signalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**, 783–795 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.028>

## Affiliations

Anabell del Rocío Urbina-Salazar<sup>1,2</sup> · Alberto Renato Inca-Torres<sup>1,2</sup> · Gonzalo Falcón-García<sup>1</sup> · Pilar Carbonero-Aguilar<sup>1</sup> · Bruno Rodríguez-Morgado<sup>1</sup> · José A. del Campo<sup>3</sup> · Juan Parrado<sup>1</sup> · Juan Bautista<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/Profesor García González 2, 41012 Sevilla, Spain

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Panamericana Sur km 1 1/2, Riobamba, Ecuador

<sup>3</sup> CIBERehd, Hospital Universitario de Valme, 41014 Sevilla, Spain



