

Análisis enzimático comparativo de *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* y *Poria cocos*

Profesor Amin Karmali, Centro de investigación de Ingeniería Química y Biotecnología y Departamento de Ingeniería Química del Instituto Superior de Ingeniería de Lisboa (ISEL), Instituto Politécnico de Lisboa, Portugal

akarmali@deq.isel.pl.pt

Introducción

La inflamación es una respuesta inmunológica natural que se produce como respuesta a un traumatismo, infección, daño tisular o estímulos nocivos. Durante el proceso, ciertas células activadas por la inflamación como los neutrófilo, eosinófilos, fagocitos mononucleares y macrófagos aumentan la secreción de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) y citocinas.

Los macrófagos son células que tienen tres funciones principales en el proceso de la inflamación: presentación del antígeno, fagocitosis e inmunomodulación mediante la producción de diversas citocinas así como factores de crecimiento, y por lo tanto, juegan un papel crucial en el inicio, mantenimiento y resolución de la inflamación⁽¹⁾.

El estrés oxidativo ocurre cuando el equilibrio varía a favor de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado de la depleción de agentes antioxidantes. Tal superproducción de ROS puede provocar daño oxidativo a las biomoléculas (por ejemplo, a los lípidos, las proteínas, al ADN), lo cual puede ser responsable de afecciones crónicas como serían la aterosclerosis, el cáncer, la diabetes, la artritis reumatoide, la inflamación crónica, el accidente vascular cerebral, el envejecimiento y otras enfermedades degenerativas en humanos.

El daño oxidativo se previene gracias a un sistema defensivo que incluye antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos se utilizan ampliamente como marcadores del estrés oxidativo, tales como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatióna peroxidasa⁽²⁾. Los humanos han incluido una gran variedad de hongos en su alimentación desde hace muchos siglos. Los hongos son una fuente muy rica de enzimas, metabolitos secundarios, vitaminas, minerales, proteínas, polisacáridos, presentan un alto contenido de fibra y bajo nivel de lípidos. Los hongos contienen diversas moléculas bioactivas tales como terpenoides, esteroides, fenoles, nucleótidos, derivados de glucoproteínas, péptidos y polisacáridos libres o ligados a proteínas. Por lo tanto, se consideran como una posible y potencial fuente de antioxidantes y de actividad antiinflamatoria⁽³⁾.

Tal como se presentó en *la Revista Clínica de Micología* en su volumen IV, se sabe desde hace más de un siglo que algunas enzimas pueden emplearse en la prevención, e incluso en el tratamiento, de diversas situaciones clínicas. La destacada actividad enzimática inmunoestimulante que se encuentra en la biomasa como forma de nutrición con hongos y estas enzimas, se dividen según las siguientes actividades:

a) Enzimas que previenen el estrés oxidativo:

Superóxido dismutasa

b) Enzimas que previenen el crecimiento celular:

Proteasa, glucoamilasa

c) Enzimas que promueven la detoxificación:

Peroxidasa, Citocromo P-450

Objetivo

El propósito del presente trabajo ha sido investigar los niveles de enzimas y de diversos metabolitos secundarios que están implicados en la coagulación, así como los agentes antioxidantes presentes en la biomasa de *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* y *Poria cocos* en presencia y en ausencia de enzimas proteolíticas.

Se investigaron los siguientes parámetros antioxidantes: niveles de peroxidasa, glucoamilasa, glucoasa-2-oxidasa, superóxido dismutasa, citocromo P-450, citocromo P-450 reductasa, catalasa, proteasa, glutatióna peroxidasa, glutatióna, y metabolitos secundarios en las fracciones de los hongos⁽¹⁾

Discusión

Los datos obtenidos revelan que todos los productos de hongos testados contienen niveles significativos de varios y diferentes enzimas y metabolitos secundarios, incluyendo inhibidor de trombina.

La simulación de tracto gastrointestinal se realizó en presencia y en ausencia de pepsina y de tripsina lo cual reveló que la presencia de estas proteasas no redujo significativamente los niveles de las distintas enzimas y metabolitos secundarios.

En cuanto a lo que concierne a los metabolitos secundarios, todos los productos de hongos testados mostraron altos niveles de inhibidores de trombina. Los resultados que se han obtenido sugieren que estos hongos son una buena fuente de agentes antioxidantes que pueden proteger al organismo de los efectos perjudiciales de los ROS.

Conclusiones

Los datos presentados en este estudio muestran que los productos de hongos testados son una fuente importante de enzimas y de metabolitos secundarios incluyendo agentes antioxidantes que inactivan los ROS. Es más, los inmunonutrientes presentes en el micelio y en el primordio (cuerpo fructífero joven) que se encuentran en la forma de biomasa de *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* y *Poria cocos* son resistentes a las enzimas proteolíticas (es decir, en la simulación de tracto digestivo) puesto que están en la forma de biomasa y en extractos celulares.

