



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***DETERMINACIÓN DE MACRONUTRIENTES, INULINA E INHIBIDORES DE
TRIPSINA EN 12 ESPECIES DIFERENTES DE HONGOS COMESTIBLES.***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Yesenia María Guadalupe Martínez González



México, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Bernardo Lucas Florentino

Vocal: Inocencia María de Lourdes Flores Tellez

Secretario: Leticia Gil Vieyra

1^{er} Suplente: Rosa María Argote Espinosa

2^{do} Suplente: Argelia Sánchez Chinchillas

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química
UNAM.


Asesor del Tema: M en C Bernardo Lucas Florentino


Asesor Técnico: M en C Rosa María Argote Espinosa


Sustentante: Yesenia María Guadalupe Martínez González

Esta tesis se realizó con el apoyo de PAPIIT y forma parte del proyecto nombrado: “Influencia de la Inulina en el tiempo de recuperación y desaparición de los cambios bioquímicos y estructurales producidos en ratas jóvenes desnutridas” y cuya clave correspondiente es: 1N203008

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme puesto en este camino, darme la oportunidad de vivir y todas las bendiciones otorgadas.

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, donde viví momentos inolvidables junto con mis amigos ; y que me formo como una profesional de la Química de Alimentos.

A mis padres y hermanos, que con paciencia y amor, me apoyaron incondicionalmente durante todo este tiempo. Sin ustedes no lo hubiera logrado...

A la M en C Ángela Sotelo López[†], que me apoyó incondicionalmente, y quien lamentablemente ya no se encuentra aquí, muchas gracias...

Al M en C Bernardo Lucas Florentino por su valiosa ayuda, para poder concluir todo esto.

A la M en C Edelmira Linares del Jardín Botánico de la UNAM por las muestras proporcionadas para la realización de este trabajo.

A la Maestra Rosita María Argote Espinosa, una persona muy especial, que hizo de mi estancia en el Laboratorio 111 una experiencia muy agradable.

A los miembros del jurado, por el tiempo otorgado a la revisión de esta tesis.

A la Sra. Vicky, por todas aquellas palabras y consejos.

A Arge y Lety, por su apoyo técnico otorgado, consejos y ayuda.

A Gretel, mi amiga para toda la vida, por haberme hecho reír tanto y permitido convivir con ella durante la carrera tantos momentos.

A Paulina, Ivonne y Aneli, mis compañeras y nuevas amigas, gracias por su ayuda y palabras.

A todas aquellas personas del Laboratorio 111 que me brindaron su apoyo y ayuda.

A todas aquellas personas que me dieron la oportunidad de compartir junto a ellos memorables momentos, me hicieron reír y ayudaron; mis amigos para toda la vida: Gretel, Clau, Mony, Aby, Rafa, Cris.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Ignacia González Portillo y Ramiro Martínez Bernardo.

Necesito más palabras de las que conozco para poder agradecerles todo el amor, paciencia y confianza que en mí han puesto. Agradezco todo el apoyo que me han otorgado sin dudar un solo instante, aprecio y valoro todos sus esfuerzos para poder concluir todo esto: la herramienta más importante en mi vida profesional. Gracias por compartir su tenacidad, perspicacia y sobre todo su optimismo. Sin ustedes no lo hubiera logrado, por ello este logro es suyo... los quiero mucho.

A mis hermanos:

César, Daniel, Miguel, Giovanni y Valeria.

Gracias a todos y cada uno de ustedes, forman parte importante de mi vida, he convivido muchas experiencias y momentos inolvidables con todos ustedes, gracias por su cariño, paciencia y comprensión para poder lograr esto.

A mis abuelos:

Quienes me han apoyado en todo, gracias los quiero.

A mis tíos y primos:

Quienes han sido parte de todo esto. Muchas Gracias!!!.

A la memoria de la M en C Ángela Sotelo López

A la mujer con muchos talentos y aptitudes, que dejó a su paso tantísimos conocimientos y recuerdos; su espíritu y entusiasmo por la vida sirvieron de inspiración a cuantos tuvimos la dicha de conocerla y compartir valiosos momentos.



ÍNDICE DE CONTENIDO



1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Objetivos	5
4. Antecedentes	6
Características generales de los hongos	6
Los hongos silvestres comestibles como productos forestales no maderables (PFNM).	7
Los hongos como factor cultural en México	8
Variedad de hongos comestibles con mayor demanda en México.	9
Fibra dietética	11
Fibra dietética soluble y fibra dietética insoluble	12
Acciones fisiológicas de la fibra dietética	13
Inhibidores de Tripsina	14
Tripsina y su importancia	14
Inulina	15
Efectos saludables de la inulina	15
5. Metodología	17
Muestras	18
Acondicionamiento de las muestras	21
Análisis Proximal	22
5.31 Determinación de Humedad AOAC(1990) ³	22
5.32 Determinación de Cenizas AOAC (1990) ³	23
5.33 Determinación de Proteína cruda AOAC (1990) ^{3,4} con Modificaciones.	24
5.34 Determinación de Grasa AOAC (1990) ^{3,4}	27
5.35 Determinación de Fibra Dietética AOAC (1995) ⁵	29
5.36 Determinación Inhibidores de Tripsina (Kakade y colaboradores).	36
5.37 Determinación cualitativa de Inulina	40
6. Resultados	43
7. Discusión	50

8. Conclusiones	53
9. Bibliografía	54
10. Anexos	57
Cálculos para obtener el %de Humedad	57
Cálculos para obtener el %de Cenizas	58
Cálculos para obtener el %de Proteína cruda	59
Cálculos para obtener el %de Grasa	60
Cálculos para obtener el %de Fibra dietética	61
Tabla esquemática de la serie de tubos para determinación de Inhibidores de Tripsina.	63



1. RESUMEN



Los hongos son alimentos cuyo mayor componente es el agua, por ello al analizar el contenido de macronutrientes en base húmeda, estos se ven disminuidos; a pesar de ello, los hongos estudiados presentan importantes cantidades de otros macronutrientes. Para una adecuada y equitativa comparación, se muestran los resultados en base seca (BS) (g/100 g de materia seca). Se estudiaron 8 especies diferentes de hongos silvestres (***Cantharellus cibarius***-duraznito, ***Amanita caesaria***-morochike, ***Amanita rubescens***-sojachis, ***Helvella lacunosa***-gachupines negros, ***Helvella crispa***-gachupines blancos, ***Laccaria*** spp.-xocoyoles, ***Laccaria bicolor***-xocoyoles; ***Lyophyllum descastes***-clavito), los cuales se compararon con 4 especies comerciales (***Ustilago maydis***-huitlacoche, ***Agaricus bisporus***-champiñones, ***Pleurotus*** sp.-setas, ***Lentinus*** sp.-crimini). Se caracterizaron y observó que las especies silvestres: ***Cantharellus cibarius*** y ***Lyophyllum descastes*** mostraron los contenidos de proteína más altos (41.0 y 50.8 respectivamente) y las especies comerciales ***Lentinus*** sp y ***Agaricus bisporus*** (39.1 y 34.7 respectivamente). Las especies del género ***Amanita***, mostraron los valores más altos de grasa (9.6 y 12.4 respectivamente). Se determinó fibra dietética ya que da mayor información alimenticia, y se encontró que las especies ***Helvella lacunosa*** y ***Helvella crispa*** obtuvieron los valores más altos de fibra dietética (43.8 y 43.3 respectivamente). Los Inhibidores de tripsina, son considerados como un factor antinutricional cuando la muestra analizada sobrepasa las 10 UTI/mg de muestra; el 75% de las variedades de hongos silvestres comestibles sobrepasan este límite siendo el doble y hasta el triple para

algunos casos; las especies ***Cantharellus cibarius***, y ***Laccaria spp***, son las únicas variedades silvestres que se encuentran por debajo de este valor mientras que las variedades comerciales analizadas se encuentran en el orden de 2 UTI/mg de muestra. Se encontró cualitativamente inulina y sólo las especies de hongos silvestres comestibles ***Amanita caesaria***, ***Amanita rubescens*** y ***Cantharellus cibarius*** mostraron este polisacárido.



2. INTRODUCCIÓN



Desde nuestro México prehispánico la alimentación del pueblo mexicano ha sido muy singular, ya que se han consumido ciertos alimentos característicos. Sin duda alguna el maíz ha sido la base de esta alimentación; sin embargo existen otros alimentos que han jugado un papel sumamente importante dentro de nuestra cultura, como lo han sido el frijol, el chile, el nopal y los hongos; tanto los cultivados, como los silvestres comestibles que han tenido un gran auge y demanda para su consumo.

Actualmente, los hongos comestibles silvestres son parte importante de la alimentación humana, principalmente en zonas rurales siendo un sustento alimenticio tanto para población rural como para algunas poblaciones indígenas de nuestro país.

Esta fuente de alimento es muy apreciada debido a sus reconocidas cualidades nutritivas y por su sabor; por ello se les coloca como un alimento de alto valor nutrimental. Son una excelente fuente de aminoácidos (triptofano, treonina, lisina, cistina y metionina); de algunas vitaminas (provitamina A, C, provitamina D, tiamina, niacina, riboflavina, ácido pantoténico y ácido fólico); aportan cantidades considerables de ciertos minerales (fósforo, sodio, potasio, magnesio, calcio y hierro entre los más importantes); hidratos de carbono; lípidos (ácidos grasos insaturados, esteroides y fosfolípidos) y muy bajas o nulas concentraciones de colesterol; y algo muy importante es que proveen de un valor nutritivo igual al de algunos alimentos ricos en proteínas y fibra.

Se conoce una gran variedad de especies silvestres comestibles que son recolectados en diferentes ecosistemas, en México existen un gran número de ellas, pero que hasta ahora han sido poco estudiadas y no se les ha dado una mayor relevancia; más que sólo a algunas variedades, como lo es el famoso “huitlacoche”, champiñones y algunas setas, entre los más conocidos para su consumo humano^{1, 2, 3}.



3. OBJETIVOS



Objetivo General:

--Realizar la determinación de macronutrientes, inulina e inhibidores de tripsina en algunas variedades de hongos silvestres consumidos en algunas zonas de México, y compararlos con algunas de las variedades más comercializadas en nuestro país.

Objetivos Particulares:

--Determinar la composición nutricia de algunas variedades de hongos silvestres consumidos en algunas zonas rurales del país (Sierra Tarahumara, Ozumba Estado de México), sustituyendo en el análisis proximal la fibra cruda por fibra dietética, debido a que da mayor información alimenticia.

-- Determinar la composición nutricia de hongos comúnmente comercializados en México.

--Determinar la actividad inhibitoria hacia la tripsina (proteasa) en los hongos, como un factor antinutricional.

--Realizar una determinación cualitativa del contenido de inulina en las especies e hongos estudiados.



4.1 Características generales de los hongos

Los hongos en general, forman parte de uno de los reinos más diversos en la naturaleza, en donde juegan un papel ecológico fundamental a través de la relación simbiótica (micorriza) que forman con los árboles. Entre sus principales funciones ecológicas y fisiológicas de estos organismos unicelulares destacan las siguientes:

- Intervienen en los ciclos y transferencia de nutrimentos, al participar de manera activa en la regulación de la tasa fotosintética a través del crecimiento de sus hifas que modifican la permeabilidad y estructura del suelo.

- Representan una fuente de alimento para algunos vertebrados (incluyendo mamíferos) e invertebrados.

- Son hábitat de invertebrados, algas y otros hongos.

- Establecen asociaciones mutualistas con plantas, termitas, hormigas y con algunas especies de algas.

- Actúan biodegradando y reciclando la materia orgánica (principalmente lignina y celulosa) en los ecosistemas ⁴.

El ciclo de vida de estos organismos está conformado por una fase vegetativa (micelio) y otra reproductora (cuerpo fructífero); presentan gran variedad de

colores, desde el blanco hasta tonalidades negras, pasando una inmensa gama de tonos intermedios. La textura que presentan va desde suave y aterciopelado hasta viscoso-gelatinoso. De un tamaño visible únicamente a nivel microscópico hasta ejemplares de 20 a 30 cm. de altura. La forma de sus cuerpos fructíferos es variable y pueden encontrarse hongos desde forma esférica hasta la forma típica de las setas.

