

**MEMORIA DESCRIPTIVA PARA EL DESARROLLO DE PROYECTOS Y
ACTUACIONES POR PARTE DE GRUPOS OPERATIVOS
Según Resolución 1659/2017, BOR de 4 de diciembre de 2017.**

**GRUPO OPERATIVO:
MEJORA DE LAS PROPIEDADES SALUDABLES DE HONGOS
CULTIVADOS EN LA RIOJA**

**PROYECTO:
OBTENCIÓN DE HONGOS CULTIVADOS CON EFECTO ANTITUMORAL
PROBADO**



Contenido

ÍNDICE.....	2
1.- Valoración del desarrollo del proyecto o acción.....	3
2.- Descripción de la metodología desarrollada.....	4
3. Cronograma de la actuación	4
4. Alcance y Plan de divulgación	5
5. Presupuesto desglosado.....	5
6. Valoración General del proyecto.....	6
BIBLIOGRAFIA	7

1.- Valoración del desarrollo del proyecto o acción

Este proyecto se basa en la aplicación de metodologías para el incremento de las propiedades antitumorales del Portobello y la obtención final de un alimento funcional y un complemento alimenticio. Por tanto, el objetivo del proyecto es mejorar los niveles de compuestos presentes en Portobello que hagan incrementar su poder anticancerígeno.

Las líneas de actuación de este proyecto fueron definidas teniendo en cuenta dos premisas: el aumento de vitamina D₂ y el contenido de polisacáridos aumentan su capacidad anticancerígena.

En cuanto a la vitamina, las setas presentan el precursor (ergosterol), que con radiación se puede convertir en vitamina D₂ (ergocalciferol). Se llevaron a cabo ensayos con radiación UV al cultivo y en postcultivo. El tipo de radiación UV utilizada fue A, B y la C. Todos los ensayos y resultados se muestran en el Anexo I de la presente memoria. De los resultados se desprenden las siguientes conclusiones:

- irradiar con UV-A durante el cultivo aumenta la capacidad anticancerígena, no en postcultivo y la radiación en postcultivo con UV-C no muestra resultados satisfactorios.
- al irradiar con UV-B se aumentan los niveles de vitamina D₂, pero la actividad anticancerígena no se ve aumentada. No se aprecia un aumento del contenido de vitamina D₂ al irradiar con UV-A.
- se puede afirmar que el aumento de VitD₂ y el efecto anticancerígeno no presentan una relación directa.

En segundo lugar, se realizaron ensayos para aumentar el contenido de polisacáridos: suplementación del sustrato con un suplemento comercial, con monosacáridos en medio líquido y finalmente en el agua de riego con monosacáridos. Las conclusiones:

- suplementar el sustrato a diferentes dosis no aumenta el poder anticancerígeno
- los ensayos en medio líquido suplementado con monosacáridos presentaron muchos problemas de contaminación bacteriana y no se pudo llegar a evaluar
- la adición de monosacáridos al cultivo no supuso un aumento de la capacidad anticancerígena de forma significativa.

Uno de los problemas del proyecto, que ha hecho que el hito 2 se prolongue en el tiempo, ha sido la semilla. Se optimizaron las condiciones de cultivo con semilla GURELAN PORTO, obteniendo resultados muy satisfactorios. Al descatalogar esta semilla tuvimos que trabajar con nuevas cepas que han resultado no presentar el mismo efecto, obligando a redirigir el proyecto hasta el abandono de la radiación centrándonos en distintas partes del portobello. Se ha comprobado como la piel posee el compuesto/s anticancerígenos en mayor proporción. De ahí, que en la última etapa del proyecto se ha planteado realizar el ensayo *in vivo* con una dieta enriquecida con piel de portobello y no con el formulado alimenticio que estaba marcado a priori en el hito 3. De los resultados de los ensayos *in vivo* se puede concluir que tanto la dieta enriquecida en un 5% de extracto polisacárido como la del 5% de piel presentan resultados muy cerca de ser estadísticamente significativos, pero no alcanzaron la suficiente diferencia como para concluir que existe un efecto antimetastático

En cambio, cuando se evalúan extractos de champiñón blanco y de portobello frente al estrés oxidativo hay un efecto claro y estadísticamente significativo de protección, por lo que se puede afirmar que estos extractos tienen un beneficio para la salud mental.

