



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

“Evaluación de la digestibilidad *in vitro* de las fracciones proteicas del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Johnny Mendoza Xochipa

Comité Tutorial

Codirectores

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dra. Alba Mónica Montiel González

Tutores

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Dr. Jorge Soriano Santos

Tlaxcala, Tlax.

Febrero 2011



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



Maestría en Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis de **Johnny Mendoza Xochipa** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es "Evaluación de la digestibilidad in vitro de las fracciones proteicas del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*".

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A tentamente
Tlaxcala, Tlax., agosto 12 de 2010

DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

DRA. MA. DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

DR. JORGE SORIANO SANTOS

DRA. BLANCA ROSA RODRÍGUEZ PASTRANA



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



El presente proyecto se realizó bajo la dirección del Dr. Gerardo Díaz Godínez en el laboratorio de biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

El alumno Johnny Mendoza Xochipa recibió la beca número 266473 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

La tesis fue desarrollada en el programa de la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, la cual está registrada en el Padrón Nacional de Posgrado (PNP).

Agradecimientos

Al Dr. Gerardo Díaz Godínez, por el apoyo que me brindó para la realización del proyecto y la tesis, por los consejos y por compartir su conocimiento sin reserva.

A la Dra. Alba Mónica Montiel González, por sus acertados comentarios y aportaciones para la realización de la tesis.

A la Dra. Carmen Sánchez Hernández, por la revisión y aportaciones realizadas a la tesis.

Al Dr. Jorge Soriano Santos, por la siempre buena disposición de recibirme en su laboratorio en la UAM-I, por las atinadas aportaciones al proyecto y a la tesis.

A la Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana, por las aportaciones hechas a la tesis y al proyecto.

Dedicatoria y agradecimientos

Dedicada a mis papás José Miguel Mendoza Góchez y Martha Xochipa Pérez. Por segunda ocasión más no la última, por ustedes y para ustedes. Les agradezco infinitamente su apoyo, consejos pero sobre todo el amor que me brindan incondicionalmente. Son mi orgullo y mi razón de ser. Los amo.

Así mismo, dedico la presente a mis hermanos Anthony y Michael Mendoza Xochipa, aunque el tiempo ha pasado y hemos escogido caminos diferentes siempre tenemos uno especial que nos une; la familia. Gracias por el apoyo que siempre me han dado. Los quiero y admiro “*in ogni senso*”.

Una dedicatoria especial a mi pequeña abuelita Carolina. Una vez más agradezco sus bendiciones y lo reitero, no es por lo que creo sino por lo que sigue significando su mano en mi frente. Le admiro la fortaleza con que supera las adversidades. La quiero.

Agradecimiento

A la persona que nunca dejó de creer en mí, que me brindó su apoyo en las cuestiones académicas y personales. La que hizo que el camino fuera más ligero: Jennifer gracias por los consejos y por las muestras de afecto que me has dado. T.Q.M.

“Grazie di esistere”

Resumen

Al realizar propuestas de alimentos que puedan servir como opciones para mejorar el abastecimiento de proteínas, es necesario observar que dicho compuesto sea aprovechable por el organismo al cual va dirigido. Una de las formas en que esto puede medirse es a través de la digestibilidad.

En este estudio se obtuvieron por solubilización cuatro fracciones proteicas (globulinas, glutelinas, albúmina y prolaminas) del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*, a las cuales se les determinó el contenido de proteína cruda. Así mismo, se realizó la evaluación de la digestibilidad de las fracciones proteicas y de las proteínas del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* por el método de la AOAC (1990) y Torry (1963). Para la harina del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* la digestibilidad fue de 97.26% con el método de la AOAC y 98.38% con el método de Torry. La digestibilidad de la fracción de albúmina fue de 82.69%, de la glutelina 95.87%, de la prolamina 92.76% y de la globulina 89.23% con el método de la AOAC. Ahora bien, con el método de Torry modificado se obtuvieron los siguientes resultados albúmina 83.70%, glutelina 93.67%, de la prolamina 92.45% y de la globulina 93.29%. Al haber una alta digestibilidad de las fracciones proteicas de *P. ostreatus*, se pueden adicionar a distintos alimentos.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Características generales de <i>Pleurotus ostreatus</i>	2
1.2 Ciclo de vida de <i>P. ostreatus</i>	3
1.3 Proteínas	4
1.3.1 Aminoácidos	8
1.3.2 Calidad de la proteína	8
1.4 Alimentos con aporte proteico	10
1.4.1 Carne	10
1.4.2 Huevo	10
1.4.3 Leche	11
1.5 Alimentos alternativos con aporte proteico	11
1.5.1 Vegetales	11
1.5.2 Soya	12
1.5.3 Hongos	12
1.6 Digestibilidad	13
1.6.1 Digestibilidad de las proteínas	15
1.6.2 Factores de variación en la digestibilidad	17
1.6.3 Efecto de la fibra	17
1.6.4 Efecto de las características físicas y químicas en la digestibilidad	18
2. Antecedentes	20
2.1 Contenido de proteína en hongos	23
2.2 Digestibilidad en alimentos	25
3. Justificación	30
4. Pregunta de investigación	31
5. Objetivos	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos específicos	31
6. Materiales y Métodos	32
6.1 Material biológico	32
6.2 Obtención de la harina y fracciones de <i>P. ostreatus</i>	32
6.3 Determinación de proteína cruda por el método Kjeldahl	33
6.4 Obtención de proteasas para la digestibilidad <i>in vitro</i>	33
6.5 Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> por el método de la AOAC (The Scientific Association Dedicated to Excellence in Analytical Methods)	34
6.6 Evaluación de la digestibilidad <i>in vitro</i> por el método de Torry modificado	34
7. Resultados y discusiones	36
7.1 Determinación de la proteína cruda de las fracciones proteicas de <i>P. ostreatus</i>	36
7.2 Prueba de proteasa	39
7.3 Digestibilidad <i>in vitro</i> por el método de la AOAC	39
7.4 Digestibilidad <i>in vitro</i> por el método Torry modificado	40
8. Conclusiones	47
9. Perspectivas	48
10. Literatura citada	49

1. Introducción

Aportar información sobre digestibilidad y técnicas de digestibilidad *in vitro* nos da la pauta para realizar nuevas investigaciones con diversos alimentos y nuevas técnicas. Por ello, en este trabajo se evaluó la digestibilidad *in vitro* de las fracciones proteicas y de la harina desgrasada del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*, mediante los métodos de la AOAC (The Scientific Association Dedicated to Excellence in Analytical Methods) y Torry (modificado). Ya que dichas fracciones proteicas provenientes de *P. ostreatus* aportan la mayoría de los aminoácidos esenciales (Ile 3.03, Leu 4.95, Lys 3.55, met 0.97, Phe 10.32, Thr 3.45, Val 3.73, Tyr 2.26, Ala 6.48, Arg 4.28, Asp 7.84, Glu 11.57, Gly 3.90, His 2.05, Pro 3.17 y Ser 3.62 g/16g N) que el organismo humano necesita (Bermúdez 2003).

Los métodos de digestibilidad *in vitro* como lo es el de la AOAC, se basa en crear un medio similar al del organismo para que a través de la capacidad que tienen las enzimas digestivas se degraden las proteínas y mediante la hidrólisis de éstas se determina la digestibilidad. El Método de Torry, consiste en hidrolizar las proteínas con enzimas como la pepsina, tripsina, quimotripsina y ácido clorhídrico en incubación. Ahora bien, también existe el método *in situ*, en el cual se emplean bolsas con el alimento o proteína a determinar dentro del rumen del animal en diferentes lapsos de tiempo (Yesca-Yesca 2004).

Por otro lado, existen métodos de digestibilidad *in vivo*, los cuales son de un proceso laborioso y costoso, además de requerir del empleo de grandes cantidades de alimento (Bochi-Brum y cols. 1999). La digestibilidad *in vivo* puede evaluarse a través del método PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score), el cual, se basa en los requerimientos de aminoácido esenciales para los humanos y su capacidad para digerirlos. Es un método de evaluación reciente, fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, la Organización para la Agricultura y la Organización de las Naciones Unidas además de la Organización Mundial de la Salud (FAO / OMS) en 1993 como un método para determinar la calidad proteica.

El conocimiento de la digestibilidad de los alimentos es básico para establecer su valor nutritivo y, por tanto, para la formulación de raciones, además para determinar la calidad de las

proteínas ya que no todas son digeridas, absorbidas y utilizadas en la misma medida (Malca y cols. 2006).

1.1 Características generales de *Pleurotus ostreatus*

Nombres comunes: *Pleurotus*, gírgola, seta común, seta de ostra, hongo ostra, orejón, seta de chopo.

Nombre científico: *Pleurotus ostreatus*.

Clasificación científica

Reino: *Fungi*, filo: *Basidiomycota*, clase: *Homobasidiomycetes*, orden: *Agaricales*, familia: *Pleurotaceae*, género: *Pleurotus*, especie: *ostreatus*.

Morfología

Las especies de *P. ostreatus* es conocida por su forma de paraguas, sombrero de 5-15 cm, muy excéntrico y variable, normalmente en forma de concha, con el margen primero incurvado y después recto, a menudo ondulado. La cutícula, que es separable, es lisa y brillante, de color muy variable, beige, gris claro, gris negruzco o gris azulado. Láminas juntas, decurrentes hasta la base del pie, de color crema. Esporada de color gris liláceo. Pie muy corto de 1-4 x 1-2 cm, excéntrico o completamente lateral, recubierto por vellosidades de color blanco, carne firme y fibrosa, blanca, de olor agradable a veces algo anisado (García 1998).

Las setas poseen su pie más lateral que céntrico, por lo que su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja, de hecho a este hongo técnicamente se la llama *P. ostreatus*, término que deriva del griego pleura (costado o lado) y del latín otus, oreja. Para que la seta se desarrolle adecuadamente se requiere de una temperatura y humedad adecuadas, así como aire que aporte oxígeno y cierta cantidad de luz (Gaitán 2004).

Cultivo

Se ha convertido en un producto comestible ampliamente reconocido en la industria de los hongos cultivados. Su técnica de producción sencilla y barata, así como su habilidad para crecer de manera rápida en diversos residuos orgánicos y su adaptación a diversas condiciones climáticas, son características atractivas que han aumentado el interés de muchos cultivadores.

Las setas crecen de manera natural en troncos en descomposición o en diferentes materiales obtenidos como subproductos de las actividades agrícolas. Por esta razón es posible cultivarlas en desechos de la agroindustria tales como pulpa de café, bagazo de caña de azúcar y diversas pajas de cereales (Martínez y cols. 2006).

1.2 Ciclo de vida de *P. ostreatus*

Las fructificaciones de los hongos constituyen los cuerpos reproductores en los que el hongo forma sus esporas, las célula de dispersión del hongo para perpetuar la especie. Las esporas pueden ser sexuales o asexuales. En la estructura de un hongo la fructificación es el resultado de un proceso sexual y formará las esporas en su parte fértil, el himenio, que es el ara inferior del sombrero.

Las esporas del *P. ostreatus* (basidioesporas) al caer sobre un sustrato adecuado, germinan produciendo hifas y éstas, un micelio que tiene la particularidad de ser uninucleado. Un micelio uninucleado también llamado micelio primario, se fusiona con otro individuo para producir un micelio binucleado, o secundario (sin fusión nuclear). Esta unión sexual se llama plasmogamia y constituye el primer paso en la reproducción sexual del hongo.

El micelio secundario tiene la característica de desarrollarse abundantemente y esta masa es la que constituye el verdadero hongo. Se pueden formar uno o muchos cuerpos fructíferos, en los cuales, en su himenio terminará la reproducción sexual que es la formación de las esporas. Esta se forma en los basidios donde se lleva a cabo la fusión nuclear llamada cariogamia y da como resultado la formación de las esporas. Para el caso de *P. ostreatus* se forman cuatro esporas por cada basidio, como en la mayoría de los basidiomicetos.

Los hongos también se pueden reproducir vegetativamente por medio de fragmentos obtenidos del micelio o del cuerpo fructífero. En condiciones de asepsia, una porción del micelio secundario del hongo o una pequeña pieza del cuerpo fructífero, bajo condiciones adecuadas de humedad, temperatura, y nutrimento, crecerán y dará más hifas, formando un nuevo micelio. El método vegetativo es el más empleado en el laboratorio para reproducir a los hongos.

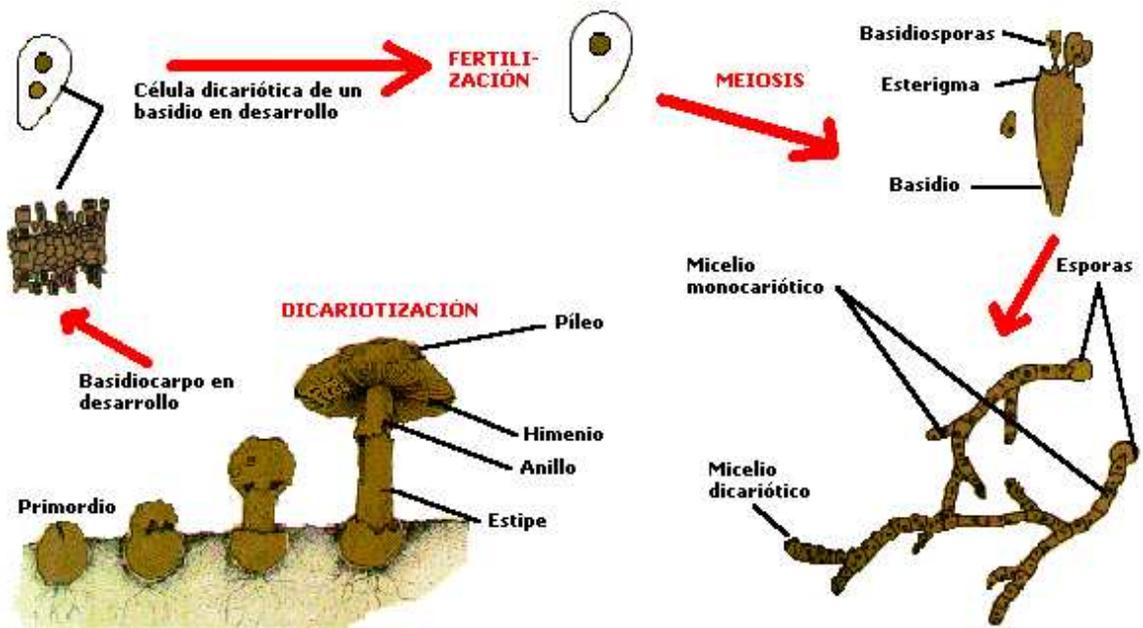


Figura 1. Ciclo biológico general de un hongo basidiomiceto (Ardón 2007).