4.2 Los hongos silvestres comestibles son Productos Forestales no Maderables (PFNM)

Los PFNM son bienes de origen biológico, distintos de la madera, derivados del bosque, de otras áreas forestales y de los árboles fuera de los bosques. Los PFNM pueden recolectarse en forma silvestre o producirse en plantaciones forestales o sistemas agroforestales. Ejemplos de PFNM son productos utilizados como alimentos y aditivos alimentarios (semillas comestibles, **hongos**, frutos, fibras, especias y condimentos), aromatizantes, fauna silvestre, resinas, gomas, productos vegetales y animales utilizados con fines medicinales, cosméticos o culturales. Según la FAO actualmente existen al menos 150 PFNM que tienen importancia en el comercio internacional, entre ellos la miel, el bambú, las nueces, **los hongos**, el corcho, las resinas y los aceites esenciales.

Dentro de esta gama de productos, los hongos silvestres comestibles son uno de los grupos más importantes. Su recolección se lleva a cabo en más de 80 países; como alimento son un complemento nutricional en las dietas de las poblaciones pobres, principalmente rurales e indígenas y debido a su creciente demanda por

parte de países industrializados como Estados Unidos, Europa y Japón, su comercialización representa para los países en desarrollo una alternativa para generar empleos y mejorar su economía, principalmente durante una época del año en la cual las mujeres los recolectan.

Debido a la variedad de climas con que cuenta nuestro país, los hongos silvestres comestibles existen desde las selvas tropicales del sureste hasta los desiertos del norte, pasando por los bosques subtropicales y los de coníferas de montañas; desafortunadamente la abundancia de este recurso contrasta con los pocos estudios que se han realizado.

Se estima que en el mundo existen 1.5 millones de especies de hongos, las estimaciones para México indican la cifra de 200 mil especies, de las cuales se tiene el registro de alrededor de 3.5%, las que en su mayoría crecen en los bosques de coníferas, en los tropicales y en el mesófilo de montaña. Por ello México es considerado, como uno de los países más importantes por el uso y recolección de este producto para las poblaciones rurales ⁵.

4.3 Los hongos como factor cultural en México

En México el consumo de hongos silvestres comestibles forma parte del acervo cultural de la población rural; su conocimiento y uso fue muy importante en las culturas prehispánicas, ya que esta tradición etnomicológica se ha practicado desde tiempos prehispánicos, sobre todo en las culturas mesoamericanas. Este recurso tiene diversos valores entre los más importantes están: el alimenticio,

ecológico, médico-religioso y económico. En la actualidad la población indígena y mestiza que habita en los bosques de zonas templadas y frías tienen un amplio conocimiento de las especies de hongos comestibles.

El saber tradicional sobre los hongos comestibles también se manifiesta en el gran número de nombres comunes que diversos autores han registrado, que han sido propiciados en diversos lugares de nuestro país, el cual supera los 400, mismos que corresponden a cerca de 200 especies, alrededor del 46% de estas especies son micorrizógenas, lo que dificulta su cultivo y la única forma de aprovecharlas es durante la época de lluvias en donde se lleva a cabo su recolección. Su distribución geográfica en el ámbito nacional comprende a 28 entidades federativas⁶.

4.4 Variedades de hongos comestibles con mayor demanda en México.

En cuanto a la producción, en México se cultivan con fines comerciales tres especies de hongos: ***Agaricus bisporus*** (champiñón), ***Pleurotus ostreatus*** (setas) y ***Tricholoma magnivelare*** (hongo blanco). Las primeras dos son especies que se cultivan en nuestro país desde hace ya bastante tiempo y con muy buen éxito (40 y 70 años respectivamente). A pesar de ello existen diversas especies de hongos comestibles silvestres con valor comercial entre los que destacan: el ***Tricholoma magnivelare*** (hongo blanco), ***Morchella spp.*** (morillas), ***Boletus edulis*** (panza), ***Boletus pinicola*** (masayel), ***Boletus aestivalis*** (cema) y (***Cantharellus cibarius*** (duraznito).

Es importante señalar que de estas especies, el hongo blanco es el que alcanza un mejor precio, incluso se encuentra entre los ocho principales productos forestales no maderables con mayor derrama económica en nuestro país.

Los nombres que reciben los hongos silvestres en México son muy curiosos. En el ámbito nacional, los hongos silvestres comestibles con más demanda y buscados son: ***Amanita caesarea*** (yema, tecomate, amarillo), ***A. rubescens*** (mantecado), ***Lactarius deliciosus*** (enchilado), ***L. indigo*** (azul), ***Morchella spp.*** (elotito, mazorquita, colmena, chipotle), ***Boletus edulis*** (pambazo, panadero, cema), ***Boletus erithropus y Boletus luridus*** (galambo, hongorado), ***Suillus spp.*** (panzas de encino, pancita), ***Cantharellus cibarius*** (duraznito), ***Gomphus floccosus*** (corneta, corneta de oyamel), ***Lyophyllum descastes*** (clavitos, xolete), ***Ramaria flava y Ramaria spp.*** (patitas de pájaro, escobetas), ***Clitocybe infundibuliformis*** (enchilados), ***Helvella sp*** (gachupines), y muchos otros más, sin olvidar al huitlacoche (***Ustilago maydis***).

Además de que son fuente de vitaminas y minerales, algunos aportan cantidades considerables de calcio, fósforo, hierro, sodio, potasio y carbohidratos además de que proveen de un valor nutritivo igual al de algunos alimentos ricos en proteínas y fibras ^{7, 8,9}.

4.5 Fibra dietética

Con el nombre de fibra dietética se agrupa a una mezcla heterogénea de componentes de origen vegetal resistentes a las enzimas del tracto gastrointestinal del hombre. Comprende ciertos hidratos de carbono, entre los cuales se puede mencionar: la celulosa, la hemicelulosa, las pectinas, las gomas y mucílagos, como igualmente la lignina, siendo parte importante de las frutas, hortalizas, cereales y leguminosas, aunque no es un hidrato de carbono.

A continuación se enlistan los componentes más importantes y se describen algunas de sus características:

Celulosa. Es un polisacárido formado por residuos de β -glucopiranosil unidos por enlaces β 1-4. Es el componente más abundante de las paredes de las células vegetales donde se encuentra asociado con la hemicelulosa y la pectina.

Hemicelulosa. Con este nombre se agrupa a una serie de moléculas formadas por polímeros de hexosas y/o pentosas, las cuales se hallan íntimamente asociadas a la celulosa. Entre los más conocidos se encuentran los polímeros llamados xiloglucanas, arabinogalactanas y ramnogalacturonanas cuyos monosacáridos principales son: xilosa y glucosa, arabinosa y galactosa y en el último caso ramnosa y ácido galacturónico. Se les encuentra en cereales integrales y verduras en general.

Pectinas. Son hidratos de carbono complejos formados por unidades repetidas de ácido galacturónico. Las pectinas se encuentran en las paredes celulares y la porción carnosa de la fruta, verduras y plantas comestibles.

Lignina. Es el principal componente no hidrato de carbono de la pared celular de las plantas. Es el polímero natural más complejo en relación a su estructura y heterogeneidad, por esta razón no es posible describir una estructura definida de la lignina; sin embargo, se han propuesto numerosos modelos que representan su estructura y se sabe que es un polímero aromático ligado a la celulosa vegetal, su composición elemental varía entre 61-65% de carbono, 5-6.2% de hidrógeno y el resto lo conforma el oxígeno; no se digiere ni se absorbe y tampoco es atacada por la microflora del colon ¹⁰.

4.6 Fibra dietética soluble y fibra dietética insoluble

Fibra dietética soluble

La fibra dietética soluble se encuentra en altas concentraciones en frutas y algas marinas; y básicamente se compone de pectinas, gomas, mucílago y polisacáridos solubles; componentes más efectivos en reducir las concentraciones de colesterol plasmático y/o hepático y la glicemia, aumentando la velocidad de absorción de glucosa desde el intestino delgado.

Fibra dietética insoluble

La fibra dietética insoluble presente en los alimentos, se encuentra en verduras, cereales, leguminosas y en frutas; incluye celulosa, lignina y hemicelulosa, componentes responsables de la regulación gastrointestinal con la reducción del tiempo de tránsito de los alimentos y el aumento de la masa fecal ¹⁰.

4.7 Acciones fisiológicas de la fibra dietética

- Retrasa la sensación de hambre, ya que retrasa el vaciado gástrico; la fibra no soluble no produce calorías, ocupando espacio en el estómago y saciando el hambre.
- Produce control de la diabetes, el fenómeno se relaciona con que la fibra dietética soluble recubre las vellosidades del intestino y retrasa la absorción de hidratos de carbono.
- Reduce los niveles de colesterol en la sangre, la fibra absorbe los ácidos biliares, que saca fuera del organismo, obligando al hígado a sintetizar más ácidos biliares a partir del colesterol, bajando así los niveles de este.
- Restaura la flora intestinal, ya que el metabolismo de los fructosanos se hace a través de bifidobacterias, microorganismos que proliferan sólo en presencia de estos hidratos de carbono, y que producen ácidos grasos de bajo peso molecular como ácido láctico, propiónico y butírico, que disminuyen el pH y reducen el riesgo de proliferación de bacterias patógenas.
- La fibra insoluble atrapa agua y aumenta la materia fecal, disminuyendo la incidencia de aparición de cáncer de colon ¹⁰.

4.8 Inhibidores de Tripsina

Los inhibidores de tripsina son uno de los factores antinutrimientales que disminuyen la calidad de las proteínas de origen vegetal. Cuando la concentración de los inhibidores de tripsina sobrepasa las 10 U.T.I. / mg de muestra, se considera al alimento como no apto para la alimentación humana, ya que no permiten la adecuada biodisponibilidad de ciertos nutrientes; estos inhibidores son termolábiles, es decir que se destruyen por acción de la temperatura debido a su naturaleza proteica ¹¹.

4.9 Tripsina y su importancia.

La tripsina es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos o aminoácidos de menor tamaño. La tripsina es producida en el páncreas en forma de tripsinogeno (enzima inactiva), y luego es activado en el duodeno por la enteroquinasa intestinal a tripsina (enzima activa), en donde es esencial para la digestión. El pH óptimo de funcionamiento es 8 y la temperatura óptima es 37°C. Es una enzima específica ya que liga al péptido en las posiciones del carboxilo terminal donde hay Arginina (Arg) o Lisina (Lys), ambos aminoácidos con grupos R cargados positivamente, fragmentando al péptido inicial ¹².

4.10 Inulina

Se define como un fructooligosacárido, formada por unidades de D- fructosa y una unidad de glucosa terminal, con un grado de polimerización de 30 a 60 monómeros.

Se encuentra en algunas plantas como achicoria (raíz), las dalias (raíz), cebollas, ajos, espárragos y alcachofas, entre otros muchos, con beneficios similares a los de la fibra dietaria soluble. La inulina no es digerible por las enzimas del cuerpo humano, pero es fermentada en el colon por bifidobacterias; dando lugar a productos de degradación tales como ácidos grasos de cadena corta, dióxido de carbono y otros metabolitos ¹³.

4.11 Efectos saludables de la inulina

Los efectos saludables atribuidos a la inulina son debido a su capacidad para modificar la composición de la microflora del colon, motivo por el que se les denomina componentes "prebióticos".

- La inulina es metabolizada selectivamente por las bifidobacterias; esta fermentación selectiva produce un medio ácido debido a la presencia de ácido láctico, propiónico y butírico; estos compuestos inhiben el crecimiento de especies de bacterias patógenas.
- Mejora el tránsito intestinal.
- Contribuyen a reducir el riesgo de cáncer de colon.

- Se asocia a un mejor aprovechamiento por parte del organismo de los minerales calcio y magnesio, los cuales son componentes fundamentales de huesos y dientes ¹³.