La intención del grupo operativo HONANTICAN es seguir trabajando para alcanzar el objetivo final de este proyecto, que consiste en sacar un producto al mercado. El abanico de ensayos testados y las distintas tareas probadas nos a plantear más vías de aplicabilidad al portobello y por tanto a ser capaces de obtener más de un producto con diferentes propiedades saludables.

2.- Descripción de la metodología desarrollada

Las metodologías llevadas a cabo para la realización de los hitos 1, 2 y 5 con sus correspondientes tareas se han desarrollado tal y como se plantearon inicialmente. Con los resultados generados se han probado/evaluado nuevas tareas para poder conseguir con éxito los hitos.

La principal desviación a la metodología se ha centrado en el Hito 3, que se ha tenido que modificar por debido a dos razones principales:

- Problemas en cuanto a la reproducibilidad de los resultados con diferentes semillas. No se han podido reproducir buenos resultados obtenidos con la semilla utilizada en la primera parte del proyecto con el resto de semillas disponibles en el mercado que han sido testadas.
- Incumplimiento con las especificaciones microbiológicas. Al tratarse de un producto fresco se deben cumplir unas condiciones específicas muy estrictas.

Inicialmente el ensayo con ratones se debía realizar con el suplemento desarrollado, sin embargo los resultados obtenidos han llevado a realizar el ensayo con dietas enriquecidas con piel de portobello y no con el complemento alimenticio que iba a ser comercializado.

El retraso en el tiempo del hito 2 ha provocado que no se haya podido evaluar la capacidad anticancerígena al formulado alimenticio final.

La validación de las condiciones de cultivo del portobello en el cultivo comercial se han realizado tanto con la metodología de radiación optimizada inicialmente como con la metodología estándar de dicho cultivo. Se han añadido también los pasos posteriores de manejo post-cosecha (lavado, cortado y tratamiento) para la determinación de los ensayos microbiológicos.

3. Cronograma de la actuación

Los hitos 3 y 4 se han demorado en el tiempo debido a dos razones mayoritarias: por una parte, la incidencia del coronavirus produjo retrasos y por otra, los sucesivos resultados del hito 2 hicieron alargar este hito más tiempo del que estaba establecido. Por lo que se solicitó una prórroga de 3 meses hasta Septiembre de 2021, para terminar con el ensayo in vivo.

CRONOGRAMA	RESPONSABLE	Año 1						Año 2						Año 3		
		3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	1-2	3-4	5-6	
T1.- Selección	TODOS															
T2.- Desarrollo de portobello	HNOS. GON/CTICH															
2.1. Ensayos de cultivo.	HNOS. GON/CTICH															
2.2. Caracterización	CTICH															
2.3. Efecto antitumoral	CIBIR															
T3.- Obtención de producto	CATA NATURA/CTICH															
3.1. Presentación	CATA NATURA/CTICH															
3.2. Efecto antitumoral	CIBIR															
T4.- Validación en cultivo	CULTIVOS GONZÁLEZ															
T5.- Difusión de resultados	CTICH/TODOS															

4. Alcance y Plan de divulgación

Todas las actividades de difusión del Grupo operativo se han detallado en la memoria de "ACTIVIDADES DE DIVULGACIÓN GRUPO OPERATIVO: MEJORA DE LAS PROPIEDADES SALUDABLES DE HONGOS CULTIVADOS EN LA RIOJA" presentada en Junio de 2021.