1.3 Proteínas

Las proteínas son macromoléculas compuestas por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N). La mayoría también contienen azufre (S) y fósforo (P). Las mismas están formadas por la intersección de varios aminoácidos, unidos mediante enlaces peptídicos. Los aminoácidos contienen en su estructura molecular al menos un grupo amino primario (-NH₂), un grupo de ácido carboxilo (-COOH) y una cadena lateral (R) que es característica de cada aminoácido y que influye en sus propiedades.

Las proteínas se pueden clasificar de diferentes maneras, por su forma, solubilidad, composición y función biológica. Por su forma, se dividen en fibrosas (varias cadenas de polímeros unidas a lo largo de un eje recto) y globulares (estructuras esféricas). Las proteínas fibrosas son insolubles en agua. Las proteínas globulares son solubles en sistemas acuosos (Lehninger 2006).

Por su composición se dividen en homoproteínas y heteroproteínas (Badui 2006). Según la función biológica que cumplen las proteínas se clasifican en enzimas (catalizan reacciones), proteínas de transporte (hemoglobina o en la membrana celular), proteínas de

almacenamiento, proteínas contráctiles, proteínas estructurales, proteínas de defensa y reguladoras (Lehninger 2006).

De acuerdo a su solubilidad se clasifican en 4 fracciones. Albúminas, las cuales son solubles en soluciones salinas diluidas y en agua; las globulinas son solubles en soluciones salinas; las glutelinas son insolubles en agua, etanol y soluciones salinas pero solubles en pH ácidos o básicos y las prolaminas que son solubles en etanol.

La estructura de las proteínas se determina por una serie de conformaciones interdependientes, que a continuación se citan:

Estructura primaria, que corresponde a la secuencia lineal específica (sin ramificaciones) de aminoácidos de una cadena polipeptídica mediante un enlace peptídico, la cual es el resultado de la traducción de la información genética contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN. La importancia desde el punto de vista químico de la estructura primaria, radica en la secuencia de los grupos laterales de los aminoácidos (cadenas laterales, R) dado que es el componente variable de la molécula que proporciona la identidad a la cadena. Es tan importante esta secuencia que el cambio en solo un aminoácido como resultado de una mutación, puede ser trágico para la vida de un organismo. El grado de tolerancia a los cambios depende del grado de alteración de la geometría que presente la estructura proteica, así como del comportamiento químico que tiene la cadena lateral del aminoácido sustituido (polar, no polar, básico o ácido). Cabe resaltar que todas las proteínas sin importar su nivel de organización se originan de una estructura primaria que posteriormente adopta una conformación tridimensional específica (Voet y Voet 2006).

Estructura secundaria, es el plegamiento de la cadena peptídica sobre su propio eje para formar una estructura tridimensional específica, provocando la aparición de motivos estructurales, los más comunes son la α -hélice y la β -lámina:

La estructura secundaria más común es la α -hélice, figura 3, se observa cómo forma una estructura geométrica en espiral, muy uniforme, en la que cada vuelta está constituida por 3.6 aminoácidos. La hélice se mantiene unida mediante puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del grupo amino del enlace peptídico de un aminoácido y el grupo carboxilo del enlace peptídico de otro. Dentro de este grupo se pueden mencionar proteínas como el colágeno, la queratina y la elastina.



Figura 3. Representación de la estructura α -hélice

La estructura β -lámina se caracteriza por presentarse de forma aplanada y extendida, como se observa en la Figura 4, además posee un máximo de enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos. Esta estructura consta de varias cadenas peptídicas que permanecen enfrentadas y se mantienen juntas con enlaces de hidrógeno en un arreglo a manera de zig-zag. La estructura laminar formada le confiere flexibilidad más no elasticidad. Debido a que toda cadena polipeptídica tiene un extremo C-terminal en una dirección y un extremo N-terminal en la otra, dos cadenas enlazadas con hidrógeno y una al lado de la otra pueden correr en la misma dirección, paralelas, o en dirección opuesta, antiparalela. Un ejemplo de estas proteínas es la fibroína de la seda (Stryer 1995).

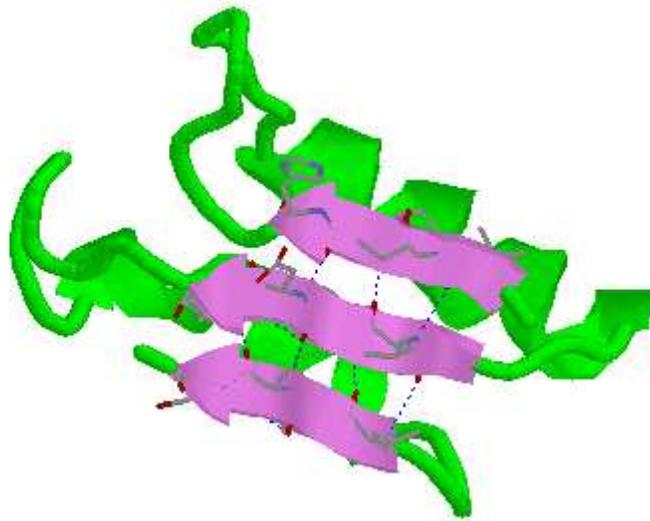


Figura 4. Representación de la estructura β -lámina.

La estructura terciaria, describe la conformación definitiva y específica de la proteína. Durante el enrollamiento de la cadena peptídica, para dar origen a la estructura terciaria, los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas e hidrofóbicas entre una parte de la cadena y otra son las fuerzas que mantienen los pliegues en posición espacial correcta.

Por otra parte, los puentes disulfuro (-S-S-) que se forman entre los aminoácidos de cisteína pueden acercar partes que se hayan distantes en una proteína, de hecho algunos sitios activos de enzimas están constituidos por ellos. Además, en la proteína también se forman algunos otros enlaces covalentes para mantener su estructura terciaria que por lo general es globular. Con respecto a la estructura terciaria de cadenas polipeptídicas largas, cabe destacar la presencia de regiones compactas semi-independientes denominadas dominios, que se caracterizan por poseer una geometría casi esférica específica con un interior hidrofóbico y un exterior polar. El carácter independiente del dominio es evidente cuando al separarlo de la cadena, su estructura primaria es capaz de plegarse sobre sí misma para adoptar la conformación nativa.

Una proteína puede presentar más de un dominio, a menudo interconectados por un segmento polipeptídico carente de estructura secundaria regular y alternativamente estar separados por una hendidura o una región menos densa en la estructura terciaria de la proteína.

Los diferentes dominios de una proteína pueden gozar de movimiento relativo que está asociado con una función (Robinson 1994).

Estructura cuaternaria, deriva de la conjunción de varias cadenas peptídicas que, asociadas conforman un multímero que posee propiedades distintas a la de sus monómeros componentes. Dichas subunidades pueden ser idénticas o diferentes y se asocian entre sí mediante interacciones no covalentes, como pueden ser puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o puentes salinos para formar dímeros, trímeros y tetrameros. En algunos casos las cadenas aisladas son inactivas, pero en otros pueden cumplir la misma función que el complejo, aunque con diferente cinética (Lehninger 2006).

1.3.1 Aminoácidos

Los aminoácidos son la única fuente aprovechable de nitrógeno para el ser humano, son elementos fundamentales para la síntesis de las proteínas, y son precursores de otros compuestos nitrogenados (Jacques y Pierre 2000).

Los aminoácidos desde el punto de vista nutricional se dividen en aminoácidos esenciales y no esenciales.

Aminoácidos esenciales son aquellos que no pueden ser sintetizados en el organismo, y por ende deben incorporarse en la dieta mediante ingesta: fenilalanina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, triptofano y valina. Durante la infancia y adolescencia: arginina e histidina. Aminoácidos no esenciales son aquellos que son sintetizados en el organismo: alanina, cisteína, cistina, glicina, hidroxiprolina, prolina, serina, tirosina, ácido aspártico, y glutámico.

Las proteínas no sólo son fuente de aminoácidos, sino que debido a su naturaleza polimérica, su presencia influye en las características reológicas y en la textura del alimento, que hacen que éste sea más aceptado por el consumidor (Casanueva 2001).

1.3.2 Calidad de la proteína

El valor biológico o calidad de una proteína depende fundamentalmente de su composición en aminoácidos esenciales. Conocida ésta es posible predecir, dentro de ciertas limitaciones, su

comportamiento en el organismo; para ello solo es necesario contar con un adecuado patrón de comparación. El problema fundamental para seleccionar un patrón reside en el hecho de que el valor biológico de una proteína no es constante, sino que depende de una serie de variables entre las que se encuentran la especie, edad, y el estado fisiológico (Suárez y cols. 2006).

Diversos comités de expertos de la FAO han propuesto distintos patrones en los años 1956, 1965, 1970, 1973. La última propuesta de este organismo es la realizada en 1985, que se basó en trabajos experimentales de corta y larga duración, que evaluaron la cantidad de nitrógeno necesario para producir un balance de nitrógeno en equilibrio (se dice que hay equilibrio nitrogenado cuando la entrada dietética de nitrógeno (ingerido) es igual a las pérdidas) (OMS 1985; Casanueva 2001). No obstante, en los últimos años, los estudios a cerca de las necesidades de aminoácidos se han basado en métodos que evalúan el metabolismo de los mismos, tales como el método de oxidación directa del aminoácido, que consiste en marcar con C13 al aminoácido en estudio y luego cuantificar la producción de CO₂ 13 en el aire expirado, que es un indicador de la oxidación irreversible del aminoácido y por lo tanto señala las pérdidas obligatorias del mismo. En la última revisión de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, las necesidades estimadas de aminoácidos se basaron en estudios que midieron la utilización metabólica de los aminoácidos. Los valores propuestos resultan superiores a los anteriormente sugeridos por la FAO en el 2005. De esta manera la Academia Nacional de Ciencias propone un nuevo patrón de aminoácidos para niños mayores de 1 año y adultos, el que puede tomarse como referencia para calcular la dosis inocua de proteínas ingeridas y para evaluar la calidad de las proteínas alimenticias (Olivares y cols. 1989; NRCRDR 1989; 1991).

Otro patrón con el que se cuenta es el huevo, ya que en el se encuentran los aminoácidos sin que se dé un déficit o un exceso de ninguno, lo que llevaría a un desequilibrio que reduciría la utilización o aumentaría las necesidades de otros aminoácidos.

En esta evaluación de la calidad de una proteína alimenticia, se deben considerar dos factores: su contenido en aminoácidos esenciales y su digestibilidad. El valor biológico de una proteína depende de la composición de aminoácidos y de las proporciones entre ellos y es máximo cuando estas proporciones son las necesarias para satisfacer las demandas de nitrógeno para el crecimiento, la síntesis, y reparación tisular. El valor biológico, está además

condicionado por las diferentes velocidades de recambio de aminoácidos en los distintos tejidos y por consiguiente no es una constante sino que se encuentra influido por la especie, la edad y el estado fisiológico del individuo (OPS 1997). Sin embargo esta estimación está incompleta si se desconoce el porcentaje de digestibilidad que posee la proteína.

1.4 Alimentos con aporte proteico

1.4.1 Carne

La carne es un medio muy útil y eficiente de abasto de proteína. En occidente, la carne de bovino es la de mayor consumo, seguida de la carne de porcino, ovino y caprinos, y constituye una excelente fuente de proteínas de alta calidad, especialmente apreciadas por poblaciones urbanas. El promedio de consumo alcanza 90 kg anuales por persona en los países industrializados. El consumo promedio ha tenido un aumento creciente desde 1960, recientemente se han expresado inquietudes sobre su inocuidad, tanto por la presencia de patógenos y productos tóxicos de la misma, como por una aparente asociación entre el incremento de consumo y el incremento de cáncer colorrectal. Existen otros factores económicos y filosóficos que abogan contra el consumo de la misma. No se puede negar la calidad de sus proteínas en términos nutricionales pero no debe olvidarse que las mismas forman parte de un sistema complejo, en el que están presentes además, otros componentes que repercuten en color y sabor, así como en sus posibles efectos negativos sobre la salud, particularmente los lípidos (Badui 2006).

1.4.2 Huevo

Se trata de un alimento valioso por la equilibrada proporción de proteínas, carbohidratos, grasas, minerales y vitaminas que contiene. Desde el punto de vista energético, un huevo de 65g proporciona unas 95 Kcal. Al suministrar muchos nutrientes en cantidades moderadas de energía resulta útil en las dietas de control de peso y en la alimentación de personas sedentarias o enfermas que realizan poca actividad física las cuales tienen que controlar la ingesta de energía pero necesitan aportes adecuados de nutrientes. Tanto la clara como la yema de huevo contienen proteínas, pero mientras que en la clara se encuentran en una solución acuosa, en la

yema van unidas a sustancias lipoides. La proteína del huevo entero tiene un valor biológico muy alto (94 en una escala de 100), ya que es rica en aminoácidos esenciales. Su calidad supera incluso a la proteína de la leche, a la del pescado y a la de la carne, lo que hace que se emplee como patrón para medir la calidad de otras proteínas. La grasa se encuentra en mayor proporción en la yema (donde supone casi un tercio del peso total); sin embargo, en la clara sólo se encuentran trazas de grasa. La fracción lipídica del huevo contiene grandes cantidades de ácido oleico y ácido linoleico, ambos muy importantes desde el punto de vista nutricional. El elevado contenido en colesterol, especialmente concentrado en la yema del huevo, ha sido el responsable del descenso en el consumo de este alimento en los últimos años. Sin embargo, en el control de la colesterolemia tiene más influencia la cantidad y tipo de grasa de los alimentos que su contenido en colesterol (Ortega 2000).

1.4.3 Leche

En promedio puede señalarse que la leche de vaca contiene un 87.6% de agua. El resto de los componentes son grasa 3.4%, proteína cruda 3.5 %, lactosa 4.6%, cenizas 0.8%. En términos de sólidos no grasos estos ascienden a un 8.9 % y sólidos totales un 12.3%. La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra en la forma de proteína. La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0% (30-40 gramos por litro). El porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche. Existe una estrecha relación entre la cantidad de grasa y la cantidad de proteína en la leche cuanto mayor es la cantidad de grasa, mayor es la cantidad de proteína. Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%) (Hazard 1997).

1.5 Alimentos alternativos con aporte proteico

1.5.1 Vegetales

Las proteínas vegetales constituyen una fuente de nutrimentos e ingredientes funcionales de interés por su variedad, disponibilidad y costo, explotándose tanto las propiedades funcionales como los beneficios de cada proteína, sin embargo, estas proteínas no contienen la cantidad de aminoácidos necesaria que el humano requiere (Badui 2006).

1.5.2 Soya

Las proteínas de la soya son una mezcla heterogénea de globulinas (60 a 75% del total) y de albúminas, con pesos moleculares muy variados, solubles en disoluciones salinas y en agua, y precipitan en su punto isoeléctrico, en el intervalo de 4.2 a 4.8. En general, las proteínas de las leguminosas son ricas en aminoácidos indispensables, tales como la lisina, treonina, isoleucina, leucina, fenilalanina y valina; sin embargo, son deficientes en metionina y cisteína. Algunos procesos de obtención de aislados de proteína de soya a pH muy alcalinos provocan todavía una pérdida de dichos aminoácidos azufrados (Badui 2006).