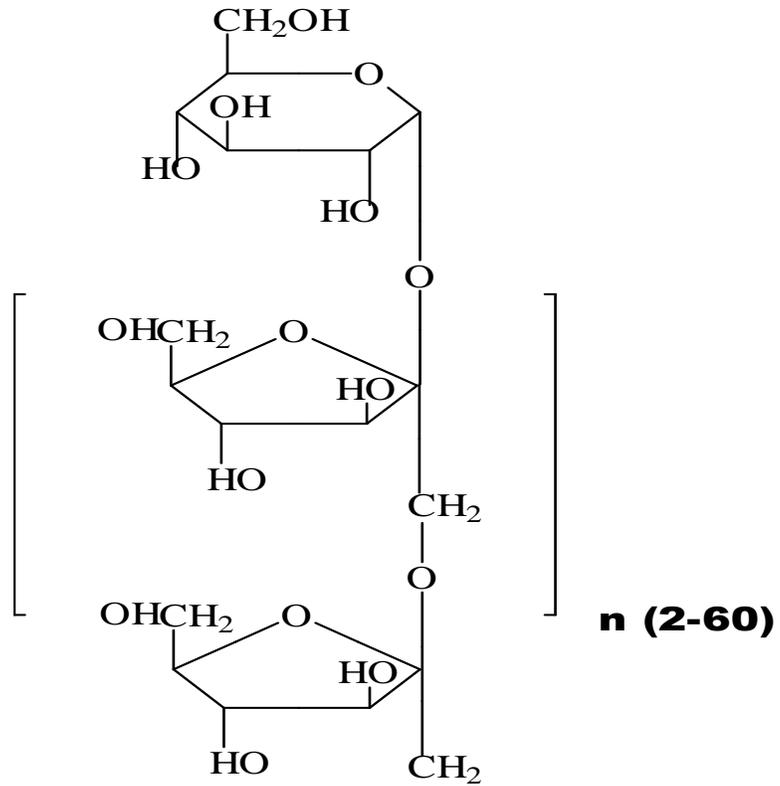
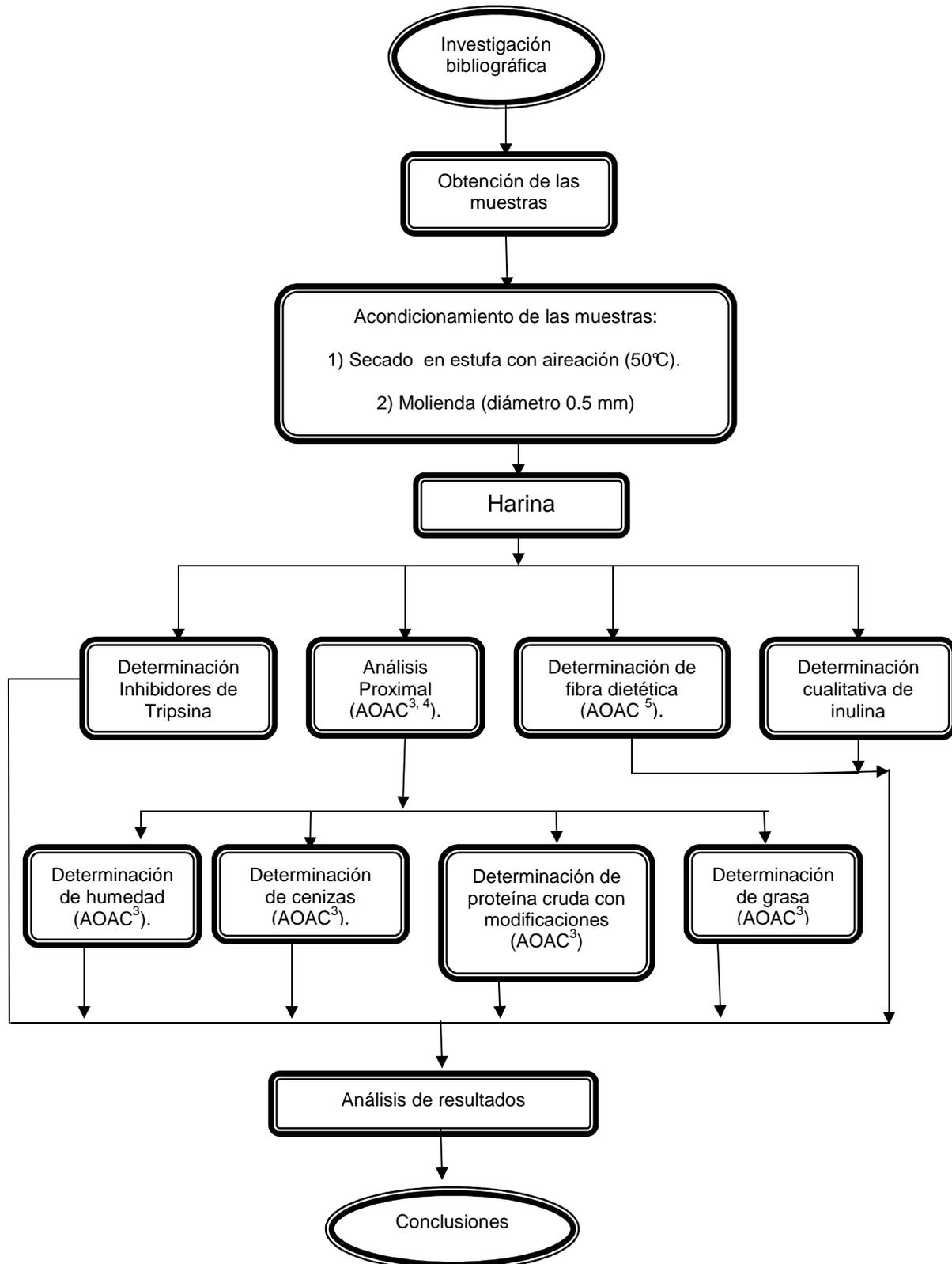


Figura No.1 Estructura química de la inulina



DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



5.1 Muestras

Las muestras estudiadas son hongos comestibles silvestres que fueron recolectados en los alrededores de Ozumba, Toluca (Estado de México) y en la Sierra Tarahumara en Chihuahua. Además de adquirir en la Central de Abastos de la Ciudad de México, especies conocidas y de mayor comercialización.

En la siguiente tabla se muestran cada una de las especies estudiadas.

TABLA NO. 1 HONGOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO	
Hongos silvestres	
Nombre científico, número de colección* y procedencia.	Nombre común
1) <i>Cantharellus cibarius</i> (1912) OEM	hongos duraznito
2) <i>Amanita caesaria</i> (35172) STC	hongos morochike
3) <i>Amanita rubescens</i> (35173) STC	hongos sojachis
4) <i>Helvella lacunosa</i> (1922) OEM	gachupines negros
5) <i>Helvella crispa</i> (1923) OEM	gachupines blancos
6) <i>Laccaria spp</i> (1925 y 1926) OEM	xocoyoles
7) <i>Laccaria bicolor</i> (1925) OEM	xocoyoles
8) <i>Lyophyllum descastes</i> TEM	hongos clavito
Hongos comúnmente comercializados	
9) <i>Ustilago maydis</i> CAM	huitlacoche
10) <i>Agaricus bisporus</i> CAM	champiñones
11) <i>Pleurotus sp</i> CAM	setas
12) <i>Lentinus sp</i> CAM	crimini

*Las muestras que presentan número de colección fueron proporcionadas por la M en C Edelmira Linares del

Jardín Botánico de la UNAM. OEM: Ozumba Estado de México, STC: Sierra Tarahumara Chihuahua, TEM:

Toluca Estado de México, CAM: Central de Abastos de la Ciudad de México.



a) Cantharellus cibarius



b) Amanita caesaria



c) Amanita rubescens



d) Helvella lacunosa



e) Helvella crispa



f) Laccaria spp



g) Laccaria bicolor



h) Lyophyllum descastes

Figura No. 2. Hongos silvestres comestibles



a) *Ustilago maydis*



b) *Agaricus bisporus*



c) *Pleurotus sp*



d) *Lentinus sp*

Figura No. 3. Hongos comúnmente comercializados

5.2 Acondicionamiento de las muestras

Debido a que los hongos son alimentos perecederos, se les dio un tratamiento inmediato de deshidratación, se secaron a una temperatura no mayor de 50°C en la estufa con aireación (se apartó una porción de muestra para determinar humedad original, se muestra la técnica en el apartado 5.31).

Material/reactivos

- Estufa con temperatura controlada y aeración Lab-line Imperial 3
- Balanza analítica y/o granataria.
- Molino de acero inoxidable Thomas-While Modelo 4.

Procedimiento

1.- Se colocó la muestra en la estufa a temperatura controlada (50-55°C, era muy importante que no se excediera esta temperatura, debido a que los inhibidores de tripsina son termolábiles) y una adecuada aeración para que se evaporara la mayor cantidad de agua posible.

3.- Una vez seca las muestras se molieron en un molino de acero inoxidable, por una malla de 0.5 mm; se obtuvo una harina la cual se homogeneizó y se almacenó en recipientes de plástico a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco.

5.3 ANÁLISIS PROXIMAL

5.31 Determinación de Humedad AOAC (1990) ¹⁴

Fundamento:

Eliminar el agua contenida en la muestra, mediante una estufa conectada a vacío a 60-65°C (se encuentra a vacío con el fin de abatir la temperatura de ebullición del agua).

Material/Reactivos

- Estufa de vacío LAB-LINE mod. 3620
- Balanza analítica
- Desecador
- Charolas de aluminio
- Estufa con corriente forzada LAB-LINE, mod. IMPERIAL III

Procedimiento

- 1.- Se hizo llegar a peso constante charolas de aluminio en la estufa
- 2.- Se adicionó la muestra (entre 2-5 g), tratando de que se presente la mayor superficie de evaporación.
- 3.- Se introdujeron las charolas en una estufa conectada al vacío y con una temperatura de secado de 60-65°C.
- 4.- Se realizaron pesadas de las charolas y registraron los datos obtenidos.

Nota: Todas las pesadas que se efectuaron se hicieron inmediatamente después de que fueron sacadas del desecador y se consideró a peso constante cuando se pesó en la balanza analítica y sólo presentaron variación en la cuarta cifra decimal.

Los cálculos se presentan en el Anexo 10.1

5.32 Determinación de Cenizas AOAC (1990)¹⁴.

Fundamento

El término de cenizas en un alimento, se refiere al material inorgánico y es un parámetro importante ya que este material es constante. Se carboniza la materia orgánica directamente con flama de mechero, para convertirse en CO₂ y vapor de agua, con una subsiguiente incineración en mufla.

Material/Reactivos

- Mufla THERMOLYNE, mod. 1500
- Balanza analítica
- Mechero Bunsen
- Triángulo de porcelana
- Anillo de fierro o tripié
- Crisoles de porcelana
- Desecador

Procedimiento

- 1.-Se hizo llegar a peso constante crisoles en la mufla a una temperatura de 550°C.
- 2.- Se colocaron entre 2 y 3 gramos de muestra en el crisol, se carbonizaron a la flama de un mechero y bajo una campana de extracción.
- 3.- Se introdujeron a la mufla (cuando ya no desprendieron humo), la cual se encontraba entre 500-550°C.
- 4.- Se realizaron pesadas de los crisoles hasta que su peso fue constante.

Nota: El tiempo de permanencia de la muestra en la mufla fue muy variable y dependió de la muestra.

Los cálculos se presentan en el Anexo 10.2

5.33 Determinación de Proteína cruda AOAC (1990) con modificaciones¹⁴.

Fundamento

El método más utilizado en la determinación de nitrógeno en los alimentos es el Kjeldahl, al cual se le han aplicado varias modificaciones con el fin de reducir el tiempo de análisis y mejorar su exactitud. El proceso consta de tres pasos:

1) Digestión: Es la oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico y la liberación del nitrógeno como sulfato de amonio

2) Destilación del nitrógeno amoniacal

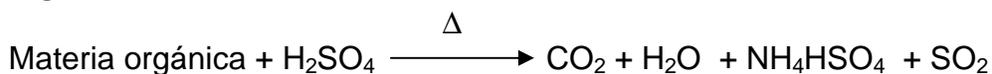
Es la liberación del nitrógeno como amoníaco por la acción de un álcali fuerte y la destilación de este.

3) Titulación del nitrógeno amoniacal con un ácido.

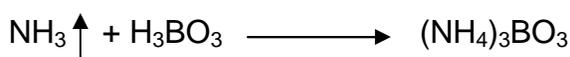
El amoníaco liberado se titula con un ácido valorado previamente.

Los tres pasos anteriores se describen con las siguientes reacciones químicas:

Digestión:



Destilación:



Titulación:



La digestión de la muestra para formar sulfato de amonio es la parte más difícil del método ya que se puede presentar la formación incompleta de amoníaco o en caso contrario, la pérdida de nitrógeno por una digestión exagerada. Con respecto al catalizador ha resultado mejor hasta el momento, la combinación de 2 o más catalizadores. Las sales de sulfato de sodio o potasio sirven para elevar la temperatura de digestión, sin embargo se debe cuidar la relación sal – ácido para evitar la pérdida de amoníaco. Con lo que respecta al uso de agentes oxidantes, se debe mencionar que también se puede presentar la pérdida de amoníaco, y al parecer el H_2O_2 es el único que evita este problema.

Material/Reactivos

- Digestor TECATOR, mod. Ab-20/40
- Dispositivo de destilación Kjeltec1030 - Tubos de digestión TECATOR de 100 mL
- Mezcla Digestiva (A)
- H_2O_2 al 30%
- K_2SO_4 (R.A)
- Solución de NaOH al 40%
- Solución de ácido bórico con indicadores (B)
- Solución de HCl 0.01N valorada

(A) Mezcla digestiva: Se disolvieron 3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de H_2O destilada; cuando se disolvió la sal se agregaron 50 mL de H_3PO_4 , y a

continuación se adicionaron con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 mL de H_2SO_4 concentrado, se agitó por 30 minutos.