5. Presupuesto desglosado

En la tabla siguiente se muestran las inversiones realizadas en este proyecto por cada una de las empresas:

TIPO/EMPRESA		COSTE SUBVENCIONABLE		
TIPO	EMPRESA	Pago parcial 1	Pago parcial 2	Pago parcial 3
PERSONAL	ASOCHAMP	7621.7	22500	25045.3
PERSONAL	FRS	10260.86	33371.91	54165.29
PERSONAL	CATANATURA	3424.65	9246.6	9369.9
PERSONAL	HNOS. GONZALEZ	1268.34	3638	3699.6
MATERIALES	ASOCHAMP	1619.42	7189.52	6475.36
MATERIALES	FRS	3134.66	12872.22	11987.69
MATERIALES	HNOS. GONZALEZ		6850.9	6529.8
EQUIPAMIENTO	ASOCHAMP	9799.12		
COL. EXTERNAS	ASOCHAMP		1677.96	1693.79
COL. EXTERNAS	FRS			6150.13
COL. EXTERNAS	CATANATURA	2140	5780	6240

ASOCHAMP

Personal: Horas necesarias para la preparación y realización de cultivos. Evaluación y preparación de informes. Caracterización de los frutos obtenidos. Reuniones de seguimiento de proyecto y cultivo. Horas para realización de analíticas y preparación de extractos y ejecución del Plan de difusión.

Materiales: Material y reactivos de laboratorio para la realización de análisis de materias primas y preparación de extractos, así como la caracterización de los productos y materias primas y fungibles de cultivo necesarios para la realización de los cultivos de champiñón y metodologías de tratamiento.

Colaboraciones externas: Costes para análisis de caracterización específicos para Vitamina D y costes en acciones de difusión

Inversiones: equipamiento necesario para el tratamiento del champiñón mediante radiación UV tanto en cultivo como post-cosecha así como el tratamiento de muestras para el análisis de polisacáridos.

CIBIR (FRS)

Personal: Horas necesarias para la evaluación cuantitativa de la capacidad antitumoral de los hongos enriquecidos en cultivos celulares de células humanas tumorales y no tumorales. También para la evaluación en modelos animales de la eficacia antitumoral de los productos finales (alimento o complemento alimenticio). Reuniones de seguimiento de proyecto y ejecución del Plan de difusión.

Materiales: Material y reactivos de laboratorio para la realización del análisis de la capacidad antitumoral in vitro y sobre ratones de laboratorio.

Colaboraciones externas: costes de preparación de las dietas tanto control como la dieta basada en el producto obtenido para la alimentación de ratones.

HERMANOS GONZÁLEZ

Personal: Horas necesarias para la validación a tamaño comercial la metodología desarrollada para el aumento de la capacidad antitumoral de los champiñones Portobello así como el asesoramiento en los cultivos realizados en el CTICH.

Materiales: materias primas para las pruebas de validación planteadas en la memoria: fungibles de cultivo.

CATA-NATURA

Personal: Horas para la definición y comercialización del alimento funcional/complemento alimenticio y ejecución del plan de difusión

Colaboraciones externas: Costes de contratación y realización de acciones de promoción y difusión (material gráfico, publicidad, etc) y costes de la contratación de PLAMECA (empresa asesora especializada en el lanzamiento de nuevos productos (alimenticios) para asesoramiento técnico a nivel normativo y también a nivel industrial en lo referente al diseño y elaboración de complementos alimenticios a partir del producto resultante en el proyecto).

6. Valoración General del proyecto

Los objetivos planteados en el proyecto se han cumplido de manera parcial. Si bien se ha podido demostrar el aumento de la capacidad anticancerígena del Portobello mediante radiación UV, no ha sido posible garantizar su reproducibilidad debido a su dependencia del tipo de semilla. Sí se ha podido establecer una metodología que permite el aumento de Vitamina D₂ durante el cultivo, aunque dicho aumento no está directamente relacionado con la capacidad antitumoral.