1.5.3 Hongos

El valor nutricional de los hongos fue prácticamente ignorado durante mucho tiempo (Méndez y cols. 2005), a pesar de su valor como alimento rico en proteínas y propiedades medicinales (Sánchez y Royse 2002). Estos se distribuyen ampliamente por todo el mundo, existen aproximadamente 10,000 especies de las cuales sólo el 10% son comestibles (Guzmán y cols. 2006). Cabe resaltar que *P. ostreatus* tiene un 27.99% de proteína en base seca (López-Sánchez 2010), presenta la mayoría de los aminoácidos esenciales, entre los que se puede mencionar a la isoleucina, leucina, lisina, metionina, valina (Soto y cols. 2005), además contiene un 57% de carbohidratos y 14% de fibra cruda, la fracción de lípidos es poco significativa, sin embargo, los ácidos grasos son predominantemente insaturados (Breene 1990). El contenido de humedad de las setas es de 90%, se ha reportado también la presencia de riboflavina, tiamina, niacina, ácido ascórbico, ácido linoleico, calcio y fósforo, indicando que los basidocorpos de este género son fuente de algunos complejos de vitamina B, fibra, proteína y ácido linoleico (Bautista y cols. 2005). Además, *P. ostreatus* es un hongo gastronómicamente de primera calidad; se han identificado algunas sustancias aromáticas responsables en gran parte del aroma y delicioso sabor característico de este tipo de hongos (Bermúdez 2003).

1.6 Digestibilidad

La digestibilidad es uno de los indicadores más utilizados para determinar la calidad de las proteínas debido a que no todas son digeridas, absorbidas y utilizadas en la misma medida. Las diferencias en digestibilidad pueden deberse a factores inherentes a la naturaleza de las proteínas alimentarias, a la presencia de componentes no proteicos con influencia en la digestión (fibra de la dieta, taninos, fitatos), a la presencia de factores antifisiológicos o a las condiciones de elaboración que pueden interferir en los procesos enzimáticos de liberación de los aminoácidos (Church y Pond 1990).

La digestibilidad proteica se puede determinar por varios métodos, entre ellos, la digestibilidad *in vivo*, ya sea aparente o verdadera, directa o indirecta, y la digestibilidad *in vitro* utilizando enzimas (FAO/OMS 1992). En la actualidad, las regulaciones de la Association of American Feed Control Officials (AAFCO) no permiten que los fabricantes de alimentos para animales incluyan datos de digestibilidad de carácter cuantitativo o comparativo en sus etiquetas.

Los alimentos con una digestibilidad igual o superior al 80% en materia seca son los apropiados para las mascotas, debiendo rechazarse cualquier alimento cuya digestibilidad sea inferior al 75%; sin embargo, la gran variabilidad en la calidad de la proteína presente en los alimentos comerciales hace que la determinación de su digestibilidad sea de gran importancia (Case y cols. 1997).

La digestibilidad *in vivo* (evaluaciones de alimentos que se realizan empleando animales) en ratas es un método ampliamente utilizado para determinar la calidad de los alimentos de uso humano. Así mismo, la fisiología digestiva de la rata es similar a la del canino; sin embargo, la determinación de la digestibilidad en ratas presenta algunos inconvenientes como son el tiempo de su ejecución (9 días), la cantidad de alimento empleado, la necesidad de instalaciones, personal capacitado, el costo y el manejo de animales, además de que el tiempo empleado para obtener los resultados no sirven para la evaluación comercial de alimentos (Córdova 1993).

La técnica *in situ*, también llamada “de la bolsita de nylon” (Ørskov y cols. 1980) permite estudiar la cinética de desaparición del alimento en el rumen de animales fistulados. El alimento se coloca dentro de bolsitas de nylon cerradas y luego en el rumen de los animales, el retiro de distintas bolsitas a lo largo del tiempo permite medir la cantidad de material que ha desaparecido. La fracción del alimento que no se recupera dentro de las bolsitas se asume que ha sido degradado, de este modo se construye la curva de desaparición. Esta metodología representó un adelanto muy importante dentro del campo de la nutrición de rumiantes, debido a que permite el estudio de la cinética de degradación. Esta técnica ha mostrado un buen grado de asociación con el consumo y la digestibilidad para alimentos como forrajes frescos y henos (Ørskov 2000).

Por un lado, la digestibilidad *in situ* puede tener modificaciones según sea el alimento, tal es el caso del silaje y el maíz, en el cual se incubaba el material fresco y picado en reemplazo del seco y molido para garantizar la veracidad de los resultados obtenidos. La necesidad de animales canulados, la limitación en el número de muestras a procesar por animal canulado y los costos asociados son las principales razones por las que esta técnica sólo se emplea en centros de investigación y no resulta práctica para laboratorios de servicios.

Por otro lado, las técnicas *in vitro* intentan simular el proceso de digestión que ocurre en el rumen donde se lleva a cabo la mayor parte de la degradación de los alimentos voluminosos (forrajes frescos y conservados). Los sistemas *in vitro* según el tipo de información que ofrecen se pueden distinguir entre técnicas de punto final y aquellas que aportan información sobre las cinéticas de digestión. Los estudios de punto final informan la cantidad o proporción del alimento desaparecido en condiciones especificadas como ambiente y tiempo de incubación.

Ahora bien, la llamada digestibilidad *in vitro* refleja la digestibilidad potencial de los alimentos debido a que ha sido ajustada con mediciones *in vivo* a nivel de consumo de mantenimiento. No obstante, son una excelente fuente de información teniendo en cuenta su bajo costo y la rapidez con que se obtienen los resultados. Dentro de este grupo se encuentran las que utilizan licor ruminal (Tilley y Terry 1963; Goering y Van Soest 1970) y las que emplean complejos enzimáticos (Aufrère 1982).

El método de Tilley y Terry (1963) es el más antiguo y de mayor difusión. Este sistema de evaluación fue probado con resultados de digestibilidad *in vivo* obtenidos con ovejas estabuladas alimentadas a nivel de mantenimiento. Esta técnica ha sido utilizada durante muchos años para evaluar todo tipo de alimentos para rumiantes sin haberse determinado, en muchos casos, su correspondencia con nuevas mediciones *in vivo* que garanticen su confiabilidad.

La técnica descrita por Goering y Van Soest (1970) analiza la digestibilidad *in vitro* de la fibra insoluble en detergente neutro, además de la digestibilidad de la materia seca. Esto representó un avance sobre el estudio de la digestibilidad de alimentos fibrosos, pero en forma similar a lo comentado para la técnica de Tilley y Terry (1963), para el caso de los silajes la comparación de los resultados *in vitro* con los *in vivo* ha mostrado resultados variables. Tanto la técnica de Tilley y Terry (1963) como la de Goering y Van Soest (1970) son las metodologías *in vitro* más difundidas en los laboratorios comerciales. Las diferencias entre ambas técnicas son importantes para quien interpreta los resultados del análisis, así que se debe conocer la técnica que se usó para la determinación.

Ahora bien, existe una técnica *in vitro* llamada de producción de gas, la cual proveen información sobre la cinética de digestión de los alimentos, esto es la proporción del mismo que es degradada a lo largo del tiempo. La técnica de producción de gas asume que el gas medido es consecuencia de la degradación de la muestra de alimento. Por lo tanto al medir la cantidad de gas producido durante la incubación, se asume que la degradación de la materia seca del alimento evoluciona de modo similar (Wawrzkievicz 2006).

1.6.1 Digestibilidad de las proteínas

La digestibilidad de la proteína se define como la fracción de nitrógeno absorbido en el tracto gastrointestinal con respecto al ingerido con el alimento. La determinación de la digestibilidad de los nutrimentos es el primer paso en la evaluación del potencial de un ingrediente para su uso en una dieta alimenticia (Allan 2000). La digestibilidad es una forma de medir el aprovechamiento de un alimento, es decir, la facilidad con que es convertido en el aparato digestivo en sustancias útiles para la nutrición. Comprende dos procesos, la digestión que corresponde a la hidrólisis de las moléculas complejas de los alimentos, y la absorción de

pequeñas moléculas (aminoácidos, ácidos grasos) en el intestino (Manríquez 1994). Se emplea la digestibilidad para evaluar la calidad de la proteína debido a que no todas son digeridas, absorbidas y utilizadas en la misma medida.

En la actualidad el método sugerido para evaluar la calidad proteica es la calificación del cómputo químico o score de aminoácidos corregido por digestibilidad proteica (protein digestibility corrected amino acid score) o PDCAAS. Este método fue propuesto en 1991 por la FAO y ha reemplazado al PER (Relación de Eficiencia Proteica) como la norma para calcular el porcentaje del valor diario de proteína en el rotulado de los alimentos para adultos y niños mayores de un año de edad. Para cumplir con los requerimientos proteicos más rigurosos, el PDCAAS compara el perfil de aminoácidos de una proteína en estudio con las necesidades del niño mayor a un año que representan los requerimientos más exigentes de los diferentes grupos etarios a excepción de los lactantes que se comparan con la leche humana. El PDCAAS más alto que puede recibir una proteína es 1.0. Las calificaciones por encima de 1.0 se nivelan pues todos los aminoácidos en exceso no son utilizados para síntesis de tejidos, sino que son desaminados y oxidados para ser utilizados en el metabolismo energético o almacenados como tejido adiposo.

El PDCAAS se calcula multiplicando el valor correspondiente al score por el valor correspondiente a la digestibilidad (NRCRDR 1989-1991; Crim y Munro 1988). La digestibilidad ideal es 100%. Las proteínas de origen animal poseen una buena digestibilidad, lo que implica una buena absorción, mientras que las de origen vegetal, la suelen tener generalmente inferior (Gómez 2000).

En la práctica nutricional no se dispone de información recopilada y actualizada con respecto a los valores de score y PDCAAS de los alimentos habitualmente utilizados en los planes de alimentación. Los datos disponibles de score en su mayoría se basan en la comparación con la proteína del huevo y resultan por lo tanto inferiores a los calculados según el patrón de aminoácidos esenciales propuesto por la FAO en 1985 y por la Academia Nacional de Ciencias en 2002. Esta investigación, que se llevó a cabo con la finalidad de calcular el PDCAAS en varios alimentos, resulta de utilidad para precisar el cálculo de la dosis inocua de proteínas dietéticas en situaciones biológicas especiales como embarazo, lactancia,

preescolares, vegetarianos, nefropatías y para la realización de mezclas de proteínas en las que se busque aumentar la calidad de alguna de las mismas (Millward 1992; Schaafsma 2000).

La puntuación de una proteína refleja su contenido en aminoácidos en comparación con la proteína ideal. Sin embargo, cuando se necesita conocer la utilización de los aminoácidos en el organismo es necesario realizar la corrección del valor del puntaje según la digestibilidad proteica (PDCAAS) (Suárez y cols. 2006).

1.6.2 Factores de variación en la digestibilidad

Son muchos los factores que influyen sobre la digestibilidad de los aminoácidos. Los más importantes corresponden a nivel y origen de la fibra, contenido y tipo de factores nutritivos, características físicas y químicas de la proteína así como condiciones de procesado a las que ha podido estar sometido el alimento.

En el caso particular de los cereales el contenido en fibra y las características fisicoquímicas de las proteínas son los principales factores de variación, si bien ciertos tratamientos como la extrusión o la expansión deben ser tenidos en consideración cuando se realicen estos procesados.

Para el sorgo el contenido en taninos tiene que ser tomado en cuenta. Los taninos forman complejos con las proteínas confiriéndoles una resistencia a la hidrólisis enzimática y también pueden formar complejos con las propias enzimas proteolíticas segregadas, con lo cual éstas quedan inactivadas. Por tal razón, el efecto negativo sobre la digestibilidad es tanto incrementando las pérdidas exógenas como endógenas.

1.6.3 Efecto de la fibra

La inclusión de fibra en la dieta origina un aumento de la descamación de las células del epitelio intestinal e incrementa también la secreción de mucina, todo lo cual supone un mayor valor de las pérdidas endógenas de aminoácidos y por tanto una disminución del coeficiente de digestibilidad aparente.

La influencia del contenido en fibra de la dieta sobre estas pérdidas depende a su vez del grado de lignificación.

Por otra parte la lignina es capaz de adsorber aminoácidos y péptidos sencillos impidiendo con ello su absorción intestinal. Este efecto de la lignina puede ser debido a que forma en su molécula enlaces con los aminoácidos como consecuencia de su carácter hidrófobo. También, en estudios *in vitro*, parece haberse demostrado que la fibra puede también adsorber la tripsina y quimotripsina pancreáticas, ya que un exceso de lignina en el medio digestivo provoca un descenso significativo en la actividad de estas enzimas digestivas.

También otras sustancias, como las pectinas, que quedan incluidas dentro del término analítico tan amplio de fibra bruta, pueden formar geles y de esta forma dificultar la acción de las enzimas digestivas. Han comprobado que la inclusión de un 5% de pectinas en dietas para cerdos que contienen un 20% de soja origina un descenso en la digestibilidad de los aminoácidos esenciales de entre 3.5 y 16.3 unidades porcentuales.

1.6.4 Efecto de las características físicas y químicas en la digestibilidad

Es un hecho perfectamente conocido que la digestibilidad de las proteínas y de los aminoácidos dependen también de las características físicas de las proteínas (solubilidad y configuración espacial de la molécula), así como de ciertas características químicas, como son la composición en aminoácidos y la secuencia de los mismos en la estructura de la molécula. Lógicamente estas características físicas y químicas dependen de la proteína alimenticia original o de los cambios que sufra la misma durante los procesos a que pueda ser sometida. Así, por ejemplo, la zeína, principal proteína del maíz, tiene una digestibilidad relativamente pequeña como consecuencia de la baja solubilidad que presenta en el jugo gástrico y en el jugo intestinal.

Las prolaminas y glutelinas corresponden a las proteínas de reserva, que son de mayor solubilidad que las albúminas y globulinas (proteínas fundamentalmente estructurales), la digestibilidad de los aminoácidos en los cereales y sus subproductos es generalmente alta. Sin embargo, el reparto de la proteína bruta en estas proteínas no explica totalmente las variaciones de la digestibilidad de los aminoácidos, ya que el contenido en los diferentes componentes de la fibra y la composición aminoacídica de la proteína son también factores de gran influencia.

La configuración espacial natural de ciertas proteínas resulta ser desfavorable en relación con su digestión en el aparato digestivo. En este sentido, la proteína de muchos alimentos vegetales con alto contenido en cistina presenta una resistencia a la acción enzimática de la tripsina, que se atribuye a la estabilidad de la molécula originada por un gran número de cadenas disulfuro.

La eficacia de digestión de una proteína puede también depender del número de enlaces peptídicos sobre los que las enzimas proteolíticas tienen un lugar de actuación preferencial para la escisión de las proteínas. La pepsina y la quimotripsina rompen fundamentalmente los enlaces peptídicos de los aminoácidos aromáticos y esto puede explicar la acumulación de péptidos en el intestino delgado cuando se suministra gelatina a los cerdos, que, como es sabido, es una proteína con escaso contenido en aminoácidos aromáticos.