(B) Se pesaron 10g de ácido bórico y se colocaron en un matraz aforado de 1 L; se adicionó agua hasta disolverlo (aproximadamente 700 mL) y a continuación se agregaron 10 mL de indicador verde de Bromocresol (100 mg de indicador en 100 de metanol) y 7 mL de rojo de metilo (100 mg de indicador en 100 mL de metanol), se aforó a 1L con agua destilada y se ajustó el color a un tono rojizo grisáceo con ácido o álcali según se requiera.

Procedimiento

- 1.- Se pesaron 80 mg de muestra y colocaron en tubos de digestión.
- 2.-Se agregaron aproximadamente 0.5g de K_2SO_4 y 3 mL de mezcla de digestión.
- 3.- Se colocaron los tubos en el digestor a 370°C por espacio de 15 minutos, transcurrido este tiempo, se sacó del digestor se dejó enfriar, para adicionar 1.5 mL de H_2O_2 al 30%.
- 4.- Se colocaron nuevamente en el digestor que se encontraba a 370°C , hasta que se llevó acabo por completo la digestión.*NOTA
- 5.- Una vez efectuada la digestión se dejó enfriar y se procedió a la destilación en el equipo Kjeltec.

Para realizar los cálculos fue indispensable correr un blanco, en donde se sustituyó la muestra por el equivalente en peso de dextrosa, la cual se trabajó de la misma manera que los tubos con muestra.

Los cálculos se presentan en el Anexo 10.3

***Nota:** Se consideró que la digestión fue completa cuando el tubo no mostró manchas y/o puntos negros, además la mezcla de digestión fue translúcida.

5.34 Determinación de Grasa AOAC (1990)¹⁴.

Fundamento

La determinación de extracto etéreo, incluye una gran variedad de compuestos orgánicos, que son extraídos con éter de petróleo por ser un disolvente con bajo punto de ebullición (30-60°C), el material al igual que la muestra deben estar libres de agua o alcohol, ya que el éter húmedo disuelve hidratos de carbono.

Material/Reactivos

Aparato de extracción Goldfish, LABCONCO

-Cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm

-Estufa de vacío LAB-LINE, mod. 3620

-Vasos de borde esmerilado LABCONCO

-Balanza analítica

-Éter de petróleo

Es importante que la muestra se encontrara completamente seca, por lo cual se utilizó la muestra a la cual se le determinó humedad.

Procedimiento

- 1.- Se hicieron llegar a peso constante los vasos de borde esmerilado.
- 2.- Se colocó dentro de un cartucho de celulosa, cuantitativamente la muestra que se encontraba en las charolas de aluminio (2-5 gramos de la determinación de humedad) y se taparon con algodón.
- 3.- Se colocó el cartucho de celulosa en el portadedal y este a su vez en el seguro metálico del aparato.
- 4.- Se adicionaron 50 mL de disolvente (éter de petróleo) en el vaso de borde esmerilado, y se colocó en el aparato, con la ayuda del anillo metálico con rosca.
- 5.- Se subió la parrilla del aparato para el calentamiento, hasta que estuvo en contacto con el vaso, se abrió la llave de agua para que circulara esta sobre el refrigerante. Una vez que transcurrió el tiempo de extracción, se bajaron las parrillas de calentamiento, se quitó el anillo de rosca y se sacó el portadedal con el cartucho, este se sustituyó por un tubo recuperador, se volvió a colocar el vaso para calentar nuevamente con el fin de recuperar el disolvente. Una vez que el vaso estuvo libre de disolvente, se colocó en una estufa de vacío para que se evaporara el exceso de disolvente y se obtuvo únicamente el peso de la fracción lipídica.

Los cálculos se presentan en el Anexo 10.4

5.35 Determinación de Fibra Dietética AOAC (1995)¹⁴.

Fundamento

En esta determinación se mide el contenido de fibra dietética de los alimentos, usando una combinación de procesos enzimáticos y gravimétricos. Las muestras de alimentos secas y libres de grasa son gelatinizadas con α -amilasa, estable al calor, posteriormente digeridas enzimáticamente con proteasa y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y almidón presente en la muestra. Para precipitar la fibra dietética soluble se adiciona etanol. Los residuos obtenidos son filtrados y lavados con etanol y acetona. Después de secarlos, los residuos se pesan. En la mitad de las muestras se mide la proteína y las otras son calcinadas a cenizas para corregir el peso del residuo. La fibra dietética se obtiene restando al peso del residuo, el peso de la proteína y el de las cenizas.

Material/Reactivos

Reactivos

1. Kit Total Dietary Fiber Assay (SIGMA TDF-100A). Este equipo contiene reactivos para realizar 200 determinaciones. Conservar en refrigeración
 - α - Amilasa, estable al calor (10ml); (Sigma A 3306)
 - Proteasa de *Bacillus licheniformis* (500mg); (Sigma P 3910)
 - Amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (10ml); (Sigma A 9913)
 - Celita TM, lavada con ácido (50g); (Sigma C 8656).

2. Kit Total Dietary Fiber Assay Control (SIGMA TDF-C10). Cada frasco contiene reactivos para aproximadamente 10 análisis. Conservar en refrigeración.

- Arabinogalactana (1g); (Sigma A 9788)
- Caseína (5g); (Sigma 7906)
- β -Glucano (1g); (Sigma G 7391)
- Pectina (1g); (Sigma P 7536)
- Almidón de maíz (10g); (Sigma S 2388)
- Almidón de trigo (10g); (Sigma S 1514)

3. Éter de Petróleo, reactivo analítico.

4. Alcohol etílico, reactivo analítico.

5. Acetona, reactivo analítico.

6. Fosfato de sodio dibásico anhidro, reactivo analítico.

7. Fosfato de sodio monobásico anhidro reactivo analítico.

8. Hidróxido de sodio, 1.0N

9. Ácido clorhídrico, 1.0N

Material y equipo

1. Crisol Gooch: Porosidad # 2 (grueso 40-60 micrones)
2. Fuente de vacío. Con trampa para prevenir la contaminación en caso de que se pase liquido
3. Estufa a 105 °C o una estufa con vacío a 70 °C
4. Desecador
5. Mufla

6. Baño de agua hirviendo
7. Baño de agua con agitación y temperatura controlada (60°C).
8. Vasos de precipitados: de 100, 400 y 600 mL de forma alta.
9. Balanza analítica
10. Potenciómetro: Calibrado a pH 4.0 y pH 7.0
11. Matraces Kitasato de 1000 mL
12. Alargadera de hule para crisol Gooch
13. Barras magnéticas 22x8 mm
14. Pipeta automática de 50-200 μ L
15. Termómetro (-10 a 110 °C).

Preparación de reactivos

Se usó agua destilada o desionizada para hacer las soluciones.

- a) Etanol al 78%. Se midieron 207 mL de agua en un matraz volumétrico de un litro. Se agregó etanol al 95%. Se mezcló y llevó al volumen con etanol al 95% y se mezcló nuevamente.
- b) Amortiguador de fosfatos, 0.08M, pH 6.0. Se disolvieron 1.4 g de Na_2HPO_4 , anhidro y 8.4 g de NaH_2PO_4 anhidro en aproximadamente 700 mL de agua. Se diluyó sin llevar al aforo con agua. Se verificó el pH y se ajustó con NaOH o H_3PO_4 , se aforó a un litro y se mezcló. Se guardó en frascos bien tapados a temperatura ambiente.
- c) Solución de hidróxido de sodio, 0.275 N. Se diluyeron 275 mL de solución de NaOH 1.0 N a 1 litro con agua en un matraz volumétrico. Se guardó en un frasco bien tapado a temperatura ambiente.

d) Solución de Ácido clorhídrico, 0.325 N. Se diluyeron 325 mL de solución de HCl 1.0 N a 1 litro de agua en un matraz volumétrico. Se guardó en un frasco bien tapado a temperatura ambiente.

Procedimiento

Se usó un blanco a lo largo de todo el procedimiento para que se corrigiera cualquier contribución de los reactivos al residuo. A las muestras y blanco que se les midió el contenido de fibra dietética se les realizó el análisis por cuadruplicado para que se tuvieran duplicados de proteína y cenizas con lo que se mejora la exactitud.

Preparación de los crisoles

Se lavaron los crisoles, se secaron y se calentaron una hora a 450 °C; se enfriaron; posteriormente se remojaron y enjuagaron con agua; finalmente se secaron. Se les agregó 0.5 g de Celita a cada crisol y se secaron a 130°C hasta peso constante. Se enfriaron en el desecador y pesaron hasta tener 0.1 mg de diferencia. Se registró este peso como “Celita + Peso del crisol o P_1 ”. Se conservaron en el desecador hasta que se utilizaron.

Preparación de la muestra

Debido a que el contenido de grasa en las muestras fue menor al 10%, no fue necesario desengrasar y se trabajó directamente con ellas.

Determinación de fibra dietética

Hidrólisis enzimática

- 1.-Se pesaron por cuadruplicado muestras de 0.5 g de cada muestra que se analizó y se le colocó en vasos de precipitado de 100 mL de forma alta. Los pesos de las muestras no tuvieron una diferencia mayor de 20 mg. Se registraron los pesos.
- 2.-Se agregó, a cada vaso, 25 mL de amortiguador de fosfatos pH 6.0, 0.05 mL de α -amilasa estable al calor (Sigma A 3306) y se mezcló muy bien. Se cubrió cada vaso con papel aluminio y puso en un baño de agua hirviendo. Se agitaron suavemente los vasos a intervalos de 5 minutos. Se incubaron por 15 minutos después de que la temperatura dentro de los vasos alcanzó 95 °C.
- 3.-Se dejaron enfriar las soluciones a temperatura ambiente y ajustó el pH de las soluciones a 7.5 ± 0.2 agregando 5 mL de solución de hidróxido de sodio 0.275N a cada vaso. Se verificó el pH y se ajustó en cada caso que fue necesario, ya sea con NaOH o HCl.
- 4.-Se preparó una solución de proteasa (Sigma P3910) de 25 mg/mL en amortiguador de fosfatos pH 6.0, inmediatamente antes de que se utilizara. Se pipetearon 0.1 mL (2.5 mg de proteasa) dentro de cada vaso.
- 5.- Se cubrió cada vaso con papel aluminio y pusieron en un baño de agua con agitación continua a 60 °C, se incubaron por 30 minutos después de que la temperatura en las soluciones alcanzó 60 °C.

6.-Se enfriaron las soluciones a temperatura ambiente. Se ajustó el pH de las soluciones a un pH de 4.0-4.6 agregando 5 mL de HCl 0.325 N a cada vaso. Se verificó el pH y se ajustó con NaOH o HCl, según fue el caso de cada muestra.

7.-Se agregaron 0.05 mL de amilogucosidasa (Sigma A9913) a cada vaso. Se cubrió cada vaso con papel aluminio y pusieron en un baño de agua con agitación continua a 60 °C, se incubaron por 30 minutos después de que la temperatura en las soluciones alcanzó los 60 °C.

8.-Se transvaso el contenido del vaso a un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 125 mL de etanol al 95% a cada vaso. Se dejó la solución durante toda la noche a temperatura ambiente para que se precipitara completamente la fibra dietética soluble.

Filtración

1.-Se montó un sistema de filtración al vacío para cada crisol Gooch. Se humedeció y redistribuyó la cama de celita en cada crisol usando etanol al 78%. Se aplicó succión suave para que se atrajera la celita al filtro y se formó una superficie lisa. Se mantuvo la succión suave y se dejó pasar cuantitativamente el precipitado y la suspensión de cada uno de los vasos a sus respectivos crisoles.

2.-Se lavó el residuo con tres porciones de 10 mL de etanol al 78 %, dos porciones de 5 mL de etanol al 95% y dos porciones de 5 mL de acetona.

El tiempo para que se filtrara y lavara cada muestra fue variable desde 30 minutos hasta 2 horas por crisol, en promedio se necesitaron aproximadamente 50 minutos por crisol.

3.-Se secaron durante la noche los crisoles que contenían los residuos en una estufa con aeración y temperatura controlada (105°C).

4.-Se enfriaron todos los crisoles en un desecador, y se pesaron hasta que la cuarta cifra decimal (0.1 mg) no varió, y se registraron estos pesos como “residuo+celita + peso del crisol” o **P₂**.

