

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO DE UN PROCESO ENZIMÁTICO PARA LA
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE BETAGLUCANOS A
PARTIR DE LEVADURA DE CERVEZA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

KARLA GEORGINA ROMERO SOSA

DIRIGIDA POR

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO DE UN PROCESO ENZIMÁTICO PARA LA
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE BETAGLUCANOS A
PARTIR DE LEVADURA DE CERVEZA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

KARLA GEORGINA ROMERO SOSA

DIRIGIDA POR

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODALES

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
DIRECTOR

DRA. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA
SINODAL

DR. ALDO AMARO REYES
SINODAL

DR. JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
RESUMEN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Glucanos.....	1
1.1.1 Betaglucanos	1
1.1.2 Propiedades de betaglucanos.....	2
1.1.3 Aplicaciones de betaglucanos.....	2
1.2 Fuentes de obtención de betaglucano.....	3
1.2.1 Cereales	3
1.2.2 Bacterias.....	4
1.2.3 Hongos y levaduras	4
1.2.3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.3 Métodos de extracción de betaglucanos.....	5
1.3.1 Extracción por medio de agua caliente a presión	5
1.3.2 Extracción alcalina.....	6
1.3.3 Extracción ácida.....	6
1.3.4 Ultrasonido	6
1.3.5 Extracción asistida por enzimas	7
1.3.5.1 Glucanex.....	7
1.3.6 Extracción ultrasónica asistida por enzimas.....	7
1.4 Métodos de purificación de betaglucanos.....	8
1.4.1 Precipitación de proteínas	8
1.4.2 Tratamiento con solventes.....	8
1.4.3 Columna de fraccionamiento	8
1.5 Metodología de superficie de respuesta	9
2. HIPÓTESIS.....	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 General	11
3.2 Específicos	11

4. METODOLOGÍA	12
4.1 Materiales	12
4.2 Métodos	12
4.2.1 Obtención de células de levadura	12
4.2.2 Diseño experimental	12
4.2.3 Rendimiento de disrupción celular (determinación de proteína)	14
4.2.4 Preparación de células de levadura	15
4.2.5 Extracción enzimática asistida por ultrasonido (EEAU)	15
4.2.6 Determinación de proteínas por el método de Lowry	16
4.2.7 Modelo de optimización	16
4.2.8 Determinación de betaglucano	17
4.2.9 Cálculo del rendimiento del betaglucano producido	17
4.2.11 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	18
4.2.12 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	18
4.2.13 Análisis estadístico	18
5. RESULTADOS	19
5.1 Conteo y viabilidad celular	19
5.2 Obtención de modelos para el cálculo de la proteína soluble	19
5.3 Superficie de respuesta en el rendimiento de lisis celular	19
5.4 Validación del modelo de optimización	24
5.5 Determinación de betaglucano	24
5.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	24
5.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	25
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
6.1 Conteo y viabilidad celular	27
6.2 Análisis estadístico y ajuste de modelos	27
6.3 Análisis de superficie de respuesta en el rendimiento de lisis celular	27
6.4 Experimentos de verificación de EEAU	33
6.6 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	37
8. REFERENCIAS	41
9. ANEXOS	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Codificación de los factores de la extracción enzimática con sus respectivos niveles.....	13
2 Codificación de los factores de la extracción ultrasónica con sus respectivos niveles.....	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estructura y tipo de enlaces en el A) alfa glucano y B) beta glucano	1
2 Viabilidad celular. Micrografía 100x.	19
3 Gráficas de superficie de respuesta para proteína soluble..	21
4 Gráficas de superficie de respuesta para proteína soluble..	23
5 Espectro de FT-IR de levadura.	25
6 Microscopía electrónica de barrido de células de levadura.	26