La tripsina presenta una estricta especificidad en la ruptura de los enlaces peptídicos correspondientes a los aminoácidos arginina y lisina y, por tanto, puede comprenderse fácilmente que el máximo número de cadenas peptídicas separadas de la molécula proteica sea similar a la suma de los residuos peptídicos de arginina y lisina. Las uniones lisina-prolina y arginina-prolina son, por el contrario, muy resistentes a la acción de la tripsina.

Es lógico entonces pensar que el elevado contenido en prolina de las proteínas de muchos cereales, unido a los normalmente bajos contenidos en arginina y lisina, favorece el que estos dos aminoácidos se encuentren en las estructuras proteínicas unidos a la prolina y con ello se produzca un bajo valor de la digestibilidad de estos dos aminoácidos esenciales. Una excepción la constituye el arroz donde hay una mayor concentración de lisina y arginina en relación a la prolina, esto explica la elevada digestibilidad de la lisina y de la arginina (Jondreville y cols. 1995).

2. Antecedentes

Entre las técnicas químicas de evaluación nutricional oficiales existen algunas que se pueden aplicar independientemente de la especie, pero en otros casos es indispensable que los resultados sean validados con evaluaciones *in vivo*; ésta es la situación de las técnicas de digestibilidad, las cuales constituyen un parámetro de calidad muy importante. No hay evidencia de que la metodología oficial para determinar digestibilidad *in vitro* (AOAC 1990) posea buena correlación con la digestibilidad en el camarón. Por otro lado, existen publicaciones (Carrillo 1994; Lazo 1994; Ezquerro 1997) que han desarrollado metodologías *in vitro* con enzimas de los propios camarones, pero ninguna de éstas se ha oficializado por falta de correlación con los resultados *in vivo*, o porque sólo se pueden aplicar para ingredientes y no para alimentos (Nieto-López 2005).

La digestibilidad *in vitro* es el método más utilizado históricamente para evaluar forrajes y reservas forrajeras. Sin embargo, sobrestima la digestibilidad *in vivo* en un 15%, debido a que está estandarizada con un período de incubación, con licor ruminal, de 48 h en un tubo de ensayo. Este período de incubación excede el tiempo que el silaje es retenido en el rumen, que se estima en menos de 24 horas en vacas lecheras o novillos en engorde de alta producción.

Se está empleando la degradabilidad *in vitro* y la producción de gas *in vitro*. Con este último método uno puede tener un patrón de fermentación en el tiempo. De todas maneras siempre queda pendiente cual es el tiempo adecuado de fermentación que habría que utilizar para que los valores estimen adecuadamente la digestibilidad *in vivo*. Por ejemplo, en la Universidad de California en Davis utilizan la producción de gas *in vitro* en 24 h para determinar la digestibilidad de silajes y forrajes. Un grupo de investigadores de USA (Silage Working Team) recomienda evaluar la digestibilidad del silaje incubando bolsitas de nylon *in situ* por 24 h, pero esto requiere un animal con fístula ruminal, lo que en muchos casos es una complicación. También un Instituto de asesoramiento a productores de USA (FARME) utiliza dicho criterio para balancear dietas de vacas lecheras que consumen silaje como parte de la ración. Se ha observado que los valores de degradabilidad *in situ* en 24 h están en el rango de la digestibilidad *in vivo* (Di Marco 2005).

La mejor forma de determinar el valor nutritivo de un alimento consiste en analizar de manera directa los coeficientes de digestibilidad de sus nutrientes mediante ensayos de digestibilidad *in vivo*. Sin embargo, estos ensayos resultan en muchos casos poco prácticos o inviables para ser utilizados de manera rutinaria por la industria de fabricación de piensos (debido al tiempo y costo económico que conllevan), además de que no se pueden realizar para cada pienso que se fabrique. Por ello resulta de gran interés el desarrollo de nuevos métodos que permitan estimar de un modo sencillo, rápido y poco costoso este valor nutritivo, con base en determinaciones más sencillas.

En la actualidad ya existen ecuaciones de predicción del valor energético, para dietas de conejo, basadas en los constituyentes de la pared de la célula vegetal, por ser éstos los que más condicionan la digestibilidad de la energía (energía bruta consumida menos la cantidad de energía bruta excretada en heces) del alimento.

Los métodos enzimáticos de digestión *in vitro* que tratan de reproducir el proceso de la digestión podrían ser una alternativa. Estos métodos ya han sido contrastados en otras especies monogástricas (cerdos y aves) obteniéndose altas correlaciones con las digestibilidades *in vivo* y por tanto, buenas predicciones, pero la posibilidad de aplicarlos a alimentos para conejos no se había estudiado hasta el momento.

La utilidad de los métodos de digestión *in vitro* se puede contemplar desde dos puntos de vista. Por un lado, a las empresas fabricantes de alimento para animales les supone un importante ahorro de tiempo disponer de un sistema de laboratorio eficaz y rápido para determinar los coeficientes de digestibilidad de los nutrientes (el valor nutritivo) de las raciones que van a suministrar al ganadero, en lugar de tener que hacer ensayos de digestibilidad *in vivo*. Por ello surge la necesidad de predicción del valor nutritivo por métodos exclusivamente de laboratorio. Por otro lado, en investigación científica es muy ventajoso poder hacer una simulación aproximada en el laboratorio de los distintos pasos de la digestión del conejo. Por esto, la digestibilidad *in vitro* se constituye en un sistema nuevo de valoración de alimentos (Ramos-Talma 1995).

El método más empleado en las evaluaciones de la calidad nutricional de las proteínas en general y de las de origen microalgal, ha sido la de eficiencia proteica (PER), el cual está basado en experimentos de alimentación a corto plazo (de tres a cuatro semanas) de ratas

recién destetadas. La respuesta a las dietas se expresa en términos de peso ganado por unidad de proteína consumida. El valor de PER obtenido se compara con el de una proteína de referencia, como la caseína, que en la práctica se asume posee un valor de 2.50.

Aunque la estimación del PER ha sido el método más aplicado para evaluar la calidad de las proteínas, tiene ciertas limitaciones. La principal fuente de errores consiste en utilizar la ganancia de peso como el único criterio *per se* de valor proteico. Por estas razones, se ha recomendado la utilización de otros métodos más específicos para evaluar la calidad de la proteína de la microalga (*Chlorella vulgaris*), como la utilización de proteína neta (UPN) y el valor biológico (VB).

En adición a los métodos biológicos, los datos analíticos sobre la composición aminoacídica de la proteína y su digestibilidad *in vitro* permiten llegar a ciertas conclusiones para determinar su valor nutricional. Entre los métodos utilizados con más frecuencia se destacan las distintas expresiones para el cómputo químico y simulaciones *in vitro* de la digestibilidad *in vivo*, el índice de aminoácidos esenciales modificado posteriormente por *Mitchell*, así como la determinación de la lisina disponible. Aunque estos métodos proporcionan una valiosa información sobre el valor nutritivo de las proteínas, su aplicación en evaluaciones de microalgas ha sido muy limitada. Por su parte, la Food and Drug Administration (FDA) manifestó en 1993 la necesidad de disponer de métodos perfeccionados para la evaluación de la calidad proteica de los alimentos y recomienda la sustitución del PER y la introducción con fines regulatorios del cómputo de aminoácidos corregidos en función de la digestibilidad proteica (PDCAAS), para la evaluación nutricional de los productos destinados al consumo humano. Ha sido demostrada la existencia de una correlación altamente positiva ($r = 0,90$) entre los valores de pH inmediatamente a los 10 min de iniciada la digestión *in vitro*, con el sistema enzimático tripsina-quimotripsina-peptidasa y la digestibilidad aparente *in vivo* en ratas, lo cual constituye un elemento de gran valor predictivo en la realización de evaluaciones nutricionales, no referido con anterioridad en las investigaciones efectuadas con microalgas (Morris-Quevedo y cols. 2003).

2.1 Contenido de proteína en hongos

Los hongos comestibles son ricos en proteínas de calidad, muy parecidos al contenido de proteína que poseen las leguminosas y la leche, e incluso algunos de ellos poseen proteínas cuya digestibilidad es mayor a la de leguminosas (Cisterna 2002).

El contenido de proteína cruda en los hongos muestra una extrema variación entre distintas especies. La proteína puede variar desde 4 a 9% en peso seco para especies de *Auricularia*, hasta valores tan altos como 44% en peso seco para especies de *Agaricus*.

En las especies de *Pleurotus* el contenido de proteína varía de 8.9% para *P. opuntia* y 38.7% para *P. limpidum* ambas en peso seco. La composición del sustrato tiene una influencia significativa sobre el contenido de proteína de los hongos.

Bautista y cols. (1999) realizaron la determinación bromatológica de tres cepas mexicanas de *P. ostreatus*. El análisis, expresado en g/100 g en peso seco, reveló que contenían un 28.50% de proteína. Así mismo, encontraron cantidades significativas de riboflavina, tiamina, niacina y ácido ascórbico en peso seco; los contenidos de calcio y fósforo no fueron significativos. Se concluyó que *P. ostreatus* puede proporcionar a la dieta algunas vitaminas del complejo B, fibra dietética, proteína y ácido linoleico.

En el año 2000, Vargas-Álvarez determinó la digestibilidad *in vitro* por el método de Torry de la proteína en base seca de *Agaricus bisporus* con un 70%. También el champiñón contiene una gran variedad de ácidos grasos y altas concentraciones de ácido palmítico y linoleico.

Bermúdez y cols. (2003) determinaron el contenido de proteína en diferentes periodos de tiempo de exposición a la luz durante el periodo de fructificación (4, 8 y 12 hrs.) en *P. ostreatus*. Se demostró que la luz no afecta el contenido de proteína bruta ni los niveles de aminoácidos en la biomasa fúngica obtenida. Los contenidos de proteína bruta en los tres grupos experimentales resultaron similares a los referidos para el mismo hongo cultivado sobre pulpa de café con un 28.90% en base seca. Este porcentaje es superior al de *Agaricus bisporus*, especie mayormente comercializada a escala internacional, los niveles de proteína bruta fueron de 26.3%.

Ahora bien, Cruz y cols. (2004) reportaron para *P. ostreatus* (cultivado sobre residuales azucareros) en peso seco un contenido de proteína bruta de 24.20%, así como 13.90% de fibra bruta.

Por otra parte, Lelley (2004) reportó un 21.7% de proteína en peso fresco de *P. ostreatus*. Así mismo, reportó los siguientes aminoácidos (mg/100gr hongo fresco): cisteína 28, isoleucina 82, leucina 139, lisina 126, metionina 35, tirosina 219, treonina 219 y valina.

En 2005, Belewu realizó la comparación del contenido de proteína en *Volvariella volvacea* cultivada sin y sobre hojas de plátano. El efecto observado fue que el hongo cultivado en ausencia de hojas de banana obtuvo un contenido de proteína cruda de 6.81%, el cual es menor al 10.25% presente en los hongos cultivados utilizando como sustrato hojas de banana.

Cortés y cols. (2007) realizaron el análisis bromatológico en peso fresco de *P. ostreatus* obteniendo un 23.05 % de proteína por cada 100g.

Paraskevi en 2009 reportó el contenido de proteína en diversas especies de hongos comestibles como *Agaricus campestris* (3.2g), *Boletus edulis* (3.8g), *Cantharelius cibarius* (1.9g), *Lactarius deliciosus* (1.1g), *Lepista personata* (4.0 g) y *Macrolepiota procera* (4.5 g). Por otro lado, realizó un análisis del contenido de proteína en hongos colectados en el oeste de Macedonia y Epiro de Grecia. Los datos obtenidos fueron los siguientes *Cantharellus cibarius* 21.57%, *Rusula delica* 26.10%, *Ramaria largentii* 28.80%, *Hygrophorus russula* 32.47%, *Amanita cesaria* 34.77%, *Fistulina hepatica* 22.60 %, *Boletus aureus* 27.17 %, *Armillaria tabesceus* 22.90 %, *Armillaria mellea* 24.47 % y *Lepista nuda* 34.37% referidos a peso seco.

Aguilar (2003) mencionan que al realizar la incorporación de cáscara de pitaya a la paja de trigo como sustrato para *P. ostreatus* generó un incremento significativo en el contenido de proteína, siendo superiores con respecto al control, ya que se alcanzó un valor de 16.04% y el control tuvo un valor de 8.58%. Escalona (2002) tuvo un valor de 14.7% para setas cultivadas con residuos de azúcar, otros autores han reportado valores desde un 10% hasta un 30% en base seca (Regés 2002; Galicia 1994; Sánchez y Royse 1998).

2.2 Digestibilidad en alimentos

Los valores estimados de digestibilidad aparente de las fracciones correspondientes a proteínas y lípidos, sin incluir los aportes de compuestos endógenos de la misma naturaleza, son siempre menores a los coeficientes de digestibilidad verdadera. La digestibilidad depende mayormente de la composición nutritiva de la ración en estudio, siendo a su vez afectada por el hecho de que las heces contienen cantidades importantes de materiales de origen no dietético (Merchen 1993). Éstas, constituyen una importante vía de excreción de compuestos nitrogenados, grasos, minerales y glúcidos no fibrosos de origen endógeno (Church y Pond 1994), encontrándose reportes que indican que no hay secreción de carbohidratos a nivel intestinal (Bondi 1989). A esto se debe que los coeficientes de digestibilidad determinados por diferentes métodos se denominan “aparentes”. Es difícil cuantificar con exactitud las cantidades de origen endógeno de un determinado elemento presente en las heces, ocasionando la subestimación de su digestibilidad verdadera (Lachmann y Araujo-Febres 1999).

Ramírez y Ortiz (2000) aislaron, caracterizaron y evaluaron la digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC de las proteínas del grano de los genotipos venezolanos de *Canavalia ensiformis* (leguminosa). Estos genotipos presentaron un contenido proteico promedio de 31.37%. El aislamiento de las proteínas lo llevó a cabo según su solubilidad, lográndose extraer en promedio 84.57% de albúminas, globulinas y nitrógeno no proteico y 15.43% de glutelinas reducidas insolubles en alcohol. La digestibilidad proteica *in vitro* reveló que las globulinas fueron las proteínas que presentaron mayor digestibilidad (65.20%), seguidas de las albúminas (58.90%) y de las glutelinas (37.28%).

Muñoz-Cifuentes (2005) menciona que desde el punto de vista dietético, es importante conocer el contenido proteico de *Agaricus bisporus* (51.9%) respecto a la carne (83.7%), además de que presenta un 45% de digestibilidad por el mismo método y un 88.5% de solubilidad total, al mismo tiempo de contar con aminoácidos esenciales como lisina, triptófano y leucina.