Determinación de Proteína

1.-Con ayuda de una espátula se obtuvo el residuo + celita de cada crisol (por duplicado), se pesó y se molió en un mortero; de este polvo se pesaron 100 mg por duplicado al cual se le realizó la determinación de proteína. Con este dato, se calculó el contenido de proteína en el residuo de cada crisol.

2.-Se analizaron en los duplicados de los residuos de las muestras y blancos el contenido de proteína por el método de Kjeldahl, como se especifica en el procedimiento del AOAC⁴.

Determinación de cenizas

1.-De los dos crisoles restantes de las muestras y de los blancos se calcinó el residuo a 450 °C hasta peso constante, y se registró este peso como “cenizas+ celita+peso del crisol o **P₃**.”

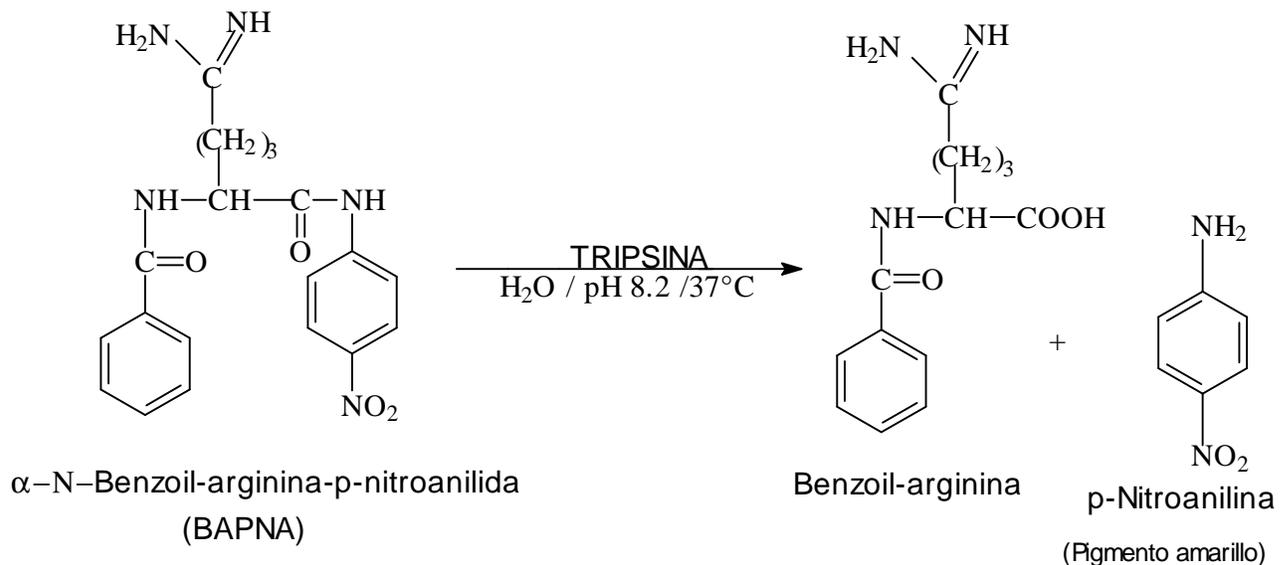
Los cálculos se presentan en el Anexo 10.5

5.36 Determinación Inhibidores de Tripsina ¹⁴.

Fundamento

La técnica es la utilizada por Kakade y colaboradores, la cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto directo o diluido hace contacto con una solución estandarizada de tripsina, y que después de un cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual producirá una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.



La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I).

Material / Reactivos:

- Potenciómetro CORNING, mod. 10
- Parrilla con agitación magnética THERMOLINE, mod. SP-13025.
- Baño maría GRANT, mod. SE 10.
- Espectrofotómetro COLEMAN, mod. Junior II-A.
- Mezclador de tubos LAB-LINE, mod. Super-mixer.
- NaOH 0.01 N:
- Solución amortiguadora TRIS, pH 8.2 y 0.05 N (a).
- Solución BAPNA (b).
- Ácido acético al 30%.
- Solución estándar de tripsina (c).
- HCl 0.001 N.

(a) Solución amortiguadora TRIS, pH 8.2 y 0.05 N:

Se pesaron 6.05 g de tris (hidroximetil-amino-metano) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 900 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 8.2 y se aforó a un volumen de 1 litro.

(b) Solución BAPNA:

Se pesaron 100 mg de α -N- Benzoil- DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA) se disolvieron en 2.5 mL de dimetil- sulfóxido y se aforó a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C .

ESTA SOLUCIÓN SE PREPARO EL MISMO DIA Y CUANDO SE UTILIZÓ SE MANTUVO A 37°C.

(c) Solución estándar de tripsina:

Se pesaron con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA # T-8253) y se disolvieron en 200 mL de HCl 0.001 N. Esta solución contiene 20 µg de tripsina/mL y se almacenó en refrigeración (donde puede durar de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad)

Procedimiento

A) Preparación del extracto:

Se pesó 1 gramo de muestra finamente molida y desengrasada (< 5% grasa) en un vaso de precipitado y se le adicionaron 45 mL de NaOH 0.01 N, se ajustó el pH de esta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se aforó con agua a 50 mL. A continuación se transvasó a un vaso que contenía un magneto, para agitar la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2 ½ horas a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo se quitó el magneto y se dejó ½ hora en reposo, y por simple decantación se obtuvo el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante de cada muestra se diluyó hasta el punto en que 1 mL produjo una inhibición de 40-60 %; este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

B) Determinación de la actividad (Ver Anexo 9.6):

Porciones de 0.0, 0.6, 1.0., 1.4 y 1.8 mL de extracto directo o diluido fueron pipeteados a tubos de ensayo ^{NOTA} ajustado el volumen a 2.0 mL con agua destilada; se introdujeron al baño maría a 37°C. Se adicionaron 2.0 mL de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37°C) y se mantuvieron en contacto inhibidor-tripsina por espacio de 10 minutos.

A continuación se adicionaron 5 mL de solución de BAPNA (a 37°C) a cada tubo y se mantuvo dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos (con cronómetro). La reacción enzimática se detuvo por la adición de 1 mL de ácido acético al 30%; el cual se homogeneizó inmediatamente.

En los casos en donde los tubos se enturbiaron y/o formaron un precipitado, fue necesario filtrar el contenido a través de papel filtro (Whatman #1), cerciorándose que el filtrado este transparente.

Nota: Cuando se trabaja con el extracto directo, es común que se arrastren coloraciones indeseables que pueden interferir en la determinación; por lo que fue conveniente tomar una alícuota más de cada una de las porciones, las cuales sirvieron como sus respectivos blancos. A estos tubos, una vez que se les adicionó el 1 mL de solución de tripsina, inmediatamente después se les adicionó 1.0 mL de ácido acético al 30% y por último los 5.0 mL de solución de BAPNA, en estos tubos no se llevó control de tiempo.

Los cálculos se presentan en el Anexo 10.6

5.37 Determinación cualitativa de Inulina ^{15,16}.

Fundamento

Se realiza una extracción acuosa de la inulina en un baño de agua con agitación y temperatura controlada (80°C) durante 20 minutos. Se analiza el extracto por medio de un equipo de HPLC con ayuda de una columna de exclusión molecular y se observa que la inulina tiene un tiempo de retención de 6.3 minutos.

Material/Reactivos

- Baño maría con agitación Lab-line mod. 29391.
- Centrífuga Ependorff mod. 5702
- Viales Agilent de 12 x 32mm
- Membranas de Nylon Non-Sterile 13 mm Millex[®] Syringe Filter Unit.
- Columna Shodex modelo SP0810, 8.0mm ID x 300 mmL.
- Detector de Índice de Refracción marca Waters mod. 2410
- Equipo de Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) marca waters mod. 2695
- Acetonitrilo grado HPLC
- Fase móvil agua: acetonitrilo (95-5) (a)
- Solución estándar de Inulina de achicoria (SIGMA 2326843) (b)

(a) Fase móvil agua: acetonitrilo (95:5)

Para preparar 1 L de fase móvil se colocaron 50 mL de acetonitrilo grado HPLC, en un matraz aforado de 1L, y se aforó con agua grado HPLC.

(b) Solución estándar de Inulina

Se pesaron con mucho cuidado 25 mg de inulina de achicoria, se disolvieron en agua desionizada y se aforaron a 5 mL, esta solución contiene 5 mg de inulina / mL de solución, se almacenó en refrigeración.

Procedimiento

A) Preparación del extracto:

1.-Se pesaron 1.5 gramos de muestra finamente molida en un vaso de precipitados de 100 mL, los pesos de la muestra no tuvieron una diferencia mayor de 20 mg.

2.- Se agregó a cada vaso, 20 mL de agua desionizada. Se cubrió cada vaso con papel aluminio y colocaron en un baño de agua a 80°C. Se incubaron por 20 minutos después de que la temperatura dentro del vaso alcanzó dicha temperatura.

3.- Inmediatamente se aforaron en matraces de 25 mL.

4.-Se colocaron en tubos para centrífuga de 25 mL y se centrifugaron por 15 minutos a 4000 r. p .m., se decantó, el sobrenadante y se guardó en frascos de plástico de 25 mL.

5.- Se purificaron la muestra, pasando 2 mL del sobrenadante por membranas de Nylon Non-Sterile 13 mm Millex[®] Syringe Filter Unit, eliminando las 3 primeras gotas, y colocando el resto en viales (las muestras fueron purificadas el mismo día en que se inyectaron).

6.- Se procedió a encender el equipo de HPLC, el detector de IR y se acondicionó la columna Shodex, a 65°C y un flujo de 0.7 mL/ minuto, la temperatura de la muestra permaneció a 30°C.

7.- Se inyectaron primeramente la solución estándar de inulina de achicoria (SIGMA 2326843), por quintuplicado, y posteriormente se inyectaron las muestras purificadas por triplicado.

8.- Se obtuvieron los cromatogramas de las muestras y se interpretaron cualitativamente la presencia de inulina. Los cromatogramas de la solución estándar de inulina de achicoria y de las muestras que presentaron este fructooligosacárido, se muestran en las figuras No. 4, 5,6 y 7.



6. RESULTADOS



Las Tablas No. 2 y 3 muestran los resultados obtenidos en base húmeda (BH) y base seca (BS) de las diferentes variedades de hongos estudiados, tanto los silvestres, como los más comercializados.

Tabla No. 2 Análisis proximal y fibra dietética de las diferentes especies de hongos^a en BH

Nutrimento ^b	Cc	Ac	Ar	HI	Hc	Lspp.	Lb	Ld	Um	Ab	Psp.	Lsp.
Humedad	91.80±0.02	88.22±0.00	93.88±0.12	86.64±0.23	86.70±0.14	92.42±0.03	90.47±0.17	95.52±0.06	92.64±0.32	91.75±0.14	74.50±0.14	92.12±0.12
Proteína	3.36±0.00	3.39±0.03	1.46±0.00	3.23±0.04	3.07±0.03	1.71±0.08	2.21±0.06	2.27±0.02	1.00±0.02	2.53±0.01	5.62±0.01	2.69±0.01
Cenizas	0.74±0.02	1.60±0.05	0.58±0.00	1.25±0.05	1.29±0.08	0.65±0.04	0.95±0.08	0.44±0.04	0.45±0.04	0.83±0.03	1.82±0.02	0.70±0.08
Grasa	0.12±0.01	1.13±0.05	0.76±0.05	0.61±0.05	0.35±0.04	0.30±0.04	0.32±0.04	0.12±0.00	0.090±0.07	0.14±0.00	0.34±0.01	0.11±0.00
Hidratos de carbono^c	2.40	2.39	1.99	2.41	2.84	1.92	2.66	0.84	3.35	3.51	6.83	3.20
Fibra dietética	1.58±0.01	3.27±0.08	1.33±0.04	5.86±0.01	5.75±0.01	3.00±0.06	3.39±0.09	0.81±0.05	2.47±0.02	1.24±0.50	10.89±0.03	1.18±0.06

^a Cc = *Cantharellus cibarius*; Ac = *Amanita caesaria*; AR = *Amanita rubescens*; HI = *Helvella lacunosa*; Hc = *Helvella crispa*; Lspp. = *Laccaria* spp.; Lb = *Laccaria bicolor*; Ld = *Lyophyllum descastes*; Um = *Ustilago maydis*; Ab = *Agaricus bisporus*; Psp. = *Pleurotus* sp; Lsp. = *Lentinus* sp

^b Expresado en g de nutrimento/100 g de muestra (%); Los valores se expresan como valor promedio ± desviación estándar, n =3 (CV≤5%)

^c Calculados por diferencia.