Las desviaciones encontradas han permitido adquirir nuevos conocimientos de la seta *Agaricus brunnescens*, portobello que consideramos muy importantes y que pueden ser la base de futuros extractos y aplicaciones. Uno de los hallazgos más relevantes encontrado son los beneficios de extractos de portobello frente al estrés oxidativo que afecta al cerebro y que puede ser un desencadenante de las enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, etc), apoyando por lo tanto los beneficios de estos extractos para la salud mental.

El proyecto ha reforzado los conocimientos adquiridos del portobello sobre su capacidad anticancerígena y además nos abre a nuevas y futuras investigaciones en otros campos de la medicina como es el caso de las enfermedades neurodegenerativas.

El carácter innovador de los resultados supone una base para la modernización de las explotaciones agrarias, la incorporación al mercado laboral de jóvenes y mujeres con distintos niveles de cualificación, facilitando la fijación de población en el medio rural. La nueva vía de valorización y aplicación en medicina de productos agrarios posibilitará un aumento de la demanda de hongos cultivados para esta aplicación, repercutiendo directamente sobre todo el sector, tanto a los productores de micelio que podrán incrementar producciones de semillas seleccionadas, como a

toda la cadena de producción de sustrato y cultivo de hongos. La colaboración de PLAMECA garantiza la posible distribución o comercialización de los productos desarrollados

Las acciones de divulgación llevadas a cabo durante el proyecto han servido para llegar a los principales interesados y potenciales usuarios de las soluciones estudiadas y desarrolladas, a su vez que se ha respetado la protección intelectual para futura explotación de los resultados por el consorcio.

El consorcio ha colaborado en todo momento, con el objetivo común de aumentar y maximizar los resultados e impactos del proyecto. La involucración en las tareas y flujo de conocimiento entre los socios ha sido continua, posibilitando el aumento de conocimiento de las entidades participantes. Todos los participantes han expresado su voluntad de seguir colaborando en esta línea de actuación.

BIBLIOGRAFIA

- M.C. Urbina-Sáenz, M. Pérez-Clavijo, M.T. Martínez-Soria y J. Sanz-Asensio. Determinación de Selenio en champiñón mediante GH-Espectroscopía de absorción Atómica. Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona del 21 al 23 de octubre de 2008.
 - Pérez-Clavijo M, URBINA C, Clavijo C. Champiñones enriquecidos en selenio como alimento funcional. XI Congreso Nacional de la Sociedad española de nutrición. 11 - 13 de junio de 2009
 - C.F.C. Godfrey, K.C. Wing and M.S Daniel (2009).The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 2:25.
 - Dong Jae Won 2017. Optimization of UV irradiation conditions for the vitamin D2- fortified shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) using response surface methodology. *Food Sci Biotechnol* <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0266-0>
 - Fan-Chiang Yang 2000. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 27 295–301.
 - Fan-Chiang Yang and Chun-Bun Liao 1998. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry* O, Vol. 33, No. 5, pp. 547-553.
 - Gao-Qiang Liu & Ke-Chang Zhang 2007. Enhancement of polysaccharides production in *Ganoderma lucidum* by the addition of ethyl acetate extracts from *Eupolyphaga sinensis* and *Catharsius molossus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:572–577 DOI 10.1007/s00253-006-0709-7.
 - Hai-long Yang 2004. Enhancement of mycelial growth and polysaccharide production in *Ganoderma lucidum* (the Chinese medicinal fungus, 'Lingzhi') by the addition of ethanol. *Biotechnology Letters* 26: 841–844.
 - J. A. KO 2008. Effect of UV-B Exposure on the Concentration of Vitamin D2 in Sliced Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) and White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*). *J. Agric. Food Chem.* 56, 3671–3674 3671.
 - Maximilian Wittig 2013. Single-run analysis of vitamin D photoproducts in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) after UV-B treatment. *Journal of Food Composition and Analysis* 31 266–274.
 - M.P. Katherine, M.R. David, L.H. Ronald, M. Bart, R.S. Ryan, F. Mary Jo, B. William and H. David. (2011). Vitamin D and Sterol Composition of 10 Types of Mushrooms from Retail Suppliers in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7841–7853.
 - M. Tebo, D. Frank, H. Kate, C. Hyun-Jung, R. Leni, F. John and N.Ken (2014). Selenium-Enriched *Agaricus bisporus* Mushroom Protects against Increase in Gut Permeability ex vivo and Up-Regulates Glutathione Peroxidase 1 and 2 in Hyperthermally-Induced Oxidative Stress in Rats. *Nutrients*, 6.
 - Oludemi Taofiq 2017. UV-irradiated mushrooms as a source of vitamin D2: A review. *Trends in Food Science & Technology* 70 82–94.
- Paul Urbain 2016. Impact on Vitamin D2, Vitamin D4 and Agaritine in *Agaricus bisporus* Mushrooms after Artificial and Natural Solar UV Light Exposure. *Plant Foods Hum Nutr* 71:314–321 DOI 10.1007/s11130-016-0562-5.