Beltrán-Orjuela (2006) menciona que *Lentinula edodes* (hongo shiitake) presenta un 36.2% de proteína en base seca, y que posee un 11.8% de fibra, la cual se considera un componente esencial para los procesos digestivos. En cuanto a la digestibilidad Martínez-

Carrera y cols. (2004) reporta una digestibilidad *in vitro* por el método de Torry de 80 a 87% de la proteína de *Lentinula edodes*.

Aguilar (2003) menciona que la mayoría de los hongos comestibles tienen un contenido de proteínas cercano a la mitad de lo que tiene el huevo y una digestibilidad del 80% por el método de la AOAC y un índice de aminoácidos de más de 60 en comparación con lo que tiene el huevo. Con la ventaja, de que estas fuentes de proteínas no contienen índices elevados de colesterol como el huevo. Además muestra el índice de aminoácidos, el valor biológico y la digestibilidad *in vitro* de diversos hongos del género *Pleurotus* (Tabla 1).

Tabla 1. Valor nutritivo de hongos comestibles utilizando como referencia al huevo.

Especie	Índice de aminoácidos	Valor biológico	Digestibilidad <i>in vitro</i>
<i>P. ostreato roseus</i>	95.7	92.7	89
<i>P. floridin</i>	84.5	80.4	79
<i>P. flabellatus</i>	82.7	78.4	87
<i>P. sajor caju</i>	70.9	59.2	63
<i>P. ostreatus</i>	64.8	58.9	n.d.
<i>Agaricus bisporus</i>	55.8	49.1	n.d.
<i>Volvariella displasia</i>	87.9	84.1	n.d
<i>Lentinus edodes</i>	55.8	49.1	n.d

Valencia-del Toro (2006) evaluó la digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC de tres cepas de *Pleurotus ostreatus*, reportado para la cepa PORO una digestibilidad de 98.1%, para INI8 (98.2%) y en IE136 (98.0%).

Castelán-Vega (2002) realizó la digestibilidad *in vitro* por el método de Torry de tres cepas de *Pleurotus ostreatus*, obteniendo que para la cepa INIREB-8 existe un 98.09%, para la STAMETES un 98.10% y para IE-136 98.2%.

Hernández-González en 2000 evaluó el contenido nutricional de *P. ostratus* producido en dos tratamientos, el primero empleando bagazo de agave con Ca (CO₃)₂ y el segundo

utilizando corazones de col como sustrato. Encontró que el mayor contenido de proteínas fue de (30.41 %) de *P. ostreatus* cultivado en agave tratado con Ca (CO₃)₂. La digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC fue de 72.88 % en *P. ostreatus* cultivado en agave tratado con Ca (CO₃)₂ y la cantidad mayor de triptofano fue encontrada en *P. ostreatus* cultivado sólo en agave.

Ahora bien, existen reportes de digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC de diversas especies de *Pleurotus* dados por Bano y cols. (1981) para *P. eous* 89%, *P. florida* 79%, *P. eous* 89%, *P. florida* 79%, *P. flabellatus* 87%, *P. sajor-caju* 63% y *P. eapidus* 76.93%. Así mismo, Khanna y cols. (1986) reportó la digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC de *P. florida* 89.07%, *P. sajor-caju* 81.32% y *P. ostreatus* 77.62%.

Gallegos-Tintoré y cols. (2004) extrajo y caracterizó las fracciones proteicas solubles del grano *Phaseolus lunatus*. El propósito del trabajo consistió en determinar diversas características estructurales y nutrimentales de las fracciones de globulina, albúmina, glutelina y prolamina separadas por solubilidad. Los resultados de digestibilidad por el método de Torry de las fracciones resultó ligeramente baja con respecto a la harina cruda reportada por Pérez (1999), con 72.42%, la digestibilidad *in vitro* de las globulinas fue de 80%, albúminas 69%, glutelinas 67% y prolaminas 66%. Concluyó que esta diferencia en digestibilidad puede estar asociada a la estructura de las proteínas ya que al ser terciaria o cuaternaria presentan diferente susceptibilidad a las enzimas proteolíticas.

Malca y cols. (2006), quienes compararon dos técnicas para determinar la digestibilidad, una *in vivo* y otra *in vitro* (AOAC), concluyeron que existe una alta correlación entre los métodos de determinación de la digestibilidad proteica *in vivo* e *in vitro* (coeficiente de correlación = 0.94). La digestibilidad proteica *in vitro* tiende a ser mayor que la digestibilidad proteica *in vivo* sin embargo concluyen que la técnica *in vitro* es un buen método para estimar la digestibilidad proteica del insumo o alimento concentrado para caninos.

Las investigaciones sobre la proteína cruda de los hongos sugieren que solamente entre el 34 y 89% de la proteína (N x 6.25) es digerible. Este coeficiente reducido de digestibilidad puede parcialmente ser explicado por el hecho de que los hongos contienen cantidades significantes de nitrógeno no proteico en sus paredes celulares quitinosas (Bautista 1997).

En su revisión, Crisan y Sands (1978), encontraron que había muy pocos estudios *in vivo* sobre la calidad nutricia de los hongos y que los resultados de estas pruebas comparó la proteína de los hongos con la de la carne y otros vegetales. Investigaciones realizadas en los años 40, indicaron que para mantener un equilibrio nutricional, un humano adulto de 70 kg de peso, requería entre 100 y 200 g de hongos (peso seco). Sin embargo, estudios posteriores confirmaron el hecho de que los hongos tienen un buen valor nutricional, pero que no pueden servir como única fuente de proteína. En ausencia de estudios en ratas, los autores consideraron válido determinar el valor nutricional de los hongos partiendo de datos de contenido de aminoácidos informados en la literatura. Con los datos recopilados calcularon el índice de aminoácidos esenciales utilizando el patrón de FAO en 1973, el valor biológico (empleando la ecuación de regresión de OSER) y el puntaje o calificación química basada en el aminoácido limitante, comparado con una proteína patrón. Los resultados del índice de aminoácidos esenciales estuvieron entre 72.9 y 98.6 para *Agaricus bisporus*; *Pleurotus* se situó entre 70.3 y 91.3 cuando se usó el patrón de FAO. En las conclusiones de este estudio se afirma que el valor nutricional de los hongos es variable aún entre las mismas especies y que por ejemplo, los valores de lisina biodisponible van desde 10 a 62%, por lo que no se puede generalizar con respecto a la calidad nutricia. Por esta razón, habrá especies cuya contribución a la dieta sea muy buena y otras cuya aportación sea mínima.

Arce y cols. (2003) estandarizaron un método enzimático para medir la digestibilidad de forrajes empleando la enzima celulasa proveniente del hongo *Penicillium funiculosum* y lo compararon con el método de digestibilidad *in vitro* de Torry y Tilley (1963). Para la estandarización de la técnica se utilizaron como sustrato forrajes de digestibilidad *in vitro* conocida: alfalfa y paja de avena; y para la comparación entre métodos utilizaron forrajes de diferente calidad provenientes de varias zonas de Perú. La concentración óptima enzima-sustrato que hallaron fue de 200 y 250 mg, respectivamente. Los valores de digestibilidad del método enzimático fueron estadísticamente menores que los del método *in vitro*, y el coeficiente de correlación fue de 0.987 ($p < 0.001$). El método de digestibilidad enzimática demostró ser un procedimiento de laboratorio simple y rápido para la evaluación de los forrajes.

Nieto-López y cols. (2005) mencionan que entre las técnicas químicas de evaluación nutricional oficiales existen algunas que se pueden aplicar independientemente de la especie, pero en otros casos es indispensable que los resultados sean validados con evaluaciones *in vivo*; ésta es la situación de las técnicas de digestibilidad, las cuales constituyen un parámetro de calidad muy importante. En este trabajo se propusieron evaluar la correlación de la digestibilidad *in vivo* en camarón vs. la digestibilidad *in vitro*, determinada con el método del AOAC, y la metodología desarrollada para camarón más eficiente reportada hasta el inicio de este trabajo (pH-stat), utilizando como sustrato 15 harinas de pescado de calidad variable, previamente evaluadas en salmónidos y en mink, así como otros ingredientes y alimentos balanceados terminados.

Ahora bien, como hemos visto existen trabajos de digestibilidad *in vitro* en diversos alimentos, además de diversas fracciones proteicas, incluso, en diversos hongos así como del mismo *P. ostreatus* pero no así de sus fracciones. Es por ello que se plantea la siguiente justificación.

3. Justificación

Al realizar propuestas de alimentos que puedan servir como opciones para mejorar el abastecimiento de proteínas, es necesario observar que dicho compuesto sea aprovechable por el organismo al cual va dirigido. Una de las formas en que esto puede medirse es a través de la digestibilidad *in vitro*.

Por tal razón, el contar con los valores de digestibilidad *in vitro* de la proteína del cuerpo fructífero del hongo *P. ostreatus* así como de sus fracciones proteicas nos brindará la oportunidad de poder manejar este recurso de una manera optimizada en la industria ya sea utilizando el cuerpo fructífero o por separado cada una de sus fracciones.

4. Pregunta de investigación

¿Qué digestibilidad, evaluada *in vitro*, presentarán las proteínas de la harina desgrasada del cuerpo fructífero del hongo *P. ostreatus* y las que se encuentran en las fracciones proteicas de *Pleurotus ostreatus*?

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la digestibilidad *in vitro* de las proteínas de la harina desgrasada y de las fracciones proteicas del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* por los métodos de la AOAC y Torry modificado.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la digestibilidad *in vitro* de las proteínas de la harina desgrasada del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* por los métodos de la AOAC y Torry modificado.
- Evaluar la digestibilidad de las proteínas de las fracciones proteicas del cuerpo fructífero *P. ostreatus* por los métodos de la AOAC y Torry modificado.
- Comparar las digestibilidades obtenidas con la de la caseína medida por los mismos métodos (AOAC y Torry modificado).

6. Materiales y Métodos

6.1 Material biológico

Cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*, los cuales fueron de una cepa comercial procedente de Chimalhuacán, Estado de México, crecidos sobre sustrato de paja, con una edad de 35 días (primera cosecha).

6.2 Obtención de la harina y fracciones de *P. ostreatus*

Se obtuvo la harina integral por pulverización de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* deshidratados en un horno a 45° C, posteriormente, para su uso se desgrasó con acetona al 10% (Córdoba-Salgado 1995). Al finalizar este proceso, fue secada y pulverizada nuevamente.

Aislados proteicos del cuerpo fructífero de *P. ostreatus*.

- Albúminas (Extracción acuosa).

Se preparó una suspensión 4% (p/v) en agua a pH 7 de harina desgrasada.

- Globulinas (solubilización salina)

Se preparó una suspensión 4% (p/v) en NaCl 1.0M y otro en Na₂SO₄ 0.4M de harina desgrasada.

- Glutelinas (solubilización alcalina)

Se preparó una suspensión al 10% (p/v) en agua y se ajustó el pH de 10 y otra igual a pH de 11 con NaOH 0.1 M de harina desgrasada.

- Prolaminas (solubilización alcohólica)

Se preparó una suspensión al 4% (p/v) en alcohol al 70% de harina desgrasada.

En todos los casos, después de preparar las suspensiones se mantuvieron en agitación constante durante 60 min. Cada suspensión se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min., para después

desechar el residuo y recuperar el sobrenadante. El pH se ajustó a 4 con ácido tricloroacético al 10 % para precipitar por pI a las proteínas (Paredes-López y cols. 1988; Soriano y cols. 1992), posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos, y se recuperó el precipitado que es el concentrado proteínico, el cual se secó en estufa a 40° C aproximadamente durante 30 h. Se pulverizó y almacenó a temperatura de refrigeración para determinar del contenido de proteína (Córdoba-Salgado 1995).

6.3 Determinación de proteína cruda por el método Kjeldahl

Se analizó el contenido de nitrógeno de la proteína alimentaria (Kjendahl). Se calculó el contenido de las proteínas multiplicando el contenido en nitrógeno por 6.25.

Se utilizó el método de Kjeldahl (AOAC 1980). La mezcla totalmente homogénea fue digerida en matraces usando un catalizador (CuSO_4 y K_2SO_4 , 1:9) para digestión Kjeldahl y 2 ml. de ácido sulfúrico concentrado, la solución digerida se diluyó y se transfirió al aparato microkjeldahl, se usó un mínimo de agua, se alcalinizó la solución que ya se encontraba en el evaporador del aparato con 15 ml de NaOH 40% y el amoniaco liberado se destiló con 10 ml de ácido bórico al 2% con 4 gotas de indicador (solución alcohólica de rojo de metilo 0.2% y solución acuosa de azul de metileno 0.1% en partes iguales) por 5-10 min., el destilado se tituló con HCl 0.1N.

6.4 Obtención de proteasas para la digestibilidad *in vitro*.

Para realizar la prueba de digestibilidad *in vitro* por métodos enzimáticos, se realizó con proteasas extraídas del estómago de res. Se licuaron 250 g de estomago de res en 1.5 L de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5, la suspensión se centrifugó y filtró para obtener el extracto enzimático. La actividad de proteasas se evaluó por el método de Kunitz (1947). La mezcla de reacción se preparó con 450 μl de caseína al 1% en buffer de fosfatos a pH 6.5 y 50 μl de extracto con actividad de proteasas, se incubó a 35°C durante 15 min. La reacción se detuvo con 750 μl de ácido tricloracetico al 5%. Las muestras se centrifugaron a 15000 x g durante 30 minutos y al sobrenadante se le leyó la absorbancia a 280 nm. Una unidad de actividad de

proteasas se consideró como la cantidad de enzima que provocó un cambio de 1 unidad de absorbancia por minuto de reacción.

6.5 Determinación de la digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC (The Scientific Association Dedicated to Excellence in Analytical Methods)

Se basó en crear un medio similar al del organismo para que mediante la capacidad que tienen las enzimas digestivas se degraden las proteínas y con ella se pueda determinar la digestibilidad, es decir, la cantidad absorbida de este nutrimento.

A 1g de muestra finamente molida se le agregaron 10 ml de agua destilada, dejando hidratar la muestra en refrigeración a una temperatura de 5°C durante una hora. Se ajustó la muestra a pH de 8.0 a 37°C. Así mismo, se ajustó la solución enzimática de estómago de res. Se agregó a la muestra 1 ml de jugo enzimático de estómago de res, el cual presentó 0.7 U/ml de actividad de proteasas y la mezcla resultante se colocó en un baño a 55°C donde permaneció 10 minutos. Posteriormente, se cambió de baño de agua a 37°C donde permaneció 20 minutos, pasado el tiempo se midió el pH del hidrolizado enzimático. Con cada muestra (fracción proteica) o conjunto de muestras se realizó un control con caseína, esto para asegurarse que existiera actividad enzimática. Finalmente, la digestibilidad de proteína *in vitro* de la muestra se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (x)$$

Donde: x = lectura de pH, que se obtiene después de 20 minutos de incubación. (AOAC 1990).