En la tabla se observa claramente que los hongos son alimentos cuyo componente principal es el agua, y a pesar de ello presentan cantidades importantes de macronutrientes siendo las proteínas y los hidratos de carbono los de mayor relevancia.

Tabla No. 3 Análisis proximal y fibra dietética de las diferentes especies de hongos ^a en BS

Nutrimento ^b	Cc	Ac	Ar	HI	Hc	Lspp.	Lb	Ld	Um	Ab	Psp.	Lsp.
Proteína	40.97±0.03	28.79±0.22	23.77±0.1	24.21±0.29	23.13±0.21	22.57±0.60	23.20±0.13	50.75±0.04	13.72±0.09	30.74±0.12	22.06±0.06	39.10±1.05
Genizas	9.09±0.02	13.56±0.04	9.53±0.04	9.34±0.06	9.72±0.05	8.56±0.08	9.97±0.02	9.82±0.06	6.06±0.32	10.06±0.29	7.13±0.14	8.91±0.12
Grasa	1.43±0.02	9.60±0.01	12.42±0.02	4.56±0.02	2.62±0.01	3.93±0.04	3.62±0.00	2.73±0.01	1.22±0.04	1.70±0.02	1.34±0.01	1.38±0.05
Hidratos de carbono ^c	29.21	20.32	32.60	18.06	21.27	25.34	27.58	18.64	45.44	42.42	26.80	35.64
Fibra dietética	19.30±0.15	27.73±0.2	21.68±0.60	43.83±0.92	43.26±1.4	39.60±0.82	35.63±0.94	18.06±0.82	33.56±0.18	15.08±0.53	42.67±1.19	14.97±0.83

^a Cc = *Cantharellus cibarius*; Ac = *Amanita caesaria*; AR = *Amanita rubescens*; HI = *Helvella lacunosa*; Hc = *Helvella crispa*; Lspp. = *Laccaria spp.*;
Lb = *Laccaria bicolor*; Ld = *Lyophyllum descastes*; Um = *Ustilago maydis*; Ab = *Agaricus bisporus*; Psp. = *Pleurotus sp*; Lsp. = *Lentinus sp*

^b Expresado en g de nutrimento/100 g de muestra seca (%); Los valores se expresan como valor promedio ± desviación estándar, n =3 (CV≤5%)

^c Calculados por diferencia

Para realizar una adecuada comparación de los macronutrientes, se presenta la tabla No. 3; la cual muestra los datos obtenidos en base seca, en donde destaca el contenido de grasa ya que es muy poca la cantidad que contienen.

En la Tabla No. 4 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de Inhibidores de Tripsina de las diferentes variedades de hongos estudiados, también se muestra el Límite Máximo Permitido (LMP) de este factor antinutricional; en donde se observa que la mayoría de los hongos silvestres sobrepasa este límite mientras que los valores de los hongos de mayor comercialización es muy similar al LMP.

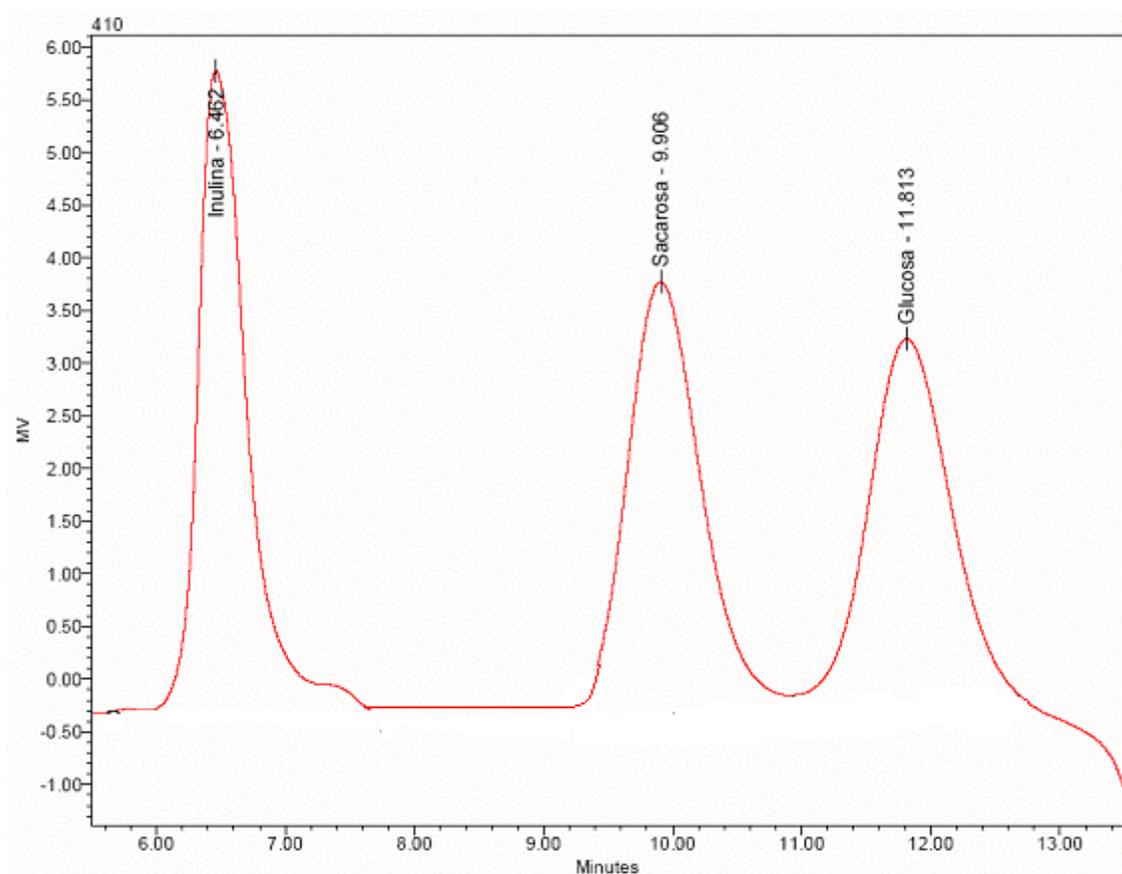
Tabla No. 4 Actividad Inhibitoria hacia la tripsina en las diferentes especies de hongos estudiados ^a

Muestra	U.T.I. /mg de muestra ^b	Límite Máximo Permitido (LMP)
<i>Cantharellus cibarius</i>	2.06 ± 0.11	
<i>Amanita caesaria</i>	18.28 ± 0.96	
<i>Amanita rubescens</i>	14.65 ± 0.74	
<i>Helvella lacunosa</i>	21.83 ± 1.21	
<i>Helvella crispa</i>	19.05 ± 1.06	
<i>Laccaria spp</i>	7.82 ± 0.41	2 U.T.I / mg de muestra
<i>Laccaria bicolor</i>	15.39 ± 0.80	
<i>Lyophyllum descastes</i>	26.48 ± 1.46	
<i>Ustilago maydis</i>	2.28 ± 0.12	
<i>Agaricus bisporus</i>	2.23 ± 0.12	
<i>Pleurotus sp</i>	2.03 ± 0.11	
<i>Lentinus sp</i>	2.40 ± 0.13	

^a Expresado en unidades de tripsina inhibida (UTI/mg de muestra)

^b Valor promedio ± desviación estándar, n = 3 (CV≤5%)

Se obtuvo el cromatograma de la solución estándar de achicoria, y se estableció el tiempo de retención de la inulina de 6.45 ± 0.01 minutos, el cual se muestra en la figura No.4



Hidrato de carbono	Tiempo de retención ^a (minutos)
Inulina	6.45 ± 0.01
Sacarosa	9.90 ± 0.01
Glucosa	11.80 ± 0.01

Figura No. 4 Cromatograma de la solución estándar de inulina de achicoria 1 mg/mL

^a Valor promedio \pm desviación estándar, n =5 (CV \leq 5%)

Cromatogramas de las muestras que tuvieron inulina

A continuación en las figuras No. 5,6 y 7 se muestran los cromatogramas de las especies de hongos que contienen inulina y otros hidratos de carbono como sacarosa y/o glucosa.

Muestra: *Amanita caesaria*

En el género Amanita (hongos silvestres) se determinó cualitativamente la presencia de inulina.

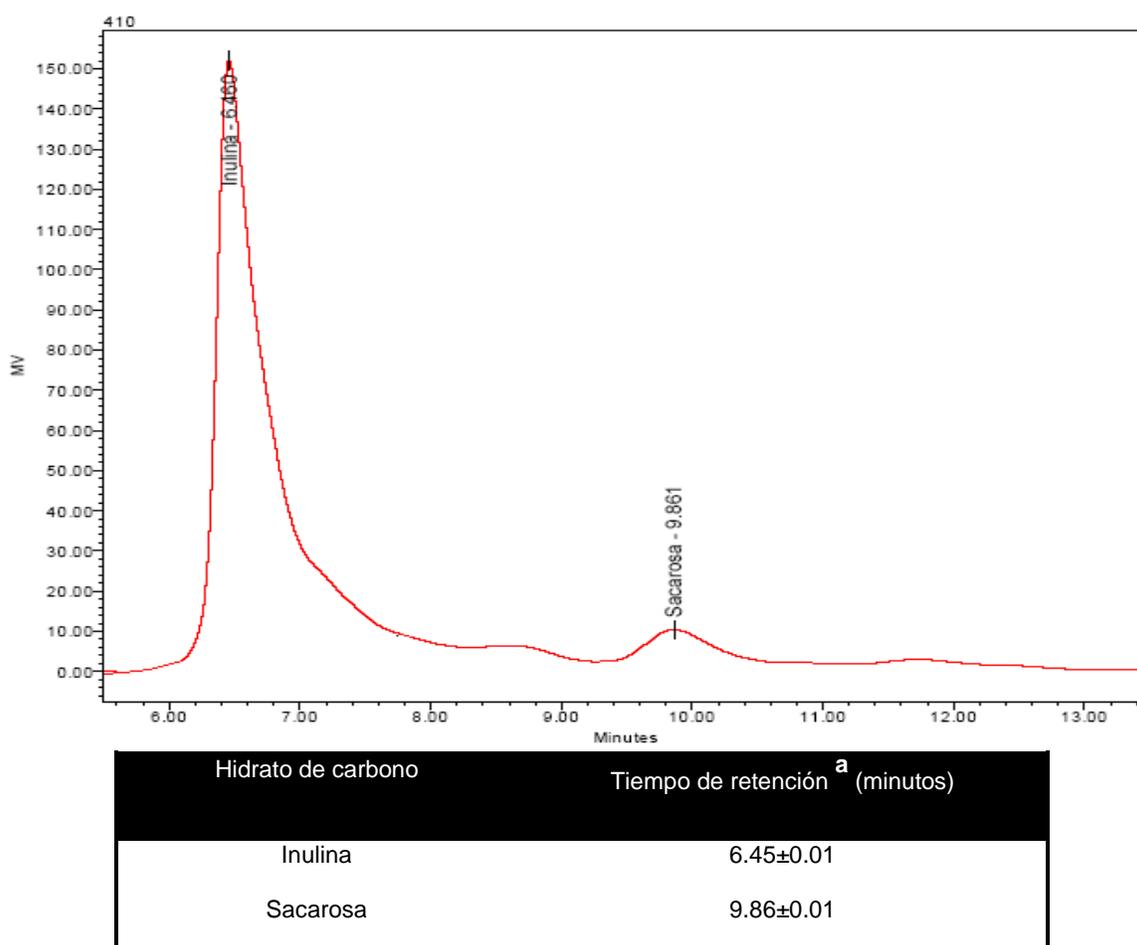
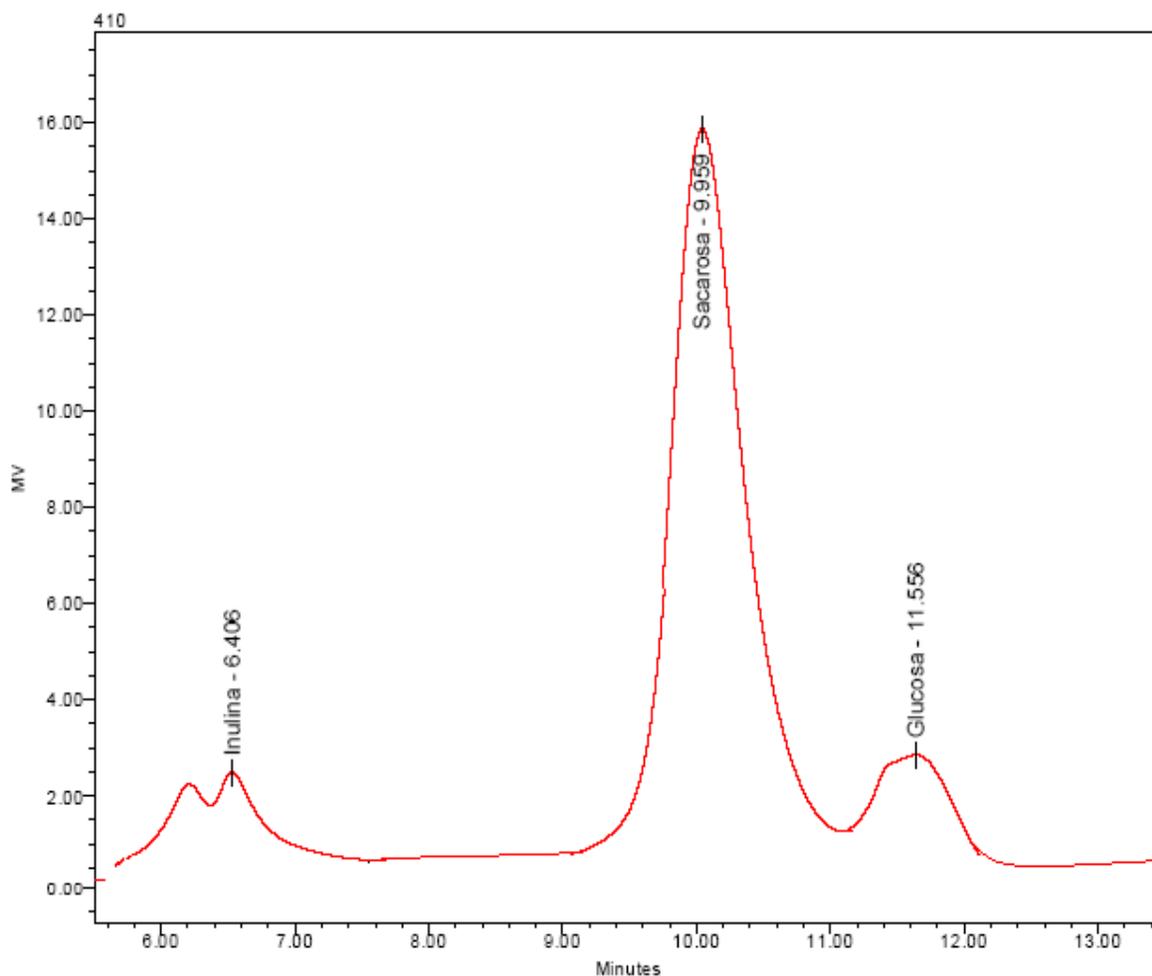