- Peng Xu 2008. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme and Microbial Technology* 42 325–331.
- Qiong Wang 2017. Bioactive Mushroom Polysaccharides: A Review on Monosaccharide Composition, Biosynthesis and Regulation. *Molecules* 2017, 22, 955; doi:10.3390/molecules22060955.
- Qiong Wang 2017. UV-C Treatment maintains quality and delays senescence of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Scientia Horticulturae* 225 380–385.
- Rao-Chi Chien 2016. Anti-inflammatory and antioxidant properties of pulsed light irradiated *Lentinula edodes*. *Journal of Food Processing and Preservation* ISSN 1745-4549.
- R.R. Simon, J.F. Borzelleca , H.F. DeLuca , C.M. Weaver (2013). Safety assessment of the post-harvest treatment of button mushrooms (*Agaricus bisporus*) using ultraviolet light. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 278–289
- S. Ryan, P. Katherine, H. Ronald, M. Ian (2011). Vitamin D Mushrooms: Comparison of the Composition of Button Mushrooms (*Agaricus bisporus*) Treated Postharvest with UVB Light or Sunlight. *J. Agric. Food Chem.* 59, 8724–8732.
- Shih-Jeng Huang 2015. Vitamin D2 content and antioxidant properties of fruit body and mycelia of edible mushrooms by UV-B irradiation. *Journal of Food Composition and Analysis* 42 38–45.
- Sundar Rao Koyyalamudi 2011. Concentration of vitamin D2 in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) exposed to pulsed UV light. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 976–979.
- U. Paul, V. Juan and J. Jette (2016). Impact on Vitamin D2, Vitamin D4 and Agaritine in *Agaricus bisporus* Mushrooms after Artificial and Natural Solar UV Light Exposure. *Plant Foods Hum Nutr.*
- Ulrich Krings, Ralf G. Berger 2014. Dynamics of sterols and fatty acids during UV-B treatment of oyster mushroom. *Food Chemistry* 149 (2014) 10–14.
- Viraj J. Jasinghe 2005. Bioavailability of vitamin D2 from irradiated mushrooms: an in vivo study. *British Journal of Nutrition*, 93 951–955.
- Viraj J. Jasinghe 2005. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D2 by UV irradiation. *Food Chemistry* 92 541–546.
- Viraj J. Jasinghe 2006. Ultraviolet irradiation: The generator of Vitamin D2 in edible mushrooms. *Food Chemistry* 95 638–643.
- Wenqiang Guan 2016. Effects of UV-C treatment and cold storage on ergosterol and vitamin D2 contents in different parts of white and brown mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food Chemistry* 210 129–134.
- Ya-Jie Tang, Jian-Jiang Zhong 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 31 20–28.