6.6 Evaluación de la digestibilidad *in vitro* por el método de Torry modificado

La digestibilidad se determinó empleando tres pseudorélicas. En todos los casos se utilizó 1g de harina que fue colocado en una solución 0.0002% y 0.075N de ácido clorhídrico y extracto de estómago de res (0.7 U/ml de actividad de proteasas). Las muestras se incubaron con agitación constante a 45°C, durante 24 horas. Al final del período de incubación las muestras se filtraron y lavaron con acetona. La proteína residual se determinó con el método Kjeldhal. El porcentaje de digestibilidad se determinó en la forma habitual para los tratamientos de

“pepsina + ácido”. El valor final de “nitrógeno digestible en pepsina corregida para ácido” se calcula de la siguiente forma:

$$100 (P - A) - (100 - A)$$

Donde P = porcentaje de nitrógeno digestible en pepsina y A = porcentaje de nitrógeno soluble en ácido (Dale 1984).

7. Resultados y discusiones

7.1 Determinación de la proteína cruda de las fracciones proteicas de *P. ostreatus*

Los valores obtenidos respecto al contenido de proteína cruda de las fracciones proteicas del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* fueron glutelina 8.65% con el porcentaje más alto, globulina 7.23%, albúmina 6.47% y 5.70% para prolamina, todos reportados en base seca (figura 5). Las fracciones que alcanzaron un mayor contenido de proteína cruda coincide con las fracciones que alcanzan un mayor rendimiento como son las solubilizadas en soluciones salinas y alcalinas, esto debido a la capacidad de las proteínas de aumentar su solubilidad en estas soluciones.

Respecto al contenido total de proteína cruda se han realizado diversos estudios en diferentes especies del género de *P. ostreatus* como los realizados por Montoya y Restrepo (2006) quienes reportan en *P. sajor-caju* 8.62% de proteína cruda, *P. pulmonarius* 11.04% y para *P. ostreatus* 25.03%. Al comparar estos resultados con los realizados en este estudio se observa que son superiores con una diferencia notoria para el caso *P. sajor-caju* y *P. pulmonarius*. En el caso específico de *P. ostreatus* sigue siendo mayor el contenido de proteína cruda en este estudio (28.05%) al reportado por Montoya y Restrepo (2006), las diferencias en este caso probablemente se deben al factor de conversión que utilizaron en su investigación, pero podría ser de importancia el sustrato y condiciones en las que fueron cultivados los hongos, pues esto se ha observado en algunos estudios.

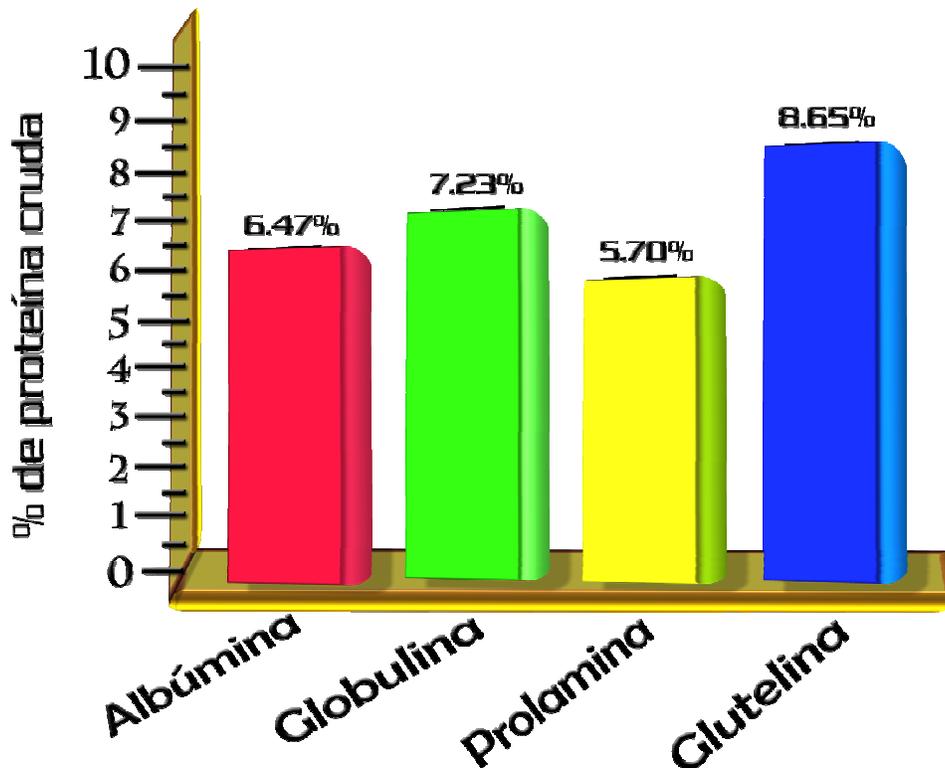


Figura 5. Contenido de proteína cruda de las fracciones proteicas del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*.

En el estudio bromatológico realizado por Bautista y cols. (1999), para tres cepas mexicanas de *P. ostreatus*, revelaron que contenían un 28.50% de proteína en base seca, 0.45% mayor a lo encontrado en nuestros resultados para *P. ostreatus*. Además, encontraron cantidades de riboflavina, tiamina, niacina y ácido ascórbico en peso seco, no así con el calcio y el fósforo. Concluyeron que *P. ostreatus* proporciona a la dieta algunas vitaminas del complejo B, fibra dietética, proteína y ácido linoleico.

Ahora bien, el contenido nutricional de *P. ostreatus* cultivado en dos diferentes tratamientos (bagazo de agave y corazones de col), se encontró que la mayor cantidad de proteínas fue de 30.41% en peso seco de acuerdo a lo reportado por Hernández-González (2000), superior en 2.36% a lo encontrado en nuestro trabajo, lo cual podría deberse a que el cultivo de *P. ostreatus* en nuestro trabajo fue hecho sobre paja y no con sustrato enriquecido,

ya que se ha reportado que la composición del sustrato, método de cultivo y origen geográfico de la cepa tiene una influencia significativa sobre el contenido de proteína de los hongos. Rodríguez y cols. (2005) reportaron el contenido de proteína en peso seco para *P. ostreatus* sembrado en diferentes sustratos: pulpa de café con 21.42%, rastrojo de sorgo 27.56%, rastrojo de maíz 20.76%, pasto bermuda 25.7%. Ahora bien, Bermúdez cols. (2003) mencionan que *P. ostreatus* cultivado sobre pulpa de café presentó un 28.90% de proteína en base seca, en nuestro estudio reportamos un 28.05% de proteína en base seca, 0.85% menor que el reportado para *P. ostreatus* con las diferentes exposiciones a la luz (4, 8 y 12 hrs.), no obstante el porcentaje es superior al de *Agaricus bisporus* donde los niveles de proteína bruta fueron de 26.3% de acuerdo a lo reportado por Bermúdez y cols. en 2003, la diferencia con nuestros resultados de proteína bruta fue de 1.75%. Con ello, podemos decir que a pesar de ser una cepa comercial y no especificar el periodo que tuvo el hongo de exposición a la luz, no se ve afectado el contenido de proteína bruta ni los niveles de aminoácidos en la biomasa fungica.

El contenido de proteína bruta de *P. ostreatus* cultivado sobre residuos azucareros fue de 24.20% según lo reportado por Cruz y cols. (2004), este contenido de proteína es inferior a lo que reporta nuestro estudio con una diferencia del 3.85%.

Por un lado, Lelley en 2004 reportó un 21.7% de proteína en peso seco para *P. ostreatus*. Por otro lado, Cortés y cols. en 2007 realizaron el análisis bromatológico en peso fresco de *P. ostreatus* obteniendo un 23.05 % de proteína, la proteína en ambos estudios es inferior a lo que reportamos en nuestro estudio con un 28.05% con una diferencia de 6.35% y 5% respectivamente.

Beltrán-Orjuela (2006) en su estudio menciona que *Lentinula edodes* (shiitake) presenta un 36.2% de proteína en base seca. Este porcentaje es mayor a lo reportado en nuestro estudio para *P. ostreatus* con un 28.05%.

En 2005 Belewu, realizó la comparación del contenido de proteína en *Volvariella volvaceae* cultivado sin/sobre hojas de plátano. El efecto observado fue el siguiente el hongo cultivado en ausencia de hojas de banana obtuvo un contenido de proteína cruda de 6.81%, el cual es menor al 10.25% presente en los hongos cultivados utilizando como sustrato hojas de banana los porcentajes de proteína son significativamente menores a lo que se reportan en nuestra investigación con un 28.05% de proteína en base seca.

Paraskevi en 2009 reportó el contenido de proteína en peso seco en diversas especies de hongos comestibles como *Agaricus campestris* (32%), *Boletus edulis* (38%), *Cantharelius cibarius* (19%), *Lactarius deliciosus* (11%), *Lepista personata* (40%) y *Macrolepiota procera* con un 45%). Por otro lado, realizó un análisis del contenido de proteína en hongos colectados en el oeste de Macedonia y Epiro de Grecia. Los datos obtenidos fueron los siguientes *Cantharellus cibarius* 21.57%, *Rusula delica* 26.10%, *Ramaria largentii* 28.80%, *Hygrophorus russula* 32.47%, *Amanita cesaria* 34.77%, *Fistulina hepatica* 22.60 %, *Boletus aureus* 27.17 %, *Armillaria tabesceus* 22.90 %, *Armillaria mellea* 24.47 % y *Lepista nuda* 34.37% referidos a peso seco.

7.2 Prueba de proteasa

Se observó un valor de 0.7 U/ml. Cabe mencionar que se realizó la prueba con dos ablandadores de carne comerciales, pero mostraron valores bajos.

7.3 Digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC

Los resultados obtenidos en la prueba de digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC de las fracciones proteicas de *Pleurotus ostreatus* se describen en la figura 6. En ella se observa que la caseína (testigo) tuvo una digestibilidad del 100%, seguida de la harina del hongo con un 97.26%, la glutelina y la prolamina son las fracciones intermedias y tienen una digestibilidad de 95.87% y 92.76% respectivamente. La globulina registró una digestibilidad de 89.23% y finalmente la albúmina presentó la menor digestibilidad con un 82.69%.

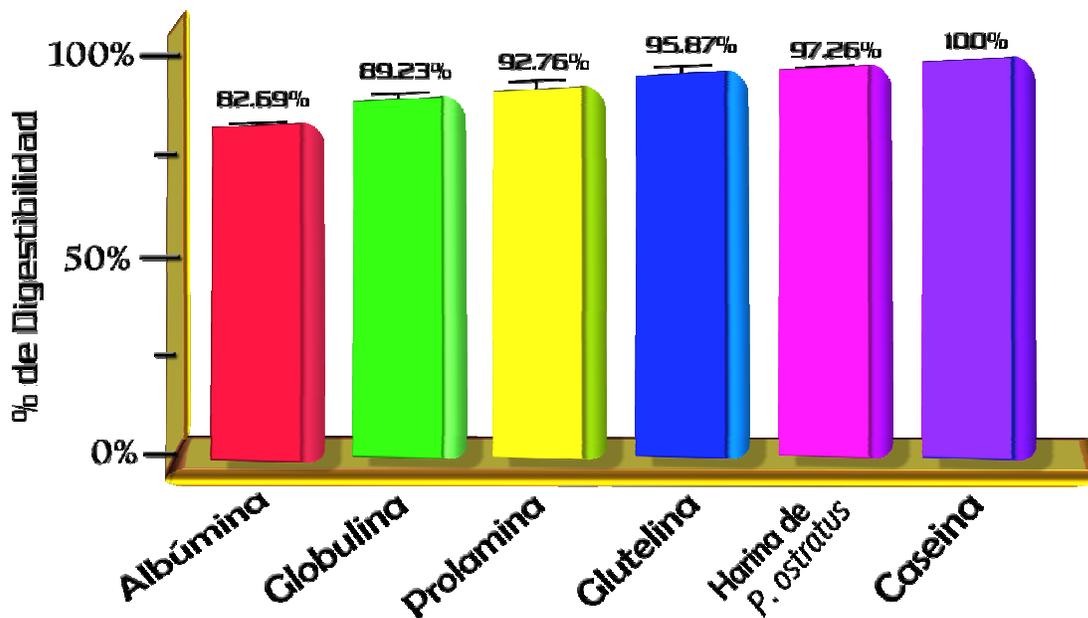


Figura 6. Digestibilidad *in vitro* de las fracciones proteicas, de la harina del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* y de la caseína de la leche.

7.4 Digestibilidad *in vitro* por el método Torry modificado

Los resultados obtenidos en la prueba de digestibilidad *in vitro* de las fracciones proteicas de *Pleurotus ostreatus* por el método de Torry modificado se muestran en la figura 7. En ella se observa que la caseína (testigo) tuvo una digestibilidad del 100%, seguida de la harina del hongo con un 98.38%, la glutelina y la globulina tienen una digestibilidad de 93.67% y 93.29% respectivamente. La prolamina registró una digestibilidad de 92.45% y finalmente la albúmina presentó la menor digestibilidad con un 83.70%.

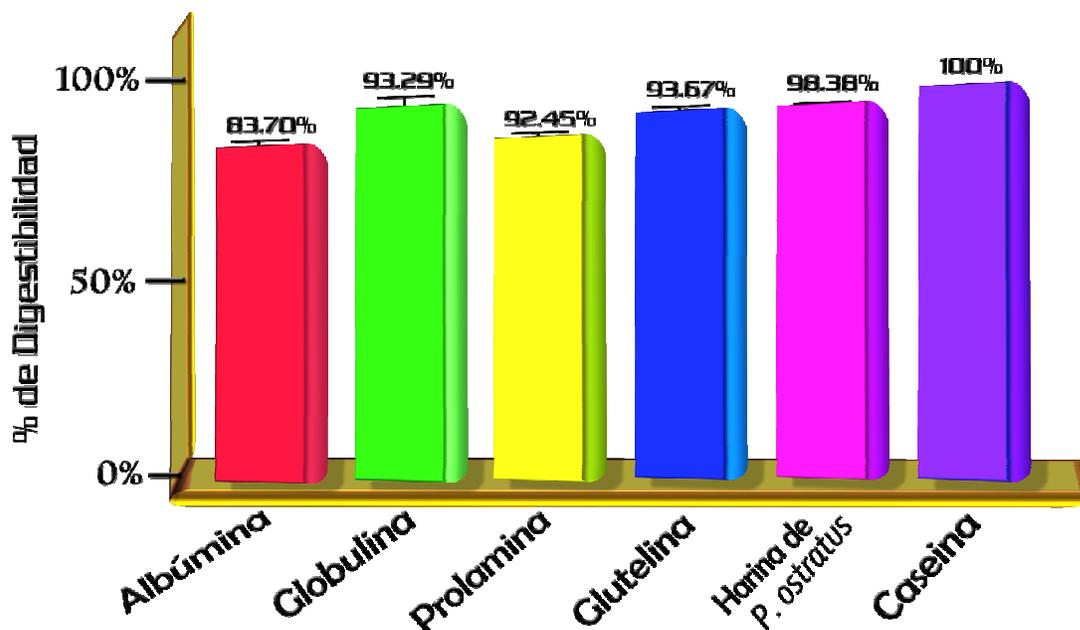


Figura 7. Digestibilidad *in vitro* por el método de Torry modificado de las fracciones proteicas, de la harina del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* y de la caseína de la leche.