Figura No. 5 Cromatograma de determinación cualitativa de inulina, especie: *Amanita caesaria*

^a Valor promedio ± desviación estándar, n =3 (CV≤5%)

Muestra: *Amanita rubescens*

Se puede observar en la siguiente figura la presencia de inulina



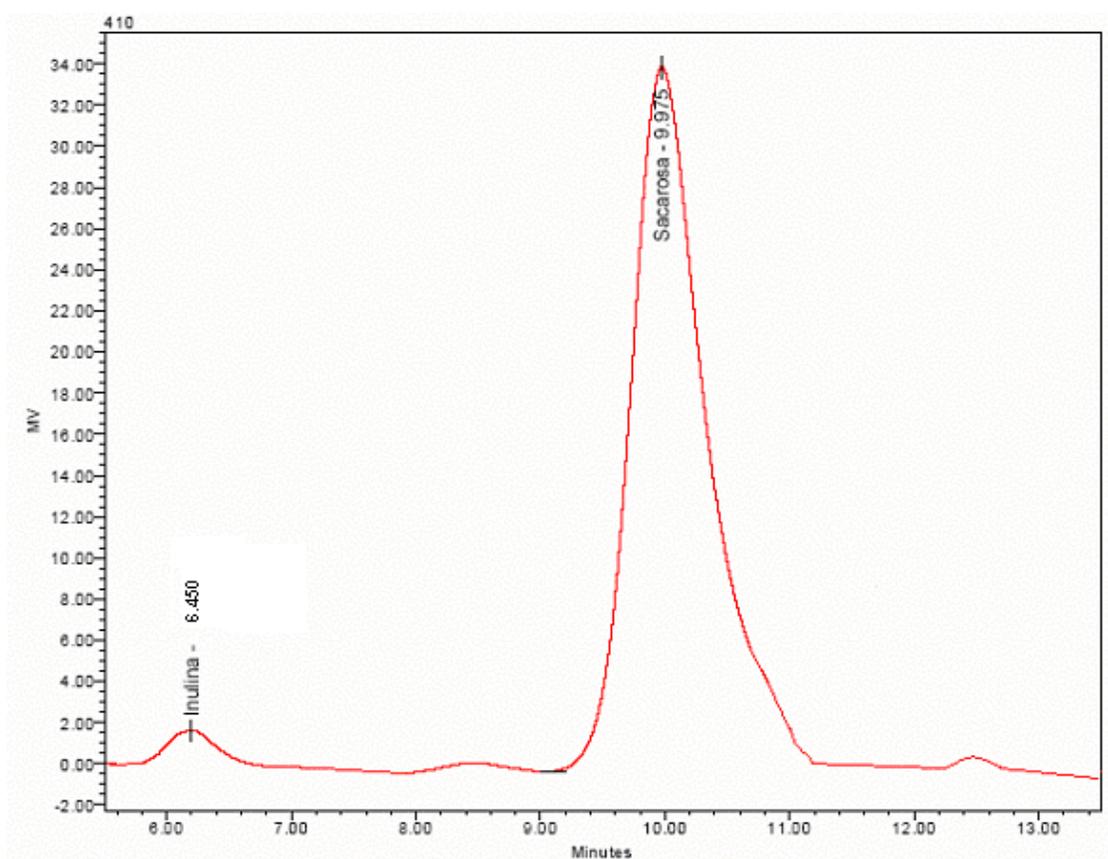
Hidrato de carbono	Tiempo de retención ^a (minutos)
Inulina	6.40±0.01
Sacarosa	9.95±0.01
Glucosa	11.55±0.01

Figura No. 6 Cromatograma de determinación cualitativa de inulina, especie: *Amanita rubescens*

^a Valor promedio ± desviación estándar, n =3 (CV≤5%)

Muestra: *Cantharellus cibarius*

Es la última de las tres especies que tuvo la presencia de inulina.



Hidrato de carbono	Tiempo de retención ^a (minutos)
Inulina	6.45±0.01
Sacarosa	9.97±0.01

Figura No. 7 Cromatograma de determinación cualitativa de inulina, especie: *Cantharellus cibarius*

^a Valor promedio ± desviación estándar, n =3 (CV≤5 %)



Los hongos son alimentos cuyo mayor componente es el agua, contienen bajas cantidades de grasa; a pesar de ello presentan importantes cantidades de otros macronutrientes. Para una adecuada y equitativa comparación, a continuación se discuten los resultados en base seca (g/100 g de materia seca).

Proteína

La especie *Lyophilum descastes*, presentó el valor más alto de las 12 especies estudiadas (50.8 ± 0.04), hay que recordar que es una de las 8 especies silvestres, seguida de la especie *Cantharellus cibarius*; y de las cuatro variedades más comercializadas, *Ustilago maydis* fue la que presentó menor contenido de proteína (13.7 ± 0.09). Sólo las especies de *Agaricus bisporus* y *Lentinus sp*, que son de las más comercializadas mostraron un contenido de proteína mayor que algunas especies silvestres.

Cenizas

La especie *Amanita caesaria* presentó el mayor contenido de cenizas de las 12 especies estudiadas, y *Ustilago maydis* la que menor contenido obtuvo de este componente

Grasa

Las especies del género *Amanita* obtuvieron los valores más altos de este componente, mientras que la especie *Ustilago maydis* contiene el menor.

Fibra dietética

De las 8 especies silvestres de hongos analizadas, el género **Helvella** presentó el valor más alto de fibra dietética, y sólo la especie comercial del género **Pleurotus** tuvo un contenido de fibra dietética comparable a las anteriores.

Hidratos de Carbono

Estos se calcularon por diferencia, y como era de esperarse **Ustilago maydis** fue la especie que mayor contenido de este componente tiene, ya que presentó bajas cantidades de otros componentes; y **Lyophilum descastes** presentó el menor contenido de este componente.

Inhibidores de tripsina

En este estudio la mayoría de los hongos silvestres comestibles sobrepasan las 10 U.T.I. / mg de muestra (valor que se considera como LMP), siendo en algunos casos el doble y hasta el triple, a excepción de los hongos **Cantharellus cibarius** y **Laccaria spp.**, mientras que las especies comúnmente comercializadas se encuentran en el orden de 2 U.T.I. /mg de muestra. A pesar de que los hongos silvestres comestibles sobrepasan el LMP, de acuerdo a la literatura revisada¹², el consumo de los hongos en todas las zonas rurales estudiadas del Estado de México, se consumen después de que se les ha dado un tratamiento térmico, el cual destruye la mayor parte de los inhibidores de tripsina por ser de naturaleza proteínica.

Inulina

Se encontró que sólo las especies de hongos **silvestres comestibles** *Cantharellus cibarius*, *Amanita caesaria* y *Amanita rubescens* contienen inulina, mientras que las especies más comercializadas, no la contienen, aunque sólo se realizó una determinación cualitativa de la inulina.



8. CONCLUSIONES



- Los hongos son alimentos cuyo contenido de agua es alto, por ello al analizar el contenido de macronutrientes en base húmeda, estos se ven disminuidos; sin embargo el contenido de este componente es índice de frescura.
- De las 12 especies estudiadas, *Lyophilum descastes*, es la que presenta el mayor contenido de proteína.
- Las 2 especies del género *Helvella* fueron las que presentaron el mayor contenido de fibra dietética, estando por encima de las 4 especies comerciales.
- Las 2 especies del género *Amanita* presentaron los valores más altos de grasa de las 12 especies estudiadas.
- En general las especies silvestres mostraron un mayor contenido de proteína, como de fibra dietaria, con respecto a las especies comerciales.
- La mayoría de los hongos silvestres comestibles sobrepasan el LMP establecido de U.T.I./ mg de muestra, a excepción de *Cantharellus cibarius* y *Laccaria spp*, mientras que las especies comúnmente comercializadas se encuentran en el orden de 2 U.T.I. / mg de muestra.
- Se encontró que las 2 especies de hongos silvestres comestibles del género *Amanita*, y de la especie *Cantharellus cibarius*, contienen cantidades importantes de inulina mientras que las especies de mayor comercialización no lo contienen.



9. BIBLIOGRAFÍA



- 1) Paredes- L.O., Cuaderno de Trabajo: Sistema de Investigación Miguel Hidalgo. Tecnología para la producción masiva de huitlacoche. CINVESTAV Unidad Irapuato, pp 9-15. (2000).
- 2) Martínez-Carrera, (P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla & W. Martínez.) México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capítulo 6.1, 20 pp. En: *El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. ECOSUR-CONACYT, México, D.F. (2007).
- 3) Soto Velazco C. et al. *Análisis Proximal y de aminoácidos de los residuos de cosecha del Hongo Pleurotus ssp.* Revista Mexicana de Micología. pp. 50-53. Vol. 21 (2005)
- 4) Ramos Soto .*Los hongos silvestres: una alternativa para el desarrollo regional*. SEMARNAP, México, (2003).
- 5) Fernández C. *Productos Forestales no Maderables (PFNM), una oportunidad de desarrollo para las comunidades forestales rurales*. México, 2005.
- 6) Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas y Fundación Produce Tlaxcala, A.C. *Programa estratégico para el desarrollo de la producción, transformación y comercialización de hongos comestibles en el estado de Tlaxcala*. Tlaxcala, Tlax. (2003).

7) Zamora-Martínez. Hongos comestibles de México. En Memorias del Ciclo de Conferencias *La investigación y la educación forestal en México*. SEMARNAP. pp. 87-1. (1999).

8) <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/Hongos.html>

Buscador Google.

Ceballos Deeni

9) Linares Edelmira, Balcázar Teodolinda & Aguirre Elvira. Importancia en promover el consumo de hongos silvestres, como una estrategia de conservación de los bosques templados de México, Taller: Los hongos comestibles de la Sierra Nevada. *The Nature of Success: Success for Nature*, pp 1-6, (2006).

10) Miranda RA. *La fibra dietaria en la alimentación. Determinación del contenido de fibra soluble e insoluble en 60 alimentos*. Proyecto de investigación 235/88. U. A. E. M. Toluca Edo. de Mex.