1. Debnath, T., Park, S.R., Kim, D.H., Jo, J.E., Ou Lim, B. Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Activities of *Inonotus obliquus* and Germinated Brown Rice Extracts, *Molecules* 2013, 18, 9293-9304
2. Song, F-Q, Liu, Y., Kong, X-S, Chang, W, Song, G. MINI-REVIEW Progress on Understanding the Anticancer Mechanisms of Medicinal Mushroom: *Inonotus Obliquus*, *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2013, 14, 1571-1578.
3. Silva S, Martins S, Karmali A, Rosa E. Production, purification and characterization of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with antitumour activity by *J Sci Food Agric*. 2012 ;92(9):1826-32.
4. Mölleken, H., Nitschke, J., Modick, H., Malolepszy, T., Altenbach, H-J. A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans and a method to quantify chitin in edible mushrooms *Food chemistry* 127 (2011), 791-796.
5. Semedo MC, Karmali A, Fonseca L. A high throughput colorimetric assay of β -1,3-D-glucans by Congo red dye. *J Microbiol Methods*. 2015, 109, 140-148.
6. Freixo, M.R., Karmali, A., Frazão, C. and Arteiro, J. M., Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates *Process Biochem*, (2008), 43, 1265-1274.
7. Karmali, A. and Coelho, J. Bioconversion of D-glucose into D-glucosone by Glucose 2-Oxidase from *Coriolus Versicolor* at Moderate Pressures, (2011) *Applied Biochemistry and Biotechnology* 163:906-917.
8. Rout D, Mondal S, Chakraborty I, Islam SS The structure and conformation of a water-insoluble (1->3)-(1->6)-beta-d-glucan from the fruiting bodies of *Pleurotus florida*. *Carbohydr Res*. 2008 ; 343(5):982-7.
9. Ojha AK, Chandra K, Ghosh K, Islam SS. Glucans from the alkaline extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cv Assam Florida: isolation, purification, and characterization. *Carbohydr Res*. 2010 ; 345(15):2157-63

Análisis enzimático comparativo de *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* y *Poria cocos* continuación...

	<i>Inonotus obliquus</i> (Chaga)	<i>Auricularia auricula</i>	<i>Poria cocos</i>
Contenido en proteína	49,5 mg	54,8 mg	59,3 mg
Peroxidasa	35,8 mU	31,5 mU	39,5 mU
Glucoamilasa	5,9 U	4,3 U	4,1 U
Glucosa 2 oxidasa	7,2 mU	4,9 mU	6,9 mU
Superóxido Dismutasa	975 U	487,5U	446,9 U
Citocromo P-450	2,9 nmoli	2,1 nmoli	2,5 nmoli
Citocromo P-450 reductasa	10,2 mU	8,5 mU	9,8 mU
Catalasa	18,1 mU	15,3 mU	21,5 mU
Proteasa	29,5 mU	27,1 mU	31,3 mU
Glutaciona peroxidasa	25,6 mU	18,5 mU	25,9 mU
Niveles de Glutaciona (ug/g)	30,3	32,5	19,1
Metabolitos Secundarios (Inhibidores de Trombina %)	7,80%	5,70%	6,30%

Tabla I - Diferencias comparativas en contenido de enzimas entre *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* y *Poria cocos*. (Ausencia de tripsina y pepsina)

	<i>Inonotus obliquus</i> (Chaga)	<i>Auricularia auricula</i>	<i>Poria cocos</i>
Contenido en proteína	41,4 mg	48,9 mg	52,6 mg
Peroxidasa	30,9 mU	27,7 m U	35,1 m U
Glucoamilasa	4,8 U	3,9 U	3,7 U
Glucosa 2 oxidasa	5,9 m U	4,2 m U	5,1 m U
Superóxido Dismutasa	965,8 U	479,3 U	440,1 U
Citocromo P-450	2,4 nmoli	1,8 nmolei	2,1 nmoli
Citocromo P-450 reductasa	8,9 m U	7,1 m U	7,1 m U
Catalasa	16,8 m U	12,8 m U	17,5 m U
Proteasa	23,9 m U	25,7 m U	28,1 m U
Glutaciona peroxidasa	21,8 m U	15,1 m U	21,1 m U
Niveles de Glutaciona (ug/g)	29,5	30,1	18,1
Metabolitos Secundarios (Inhibidores de Trombina %)	6,90%	4,70%	5,90%

Tabla II - Diferencias comparativas en contenido de enzimas entre *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* y *Poria cocos* en presencia de pepsina

	<i>Inonotus obliquus</i> (Chaga)	<i>Auricularia auricula</i>	<i>Poria cocos</i>
Contenido en proteína	43,7 mg	51,3 mg	53,1 mg
Peroxidasa	32,7 mU	28,9 m U	32,9 m U
Glucoamilasa	5,3 U	4,2 U	3,9 U
Glucosa 2 oxidasa	6,3 m U	4,4 m U	6,2 m U
Superóxido Dismutasa	871,8 U	485,3 U	442,5 U
Citocromo P-450	2,6 nmole	1,9 nmole	2,3 nmole
Citocromo P-450 reductasa	9,4 m U	7,5 m U	7,9 m U
Catalasa	15,4 m U	13,8 m U	19,8 m U
Proteasa	25,8 U	24,8 m U	28,8 m U
Glutaciona peroxidasa	23,1 m U	16,7 m U	22,5 m U
Niveles de Glutaciona (ug/g)	31,1	30,9	19,5
Metabolitos Secundarios (Inhibidores de Trombina %)	7,10%	5,30%	6,10%

Tabla III Diferencias comparativas en contenido de enzimas entre *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* y *Poria cocos* en presencia de tripsina

Nota: Se define una unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima requerida para convertir un micromol de sustrato en producto por minuto bajo determinadas condiciones experimentales. Una miliunidad enzimática (mU) es la cantidad de enzimas que se requiere para convertir un nanomol de sustrato en producto por minuto bajo determinadas condiciones experimentales. La forma de biomasa tanto de *Inonotus obliquus* (Chaga), *Auricularia auricula* como de *Poria cocos* ha sido suministrada por Mycology Research Laboratories Ltd-Reino Unido (www.mycologyresearch.com)