Los resultados obtenidos en la digestibilidad *in vitro* de la harina de *P. ostreatus* (97.26%) con la técnica de la AOAC son similares a los reportados para tres cepas de *P. ostreatus*, para la cepa PORO una digestibilidad de 98.1%, para INI8 (98.2%) y en IE136 (98.0%). Así mismo, la digestibilidad es mayor por el método de Torry modificado con un 98.38%. Ahora bien, los resultados de ambas técnicas son altos en comparación con la digestibilidad *in vitro*, existen reportes de digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC de diversas especies de *Pleurotus* dados por Bano y cols. (1981) para *P. eous* 89%, *P. florida* 79%, *P. eous* 89%, *P. florida* 79%, *P. flabellatus* 87%, *P. sajor-caju* 63% y *P. eapidus* 76.93%. Así mismo, Khanna y cols. (1986) reportó la digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC de *P. florida* 89.07%, *P. sajor-caju* 81.32% y *P. ostreatus* 77.62%.

Aguilar (2003) menciona que la mayoría de los hongos comestibles tienen un contenido de proteínas cercano a lo que contiene el huevo, el cual presenta una digestibilidad del 80% por el método de la AOAC, en este caso *P. ostreatus* a pesar de ser bajo en cuanto al

contenido proteico posee un porcentaje de digestibilidad superior a la proteína del huevo con un 98.38%.

Castelán-Vega (2002) realizó la digestibilidad *in vitro* por el método de Torry de tres cepas de *P. ostreatus*, obtuvo que para la primera cepa INIREB-8 existe un 98.09% de digestibilidad, este resultado es superior a lo encontrado en nuestro estudio con un 0.83% de diferencia con el método de la AOAC pero no así con el método de Torry modificado donde es mayor la digestibilidad la de nuestro estudio con un 0.29%. Para la segunda cepa STAMETES obtuvo una digestibilidad de 98.10%, y para la tercera cepa IE-136 98.2%, ambos resultados son superiores a lo reportado en nuestro estudio con una diferencia de digestibilidad con el método de la AOAC de 0.84% y 0.94% respectivamente. Por el contrario, con el método de Torry modificado nuestro resultado es mayor que lo reportado por Castelán- Vega (2002), ya que hay una diferencia de 0.28% y 0.18% respectivamente.

En el año 2000 Hernández-González determinó el contenido nutricional de *P. ostreatus* crecido sobre dos tratamientos empleando bagazo de agave y corazones de col como sustrato. Encontraron que el mayor contenido de proteínas fue de 30.41 % que obtuvo *P. ostreatus* cultivado en agave enriquecido con col. La mayor digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC fue de 72.88 % en *P. ostreatus* cultivado en agave tratado con $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$. Lo cual indica que el contenido de proteína incrementa pero no esta relacionado con un aumento en la digestibilidad de la proteína.

Aguilar (2003) mostró la digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC de diversos hongos del género *Pleurotus*, al comparar los valores de digestibilidad con nuestros resultado se observa que son menores los porcentajes de digestibilidad al los reportados es su estudio, aun cuando el valor biológico es alto.

Ahora bien, la digestibilidad proteica *in vitro* de *P. ostreatus* comparada con otros hongos como *Agaricus bisporus* es superior, ya que Vargas-Álvarez (2000) mencionó que la proteína en base seca de *A. bisporus* tiene una digestibilidad del 70% por el método de Torry y Muñoz-Cifuentes (2005) de 45% por el mismo método; ambos reportes son bajos comparados con los resultados de nuestro estudio para la proteína de *P. ostreatus* con un 98.38%. En cuanto a la digestibilidad por el método de Torry de *Lentinula edodes* (hongo shiitake)

reportado por Martínez-Carrera y cols. (2004) menciona de un 80 a un 87%. De igual forma es bajo con lo reportado en nuestro trabajo.

La digestibilidad de la albúmina por los métodos de la AOAC y de Torry modificados son de 82.69% y 83.70% respectivamente, las cuales son bajas en comparación con la digestibilidad de la albúmina de huevo que es de 97%, en cambio son altas con algunas leguminosas las cuales llegan a proporcionar un 73% de digestibilidad *in vitro* por el método de Torry así lo reporta Moreno-Rojas (2000). También, son altas con lo que describe Ramírez y Ortiz (2000) para las albúminas de *Canavalia ensiformis* (leguminosa) con un 58.90% de digestibilidad por el método de la AOAC. De igual forma la digestibilidad de la albúmina de nuestro trabajo es superior a la digestibilidad que reportó Gallegos-Tintoré (2004) de las albúminas de *Phaseolus lunatus* con un 69% por el método de Torry.

Las globulinas presentaron una digestibilidad de 89.23% con el método de AOAC y con el método de Torry una digestibilidad de 93.29% ambos resultados son muy superiores a lo que reporta Ramírez y Ortiz (2000) con la digestibilidad por el método de la AOAC de las globulinas de *Canavalia ensiformis* que presentó 65.20%. Así mismo, son superiores a lo que reportó Gallegos-Tintoré (2004) para la globulina de *Phaseolus lunatus* con un 80% por el método de Torry.

Los cereales son fuente de prolaminas entre ellos se encuentra el trigo con un 77.4% de digestibilidad de proteína, el maíz con un 62.4%, la avena con 72% y la cebada con 53% de acuerdo a lo reportado por Carabaño-Luengo y col. (1995). Estos valores son inferiores a los obtenidos en este estudio por las técnicas de la AOAC y de Torry modificados para la digestibilidad de la prolamina de *Pleurotus ostreatus* con un 92.76% y 92.45% respectivamente. Ahora bien, Gallegos-Tintoré (2004) reportó una digestibilidad para las prolaminas de *Phaseolus lunatus* de un 66% por el método de Torry, esta digestibilidad es inferior a los resultados de las prolaminas en nuestra investigación.

Duodu y cols. (2003) mencionan que las proteínas más hidrofóbicas son menos susceptibles a las enzimas del tracto digestivo. Un ejemplo de este efecto es el caso de las prolaminas del sorgo comparadas con las prolaminas del maíz; las prolaminas del sorgo son más hidrofóbicas, lo que se ha asociado a una menor digestibilidad, especialmente después de procesos de cocción o procesamientos térmicos. Esto no fue igual a los resultados obtenidos en

nuestra investigación, ya que la prolamina de *P. ostreatus* resultó ser muy digestible aún después del proceso de deshidratación en ambas técnicas (AOAC y Torry modificado).

La digestibilidad de las glutelinas fue de 95.87% con la técnica de la AOAC y de 93.67% con la de Torry modificado, los resultados son superiores a la digestibilidad *in vitro* por el método de Torry de la glutelina de *Phaseolus lunatus* (leguminosa) con un 67% reportada por Gallegos-Tintoré y cols. (2004), de igual forma es superior a la digestibilidad que reportó Ramírez y Ortiz (2000) de las glutelinas *Canavalia ensiformis* con una digestibilidad *in vitro* por el método de la AOAC de 37.28%. Lasztity (1999) menciona que existen factores propios de la proteína que influyen en su digestibilidad, propiamente hablando de las glutelinas menciona que por contener una alta proporción de enlaces disulfuro y someterlo a procesamientos térmicos afecta su digestibilidad. Por el contrario, en nuestra investigación la glutelinas tuvieron una digestibilidad alta con ambos métodos (AOAC 95.87% y Torry modificado 93.67%).

Existen diversos métodos para determinar la digestibilidad proteica. Sin embargo, la digestibilidad enzimática es un procedimiento simple para desarrollar, además de ser más rápido para calcular la digestibilidad que el método de digestibilidad *in vivo*, ya que esta es de un proceso laborioso y costoso, además de que requiere cantidades grandes de alimento así lo menciona Arce y cols. (2003). Por otro lado Córdova (1993) menciona que la digestibilidad *in vivo* en ratas es un método ampliamente utilizado para determinar la calidad de los alimentos para consumo humano; sin embargo, la determinación de la digestibilidad en ratas presenta algunos inconvenientes como son el tiempo de su ejecución (9 días), la cantidad de alimento empleado, la necesidad de instalaciones, personal capacitado, el costo y el manejo de animales, además de que el tiempo empleado para obtener los resultados no sirven para la evaluación comercial de los alimentos. Es por ello que el método de Torry y Tiller (1963) con ligeras modificaciones es el más utilizado para determinar la digestibilidad proteica *in vitro* (Bochi Brum 1999). Siendo estos métodos son una excelente fuente de información teniendo en cuenta su bajo costo y la rapidez con que se obtienen los resultados (Nieto-López 2006).

Teniendo en cuenta el gran número de factores de variación de la digestibilidad de la proteína y de los aminoácidos, se llega claramente a la conclusión de que no existe una ley general que pueda servir para predecir la digestibilidad, algunos de ellos son los niveles y

origen de la fibra. La inclusión de fibra en la dieta origina un aumento de la descamación de las células del epitelio intestinal e incrementa la secreción de mucina, lo cual supone un mayor valor de las pérdidas endógenas de aminoácidos y por tanto una disminución del coeficiente de digestibilidad (Jondreville y Gálvez 2005). Al comparar los porcentajes de digestibilidad diferentes leguminosas como *Canavalia ensiformes* (AOAC) (Ramírez y Ortiz 200) y *Phaseolus lunatus* (Torry) (Gallegos-Tintoré y cols. 2004) y *P. ostreatus* se observa que es más digestible la proteína en *P. ostreatus* esto probablemente a que el contenido de fibra es superior en las leguminosas, provocando así una disminución en la digestibilidad proteica.

Aunque la digestibilidad proteica *in vitro* tiende a ser mayor que la digestibilidad *in vivo* (Malca y cols. 2006), los métodos utilizados en este trabajo de AOAC y Torry modificado son aceptables para estimar la digestibilidad de las fracciones proteicas de *Pleurotus ostreatus* y de la harina de este. Es probable que la variación con un método *in vivo* de la digestibilidad en *Pleurotus* sea similar o mínima. No obstante, Nieto-López (2005) menciona que entre las técnicas químicas de evaluación nutricional oficiales existen algunas que se pueden aplicar independientemente de la especie, pero en otros casos es indispensable que los resultados sean validados con evaluaciones *in vivo*; ésta es la situación de las técnicas de digestibilidad, las cuales constituyen un parámetro de calidad muy importante. Sin embargo, Morris-Quevedo y cols. (2003) demostraron la existencia de una correlación positiva ($r = 0,90$) entre los valores de pH inmediatamente a los 10 min de iniciada la digestión *in vitro*, con el sistema enzimático tripsina-quimotripsina-peptidasa y la digestibilidad aparente *in vivo* en ratas, lo cual constituye un elemento de gran valor predictivo en la realización de evaluaciones nutricionales. Así mismo, Ramos-Talma (1995) reportó que los métodos enzimáticos de digestión *in vitro* que tratan de reproducir el proceso de la digestión son una alternativa. Además de que estos métodos han sido contrastados en especies monogástricas (cerdos y aves) obteniéndose altas correlaciones con las digestibilidades *in vivo* y por tanto, buenas predicciones.

Ahora bien, *P. ostreatus* cuenta con un porcentaje de nitrógeno no proteico en sus paredes celulares quitinosas (Bautista 1997), lo cual hace que el porcentaje de digestibilidad se vea reducido.

Un factor que pudo haber influido positivamente en la digestibilidad de las fracciones proteicas y de la harina del cuerpo fructífero de *P. ostreatus* fue el hecho de haber sometido la

muestra a deshidratación por calor, como lo menciona Cruz-Suárez (2002) en un estudio realizado con *Canavalia* la cual fue sometida a extrusión para inhibir los factores bioquímicos como la tripsina, quimotripsina, α -amilasa, hemaglutininas y almidones, sin modificar el contenido de proteína de estudio.

La alta digestibilidad de las fracciones proteicas y de la proteína total de *P. ostreatus* en nuestro estudio pudo deberse a que fueron sometidos a molienda, a tal grado de contar con un polvo muy fino de cada fracción y de la proteína total. Esto de acuerdo a lo reportado por Mc Cracken (2002) y Waldron y cols. (2003), donde mencionan que hay tratamientos y procesamientos que mejoran la digestibilidad o reducen el efecto negativo de los factores antinutricionales tales como, el remojo, fermentación y molienda ya que la fibra se relaciona con la encapsulación de los componentes intracelulares por parte de las paredes celulares y que con la molienda se rompen parte de las estructuras celulares y mejorar la digestibilidad al exponer los compuestos intracelulares.

El método de Torry y Tilley que nosotros empleamos es ampliamente utilizado para determinar la digestibilidad proteica, así también lo refiere Arce y cols. (2003) al comparar dos técnicas, una enzimática y otra *in vitro* (Torry y Tilley) y concluyeron que la técnica *in vitro* demostró ser un procedimiento simple y rápido para la evaluación de los forrajes, además de que la digestibilidad de estos fue mayor estadísticamente en la digestibilidad *in vitro* que la digestibilidad enzimática.

8. Conclusiones

- No existen diferencias significativas de la digestibilidad *in vitro* de la proteína de la harina desgrasada de *P. ostreatus* y cada una de sus fracciones determinada por ambos métodos (AOAC y Torry modificado). De igual manera, no existen diferencias significativas entre la digestibilidad observada en las muestras analizadas en este estudio con respecto de digestibilidad de la caseína (proteína de referencia).
- La digestibilidad de las proteínas de la harina del hongo es mayor comparada con las fracciones independientes.
- La albúmina obtuvo el porcentaje de digestibilidad más bajo con ambos métodos.
- La fracción de glutelina presentó los porcentajes de digestibilidad más altos con ambos métodos.
- En ambos métodos la prolamina tuvo el mismo porcentaje de digestibilidad.
- Al haber una alta digestibilidad de las fracciones proteicas de *P. ostreatus*, se pueden adicionar a distintos alimentos.

9. Perspectivas

En la actualidad, las proteínas son consideradas un nutrimento indispensable en la nutrición ya que previenen diversos trastornos alimenticios y distintas patologías. Las proteínas aisladas por solubilidad del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* han tenido una digestibilidad considerable, son mayormente digestibles que las proteínas encontradas en la carne de pollo, leche y algunas leguminosas.

Por ello, se propone seguir con la investigación de la digestibilidad de las fracciones proteicas de *Pleurotus ostreatus*, empleando enzimas gástricas de un modelo animal diferente al de la vaca o bien, emplear enzimas industriales, ya que la metodología está estandarizada.