11) Martinez, B.; Rincon, F. *Trypsin inhibitors, 2: Effects of processing and determination methods*. pp. 33-38. España 1997.

12) <http://bq.unam.mx/~evazquez>

Última actualización: 04 de Septiembre de 2003

Bioquímica y Biología molecular en línea
Encargado de la página: Dr. Edgar Vázquez Contreras.
Instituto de Química UNAM
Buscador: Google

13) López- Molina D .*Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (Cynara scolymus L)* Revista Phytochemistry. pp. 1476-1484. Vol. 66 (2005).

14) Helrich, K. (Editor), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edition, Published by AOAC, Inc. Vol. I, pp. 17,18,40-62, 69-83, Vol. II, pp 1012, Arlington (1990). 16th Edition, Vol. I, pp. 7 (12.1.07), Vol. II, pp.70-71. (45.4.07). (1995).

15) López- Molina Dorotea, Navarro- Martínez María Dolores, Rojas Melgarejo Francisco, Hiner Alexander, Chazarra Soledad, Rodríguez- López José Neptuno. *Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from Artichoke (Cynara scolymus L.)*. Phytochemistry. pp. 1476 - 1484. Vol. 66, (2005).

16) Wei Lingyun, Wang jianhua, Zheng Xiaodong, Teng Da, Yang Yalin, Cai Chenggang, Feng Tianhua, Zhang Fan. *Studies on the extracting technical onditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers*. Journal of Food Engineering. pp. 1087-1093. Vol. 79, (2007).



10.1 Cálculos para obtener el % de Humedad en las muestras analizadas.

Cálculos:

Humedad:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde:

P_i= Peso de la charola con muestra antes de secarla (en gramos)

P_f= Peso de la charola con muestra después de secarla (en gramos)

m= peso de muestra (gramos).

Muestra: ***Cantharellus cibarius***

P_i: 3.7922 g

P_f= 1.4582 g

m=: 2.5583 g

$$\% \text{ Humedad} = \frac{3.79 \text{ g} - 1.46}{2.5583} \times 100 = 91.83$$

% Humedad= 91.83

10.2 Cálculos para obtener el % de Cenizas en las muestras analizadas.

Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Pf} - \text{Po}}{m} \times 100$$

Donde:

Pf: Peso del crisol con la muestra después de incinerada (gramos)

Po: Peso del crisol a peso constante (gramos)

m: Peso de la muestra en gramos

Muestra: *Cantharellus cibarius*

Pf: 17.9626 g

Po: 17.7753 g

m: 2.0712 g

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{17.96 \text{ g} - 17.77 \text{ g}}{2.0712 \text{ g}} \times 100 = 9.04$$

% Cenizas = 9.04

10.3 Cálculos para obtener el % de Proteína cruda en las muestras analizadas.

$$\% N_2 = \frac{(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% N_2 \times F$$

Donde:

P = mL de titulación de la muestra

B = mL de titulación del blanco

N = normalidad del HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m= peso de la muestra en gramos

F = Factor de conversión (Universal 6.25), depende de cada tipo de muestra.

Muestra: ***Cantharellus cibarius***

P: 30.82 mL

B: 1.097 mL

N: 0.01

m: 0.0634 g

F: 6.25

$$\% N_2 = \frac{(30.82\text{mL} - 1.097\text{mL}) \times 0.01\text{meq/mL} \times 0.014\text{meq} \times 100}{0.0634 \text{ g}} = 6.56$$

$$\% N_2 = 6.56$$

$$\% \text{ Proteína} = 6.56 \times 6.25 = 41.00$$

$$\% \text{ Proteína} = 41.00$$

10.4 Cálculos para obtener el % de Grasa en las muestras analizadas.

Cálculos

$$\%Grasa = \frac{Pf - Po}{m} \times 100$$

Donde:

Pf = Peso del recipiente después de la extracción (en gramos)

Po = Peso del recipiente antes de la extracción (gramos)

m = Peso de la muestra en gramos.

Muestra: ***Cantharellus cibarius***

Pf: 61.7048 g

Po: 61.6608 g

m: 3.1206

$$\%Grasa = \frac{61.7048 \text{ g} - 61.6608 \text{ g}}{3.1206 \text{ g}} \times 100 = 1.41$$

%Grasa = 1.41

10.5 Cálculos para obtener el % de Fibra dietética en las muestras analizadas.

Cálculos

Contenido de proteína en el residuo de cada crisol

$$\% N = \frac{(V_m - V_b) \times \text{meq} \times N_{\text{HCl}} \times 100}{m}$$

m

$$\% P = \% N \times F$$

Donde:

% N = Porcentaje de nitrógeno (g N/100g de residuo + celita)

% P = Porcentaje de proteína (g de proteína/100g de residuo + celita)

V_m = Volumen de HCl gastado en la titulación de la muestra

V_b = Volumen de HCl gastado en la titulación del blanco

meq = miliequivalentes del N (Peso molecular/1000 = 0.014)

N_{HCL} = Normalidad de la solución valorada de HCl

m = g de muestra (celita + residuo) utilizada en la determinación de proteína

F = Factor de conversión a proteína 6.25

Contenido de proteína en el residuo de cada crisol

$$P' = \frac{(R + \text{Celita}) \times \% P}{100}$$

Donde:

P' = g de proteína en el residuo

(R + celita) = g de residuo + celita del crisol

% P = Porcentaje de proteína (g de proteína /100g de muestra)

Contenido de fibra dietética total

$$\% \text{FDT} = \frac{(R_{\text{muestra}} - P'_{\text{muestra}} - C_{\text{muestra}} - B)}{pm} \times 100 \quad B = R_{\text{blanco}} - P_{\text{blanco}} - C_{\text{blanco}}$$

Donde:

FDT = fibra dietética total

B = corrección por el blanco

R = peso del residuo P₂ - P₁ (mg)

P' = peso promedio de proteína en el residuo (mg)

C = peso de cenizas en el crisol (mg) o (P₃ - P₁)

pm = peso de la muestra (mg).

Cuando se tienen los valores de proteína del duplicado se calcula el promedio y se le resta a cada una de los cuadruplicados de los residuos de la muestra.

Muestra: ***Cantharellus cibarius***

$$\% \mathbf{N} = \frac{(15.22 \text{ mL} - 1.064 \text{ mL}) \times 0.014 \text{ meq} \times 0.01 \text{ meq/mL}}{0.1010 \text{ g}} \times 100 = 1.96$$

$$\% \mathbf{P} = 1.96 \text{ g} \times 6.25 = 12.26$$

$$P_1 \text{ (Peso celita + peso crisol): } 31.1241 \text{ g}$$

$$P_2 \text{ (Peso residuo + peso celita + peso crisol): } 31.3103 \text{ g}$$

$$\text{Residuo (R) (} P_2 - P_1 \text{): } 0.1862 \text{ g} = 186.2 \text{ mg}$$

$$R + \text{celita} = 686.6 \text{ mg}$$

$$\text{Muestra (mg): } 500.3$$

$$\text{Cenizas (mg)} = P_3 - P_1 = 18.80$$

$$\mathbf{P} = \frac{686.4 \text{ mg} \times 12.26 \text{ g}}{100 \text{ g}} = 84.17 \text{ mg}$$

$$\mathbf{100 \text{ g}}$$

$$\% \text{ FDT}_i = \frac{(186.2 - 84.17 - 18.80 - 4.33)}{500.3} \times 100 = 15.77$$

$$\% \text{ FDT}_i = 15.77$$

$$\% \text{ FDT} = \bar{X} \pm \text{D.E.}, \text{ CV} \leq 5 \%$$

Cuando se tienen los valores de porcentaje de FDT de cada uno de los cuadruplicados se calcula el promedio \pm desviación estándar de la muestra.

10.6 Tabla esquemática de la serie de tubos para determinación de inhibidores de tripsina

A continuación se muestra en forma esquemática, la serie de tubos que se prepararon para poder determinar la actividad inhibitoria de la muestra:

Clave	mL de extracto	mL de H ₂ O	mL de Solución estándar de tripsina	BAPNA	Ácido acético al 30%
B1	1.8	0.2	2.0+1.0mL de ácido acético.	5.0	-----
1	1.8	0.2	2.0	5.0	1.0
B2	1.4	0.6	2.0+1.0mL de ácido acético.	5.0	-----
2	1.4	0.6	2.0	5.0	1.0
B3	1.0	1.0	2.0+1.0mL de ácido acético.	5.0	-----
3	1.0	1.0	2.0	5.0	1.0
B4	0.6	1.4	2.0+1.0mL de ácido acético.	5.0	-----
4	0.6	1.4	2.0	5.0	1.0
BR*	0.0	2.0	2.0+1.0mL de ácido acético.	5.0	-----
R	0.0	2.0	2.0	5.0	1.0

*BR: Blanco de referencia, R: referencia

La lectura en el espectrofotómetro se realizó a 410 nm. El espectrofotómetro se ajustó a 100% de Transmitancia con el blanco de cada porción cada vez que se leyó cada tubo. El tubo con 0.0 mL de extracto fue la referencia (40µg tripsina/10 mL), sobre el cual se basan los cálculos.

Cálculos para obtener UTI/mg muestra en las muestras analizadas.

La lectura de absorbancia (A), directamente se puede pasar a unidades de tripsina (U.T. previamente definidas):

$$U.T. = A \times 100$$

Al poner una serie de alícuotas del extracto, tendremos a su vez una serie de valores de U.T., los cuales al restar este valor al dato de referencia, obtendremos los respectivos valores de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.) y por consiguiente se puede calcular el valor de U.T.I./mL de cada una de las alícuotas.

Cuando se pone en una gráfica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./mL) como una función de la alícuota del extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa, donde se puede obtener el valor extrapolado, correspondiente al valor cero de la solución inhibitoria. ***NOTA**

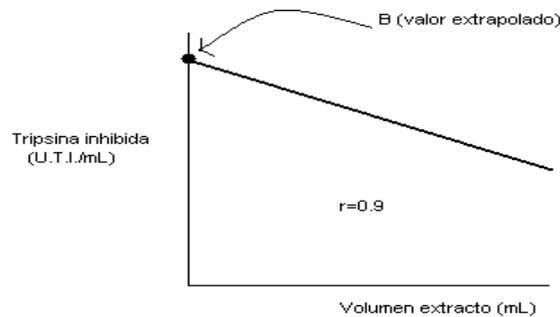


Figura No. 7 Gráfica de la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./mL)

Este dato extrapolado, es el valor más cercano a la actividad inhibitoria verdadera o real (si se refiere uno al inhibidor de soya tipo Kunitz).

Se reportan las unidades de tripsina inhibidas con respecto a 1 mg de muestra:

$$\text{U.T.I. /mg de muestra} = B \times F \times \frac{50\text{mL}}{1000 \text{ mg de muestra}}$$

Donde:

B = Valor extrapolado o promedio en (U.T.I. /mL)

F= Factor de dilución, el cual depende de la(s) dilución (es) realizada(s). Cuando se trabaja el extracto directo F = 1.

$$F = \frac{A_1}{a_1} \times \frac{A_2}{a_2} \quad \begin{array}{l} A_i = \text{aforo (s)} \\ a_i = \text{alícuota (s)}. \end{array}$$

Muestra: ***Cantharellus cibarius***

Peso: 1.006 g

Extracto directo ∴ F=1

Tubo	mL de extracto colocados	Absorbancia	Unidades de tripsina (UT)	Unidades de tripsina inhibida (UTI)	UTI/ mL	
Referencia	0	0.444	44.4	---	---	
4	0.6	0.192	19.2	25.2	42	r = -0.9570
3	1.0	0.191	19.1	25.3	25.3	b = 51.98
2	1.4	0.188	18.8	25.6	21.3	
1	1.8	0.190	19.0	25.4	14.1	

- **UT** = Absorbancia x 100; **UT** = 0.444 x 100 = 44.4
- **UTI** = UT referencia – tubo_n; **UTI** = 44.4 - 19.2 = 25.2
- **UTI/mL** = UTI/mL extracto; **UTI/mL** = 25.2/ 0.6= 42
- **% inhibición** = $\frac{\text{UTI de tubo 3}}{\text{UT de referencia}} \times 100$; **% inhibición** = $\frac{25.3}{44.4} \times 100 = 56.98$
- **UTI/ mg de muestra** = B x F x $\frac{50\text{mL}}{1000 \text{ mg de muestra}}$

$$\text{UTI/ mg de muestra} = 51.98 \times 1 \times \frac{50\text{mL}}{1006 \text{ mg de muestra}} = 2.58$$

UTI/ mg de muestra = 2.5