Para finalizar, se propone evaluar la digestibilidad de las proteínas de *Pleurotus ostreatus* de manera *in vivo*, utilizando ratas de la cepa *wistar*. Asimismo, se sugiere aplicar en la biotecnología la fracción de glutelina, la cual tuvo mayor digestibilidad, enriqueciendo algún alimento, creando un nuevo producto que colabore a cubrir el requerimiento de proteína de cualquier grupo de edad.

10. Literatura citada

- Aguilar. 2003. Aprovechamiento de cáscaras de pitaya para el crecimiento de setas (*Pleurotus ostreatus*) en condiciones de laboratorio. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Tesis Licenciatura.
- Allan G.L. 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients, *Aquaculture*: 186 (3-4), 293-310.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 1990. Protein Efficiency Ratio (Method 960.48). 15 th. p 1095-1098. Association of Official Analytical Chemist. Virginia, EEUU.
- Ardón L. 2007. La Producción de los Hongos Comestibles. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Aufrère, J. 1982. Etude de la prevision de la digestibilité des fourrages par une methode enzymatique. *Ann. Zootech.* 31: 111-130.
- Badui-Dergal S. 2006. Química de los alimentos. Editorial Alhambra Mexicana. México.
- Bautista M, Alanís G, González E., L. Carlos., Martínez G., Barboza E. (1999): Calidad proteínica de tres cepas mexicanas de setas (*Pleurotus ostratus*). Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Volumen 49, Número 1.
- Bautista, N., N. I. Bautista-García y L. Acosta-Urdapilleta, 2005a. Evaluación del cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo bajo condiciones rústicas en Galeana, Zacatepec, Estado de Morelos. Resúmenes, Primera Reunión Nacional sobre el Cultivo de *Pleurotus* en México. San Cristóbal de las Casas, Chiapas. p. 13.
- Belew MA. 2005. Cultivation of mushrooms (*Volvariella volvacea*) on banana leaves. *African Journal of Biotechnology.* 12: 1401-1403.
- Beltrán-Orjuela. 2006. Transformación de la seta comestible *Lentinula edodes* en harina como sustituto para elaborar galleta dulce de regado. Universidad de la Salle de Bogotá. Tesis de Licenciatura.
- Bermúdez S, Morris H y Donosco C. 2003. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* Var. Florida. *Revista Cubana Investigación Biomédica* 4:226-31.

- Bochi Brum, O.; Carro, M.D.; Valdés, C.; Gonzalez, J.S.; Lopez, S, 1999. Digestibilidad in vitro de forrajes y concentrados: Efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. Arch. Zootec, v. 48, p. 51- 61.
- Bondi, A. A. 1989. Nutrición Animal. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 546 p.
- Breene, W.M. 1990. Nutritional and medicinal, value of speciality mushroom.
- Carabaño Luengo, 1995. Valor Nutritivo de los cereales en conejo. XI Curso de Especialización FEDNA.
- Carrillo O. F. 1994). Producto multienzimático del hepatopáncreas de camarón: reactivo y suplemento dietético. Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, del 7 al 9 de noviembre.
- Casanueva, E. 2001. Nutriología Médica, 2ª Ed., Panamericana, México, pág. 462-463.
- Case, L.P, D.P. Carey, D.A. Hirakawa. 1997. Nutrición canina y felina. 2ª ed. Ed. Harcourt Brace. España. 455 p.
- Church, D.C, W.G. Pond. 1990. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. 2da ed. Ed. Limusa. México. 438 p.
- Church, D. C. y W. G. Pond. 1994. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Editorial Limusa, S. A. de C. V. Grupo Noriega Editores. México. pp 438.
- Cisterna, L. C. D. 2002. Cultivo del champiñón ostra en Chile.
- Conrado Soto-Velazco, Juan Carlos Serratos, Mario Ruiz López y Pedro García López 2005. Análisis proximal y de aminoácidos de los residuos de cosecha del hongo *Pleurotus spp.* Revista mexicana de micología No. 21.
- Córdoba, P. 1993. Alimentación animal. p 48-61. CONCYTEC. Perú.
- Córdoba-Salgado M.A. 1995. Perfiles de Solubilidad y Caracterización Fisicoquímica de Concentrados proteínicos de Amaranto. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM. México. 134 pp.
- Córdoba, P. 1993. Alimentación animal. p 48-61. CONCYTEC. Perú.
- Cortés M, García A y Suárez H. 2007. Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con Calcio, Selenio y Vitamina C. Revista de la facultad de Química 1: 16-24.

- Crim MC, Munro HN. 1988. Proteínas en Conocimientos Actuales en nutrición Tomo I Universidad de Chile INTA Chile.
- Crisan E B, Sands. 1978. Nutritional value. In: S. T. Chang, y W. A. Hayes. The biology and cultivation of mushrooms. Academy Press, New York.
- Cruz L, Ponce I, Martínez E, Solano G. 2004. Inoculación de una mezcla de residuales azucareros con una cepa de *Pleurotus ostreatus*. Universidad y Ciencia 033:33-40
- D'Alva, C. Lara, A. Estrada-Torres, C. Castillo-Guevara (2007) Digestive responses of two omnivorous rodents (*Peromyscus maniculatus* and *P. alstoni*) feeding on epigeous fungus (*Russula occidentalis*).
- Deacon, J. 1988. Introducción a la micología moderna. Ed. Limusa. 1ªed. México, D.F, págs. 11-13.
- Di Marco O. 2005. Calidad nutritiva de silaje de maíz y sorgo. Revista Visión Rural 12:7
- Doumas B; Watson W.; Biggs H. 1971. Métodos colorimétricos para la determinación de proteínas totales y albúmina en suero Clin. Chim. Acta 31.
- Duodu K.G., J.R.N. Taylor, P.S. Belton y B.R. Hamaker. 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. Journal of Cereal Science. 38 (2003): 117-131.
- Escalona C L. 2002. Inoculación de una mezcla de residuales azucareros con una cepa de *Pleurotus ostreatus*. Instituto de Ecología. Xalapa. Veracruz. México. 15-18.
- Ezquerria M., F. García Carreño, R. Civera, and N. Haard. (1997a).” pH-stat method to predict digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 157:249-260.
- FDA. 1993. Food labeling. General provisions; Nutrition labeling; Label format; Nutrient content claims; Health claims; Ingredient labeling; State and local requirements and exemptions; Final rules. Food Drug Admin Fed. 58 (3):2101-6.
- FAO/OMS. 1992. Informe de una consulta de expertos. Evaluación de la calidad de las proteínas FAO. EE.UU. p.57
- FAO: Contenido de aminoácidos de los alimentos 1970
- Gaitán, R., D. Salmones, G. Mata, R. Pérez. 2004. Manual práctico del cultivo de setas, aislamiento, siembra y producción, Xalapa, Veracruz, México, pág 1-7, 31 -34.

- Galicia R E. 1994. Sistematización del cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Proyecto de Estudios Sociales, Tecnológicos y Científicos, IPN. Tesis de Posgrado.
- Gallegos-Tintoré, Santiago P, Jessé B y Ancona D. 2004. Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus*. L. ALAN, mar. Vol. 54 81-88.
- García, M. 1998. Cultivo de setas y trufas. Ediciones Mundi. 3ªed. España, Barcelona, págs. 17-22, 143-145.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agr. Handbook N°379. Agric. Res. Serv., USDA, Washington, DC, 20pp.
- Gómez, J. 2000. Unidad dietética y nutrición clínica, hospital universitario La Paz. G. 2000. Fungi in traditional medicine in Mesoamerica and Mexico. Revista Iberoamericana de Micología, 11 (11): 81-85.
- Guzmán G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto-Velazco C, L. Guzmán-Dávalos. 2006. El cultivo de los hongos comestibles, con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. México. Instituto Politécnico Nacional. 245 pp.
- Hazard T. 1997. Variación de la composición de la leche. Curso taller Calidad de Leche e Interpretación de Resultados de Laboratorio. Temuco. 33-44
- Hernández-González ME. 2000. Valor nutritivo de setas (*Pleurotus ostreatus*) cultivadas en paja de trigo y bagazo de agave (*Agave Tequilana Weber*, var. azul) enriquecido con col. Tesis Universidad de Guanajuato.
- Jacques, P. J. y Pierre, D. A. 2000. Análisis Nutricional de los alimentos, Acribia, S. A. Zaragoza, España, pág.41-51.
- Jondreville C, Grosjean F, Buron G, Peyronnet C y Beneytout JL. 1995. Comparison of four pea varieties in pig feeding through digestibility and growth performance results. J. Anim. Phys. Anim. Nutr. 68: 113-122.
- Jondreville y Gálvez. 2005. Estimación de la digestibilidad de aminoácidos en cereales y sus subproductos. XI Curso de especialización FEDNA. Barcelona.

- Lachmann M O y Araujo Febres. 1999. Evaluación de la lignina detergente ácido como marcador para la determinación de la digestibilidad. Revista Científica, FCV-LUZ. (En arbitraje).
- Lasztity R. 1999. The chemistry of maize. In Cereal chemistry. Pages 219-239. Akademiai Kiado, Budapest.
- Lazo, J. P. 1994. Evaluation of several in vitro enzyme assays for estimating in vivo apparent protein digestibility by the pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. Thesis Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical Collage pp. 62.
- Lehninger, A., (2006). Principles of Biochemistry, 4^a Ed. Worth Publishers.
- Lelley JI. 2004. Orthomolecular medicine and mushroom consumption, an attractive aspect for promoting production. Science and cultivation of edible and medicinal fungi. Pennsylvania State University Press, University Park.
- López-Sánchez. 2010. Evaluación de las propiedades funcionales de las fracciones proteicas del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tesis Maestría.
- Malca O, Orlando Lucas A, Teresa Arbaiza F, Fernando Carcelén C y Felipe San Martín H. 2006. Comparación de dos técnicas para determinar la digestibilidad proteica de insumos y alimentos comerciales para caninos. Revista de Investigación Veterinaria Perú. 17 (2): 96-103
- Manríquez, J.A. 1994. La digestibilidad como criterio de evaluación de alimentos.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla & W. Martínez. 2004. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capítulo 6.1, 20 pp. In: *El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal (Eds.). ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.
- McCracken K.J. 2002. Effects of physical processing on the nutritive value of poultry diets. In Poultry Feedstuffs, Supply, composition and nutritive value. Poultry Science Symposium Series Volume 26. Edited by J.M. McNab y K.N.Boorman. CABI Publishing, pag. 301-315.

- Merchen, N. R. 1993. Digestión, absorción y excreción en los rumiantes. En: D. C. Church (Ed.). El rumiante, fisiología digestiva y nutrición. Tomo I. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 191 - 223.
- Millward DJ Newsholme EA, Pellet Pr, Uauy R: Amino acid scoring in health and disease. 1992. En: Protein - Energy interactions. Ed. Scrimshaw N. S., Schurch B. Nestlé Foundation. Lausanne; 405-413.
- Morris-Quevedo H, Carrillo-Farnés O, Bermúdez-Savón R. 2003. Enfoque en la utilización de los métodos químicos de evaluación de la calidad proteica. Revista Cuabana Salud Pública. 29(1): 42-7.
- Muñoz G. 2005. Hongos comestibles silvestres de la comunidad indígena Tepehuana de Santa María de Ocotán y Xoconoxtle en Durango. X Congreso Nacional de Micología.
- Nacional Research Council Raciones Dietéticas Recomendadas, ed. Española de la 1ª Edición Original de Recommended Dietary Allowances 1989-1991. Editorial Consulta Barcelona España.
- Nieto-López. 2005. Técnica de digestibilidad in vitro en ingredientes y alimentos para camarón. Ciencia UANL / 8:1.
- Olivares S, Soto D, Zacarías I. 1989. Nutrición, prevención de riesgos y tratamiento dietético. CONFELANYD 8-13.
- OMS: Informe de una reunión Consultiva Conjunta FAO/OMS/UNU de Expertos. 1985. Necesidades de energía y proteínas. 58-74 127-138. Serie de informes técnicos nº 724 Ginebra.
- OPS: Conocimientos Actuales sobre Nutrición .7ª edición 1997. 73-87 Publicación científica nº 565 OPS/ILSI.
- Ortega MR. 2000. El huevo en la alimentación. Importancia nutricional y sanitaria. Int J Food Sci Nutr 46: 137-144.
- Ørskov, E R, Hovell, F D, De, B and Mould, F. 1980. The use of nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. Trop. An. Prod.. 5: 195-213.
- Ørskov, E R. 2000. The in situ technique for the estimation of forege degradability in ruminants. In Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. 175-188.

- Paraskevi K, Dimitrios P, Wolf-Dietrich, Kyriakos A y Riganakos. 2009. Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry* 115: 1575-1580.
- Paredes-López O. 1988. Safflower proteins for food uses. In: *Development in food proteins*. 7: 1-33.
- Ramírez M, y de Bertoli. 2000. Estudio de algunas características de las proteínas de Canavalia. *CIENCIA UANL* 8: 1.
- Ramos-Talma. 1995. Aplicación de técnicas enzimáticas de digestión in vitro a la valoración nutritiva de piensos de conejos. Universidad Complutense de Madrid. Tesis doctoral.
- Regés R. 2002. El cultivo de Hongos y la Ecología. Centro de Estudios Ecológicos Argentinos.
- Robinson, D. S. 1994. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos, Acribia, S. A. pág. 218-225.
- Sánchez J, d. Royse. 1998. La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Edit. Noriega. México, D.F. p 400.
- Sánchez J, D. Royse. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Limusa, México. 290 pp.
- Schaafsma G. 2000. The protein Digestibility-Corrected amino Aci Store. *Journal of Nutrition*. 130:1965s - 1867s.
- Soriano-Santos J., Iwabuchi S, and Fujimoto K. 1992. Solubility of amaranth seeds protein in sodium sulphate and sodium chloride: The main factor in quantitative extraction for analysis. *International Journal of food science and technology*. 27: 337.
- Soto-Velazco, C., J. C. Serratos, M. Ruíz López y P. García López. 2005. Análisis proximal y de aminoácidos de los residuos de cosecha del hongo *Pleurotus spp.* *Rev. Mex. Mic.* 21: 49-53.
- Stryer, L. 1995. *Biochemistry*, 4ª Ed., Stanford University, New York, Cap.2.
- Tilley, J.M.A. and Terry, R.A. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18, 104-111.

- Suárez M.M., A. Kizlansky. y L.B. López. 2006. Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el escore de aminoácidos corregido por digestibilidad, *Nutrición hospitalaria*, ISSN: 0212- 1611, 21(1), 47-5.
- Valencia- del Toro. 2006. Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus* spp. *Food Chemistry*. 94 (4) 494-497
- Voet, D. y Voet, J., G. 2006. *Biochemistry*, Wiley, New York, Cap. 7-8.
- Waldron K.W.,M.L. Parker, and A.C. Smith. 2003. Plant cell walls and food quality. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Co2:101-119.
- Wawrzkiwicz M. 2006. Análisis de los métodos in vitro para la evaluación de forrajes ensilados. Cátedra de Nutrición y Alimentación Animal. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.1-6.