RESUMEN

Los betaglucanos son polímeros de glucosa que se mantienen unidos por enlaces β -(1-3) y β -(1-6), y se encuentran en las paredes celulares de distintas fuentes naturales. Estos polisacáridos son importantes por su actividad biológica y sus funciones medicinales. Una cantidad importante de betaglucano se obtiene de la pared celular de la levadura, especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*. Existen múltiples métodos para lograr la extracción de los betaglucanos; los procedimientos más comunes incluyen la implementación de tratamientos ácidos o básicos que requieren altos niveles de purificación para obtener un betaglucano puro. Sin embargo, existen otros métodos como la extracción con agua caliente cuyo rendimiento es bajo. El objetivo del presente trabajo es obtener betaglucanos mediante un método enzimático utilizando como fuente levadura generada como subproducto del proceso de fermentación alcohólica en cervecería. Para ello, se realizó una extracción enzimática asistida por ultrasonido, usando un diseño experimental Box-Behnken y los resultados fueron optimizados mediante la metodología de superficie de respuesta. La proteína liberada después de las extracciones se utilizó como indicador de lisis celular. Las condiciones óptimas de operación según el modelo de segundo orden para la extracción enzimática (EE), fueron concentración de enzima del 15 % (p/p), temperatura 37 °C, pH 6.3 y tiempo de 6 h, alcanzando una concentración de proteína soluble de 463.8 ± 2.1 $\mu\text{g/mL}$. El producto de la EE se sometió a extracción ultrasónica obteniéndose 1041.7 ± 6.1 μg proteína/mL, usando una amplitud de 40 %, por 15 min con pulsos de 40 s y relación sólido-líquido de 1:50 (p/v), proceso denominado extracción enzimática asistida por ultrasonido (EEAU), obteniéndose otro modelo de segundo orden. La precisión global de los modelos fue muy alta, ya que el coeficiente de determinación (R^2) para la EE fue de 96.97 %, mientras que R^2 para la EEAU fue de 99.18 %. Se obtuvo el 68 ± 4.5 % del total de betaglucano presente en la levadura.

1. ANTECEDENTES

1.1 Glucanos

Los glucanos son polisacáridos compuestos por monómeros de glucosa y se nombran de acuerdo a su tipo de enlace y los carbonos involucrados en su unión, o bien, reciben nombres específicos. En general, los glucanos se dividen en dos grandes clases: unidos por enlaces alfa y enlaces beta, cuyas características y funciones son diferentes (Ruiz-Herrera, 2016). Además de presentar funciones distintas, difieren en el aspecto estereoquímico; los enlaces glucosídicos α se forman en una posición axial, mientras que los enlaces glucosídicos β ocupan una posición ecuatorial en la conformación de la silla (Kagimura, 2015).

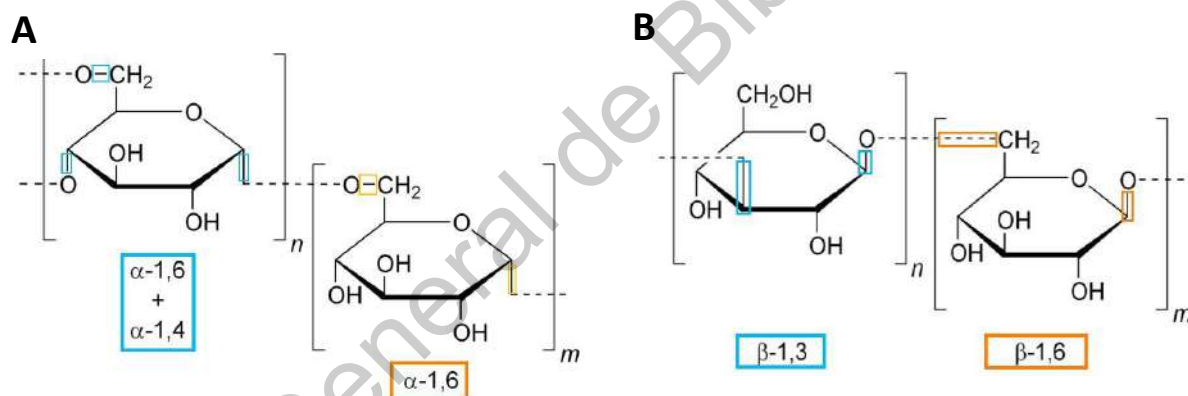


Figura 1. Estructura y tipo de enlaces en el A) alfa-glucano y B) beta-glucano (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7662308>)

Estos polisacáridos son biomoléculas importantes presentes en todos los dominios, que ocurren como materiales de almacenamiento en animales, factores de virulencia secretados por bacterias y componentes estructurales conservados de las paredes celulares de levaduras, hongos, algunas bacterias y plantas. Su diversidad hace a los glucanos responsables de un gran número de actividades biológicas (Liu, 2018).

1.1.1 Betaglucanos

Los betaglucanos han atraído la atención a lo largo de los años debido a sus propiedades físicas y químicas. Los betaglucanos de diferentes fuentes y con

diferentes pesos moleculares tienen diferentes actividades biológicas (Zhu, 2016).

Los betaglucanos de distintas fuentes pueden variar entre sí, su estructura química nativa depende de la fuente de la que se aíslan. Las estructuras difieren en que las unidades de glucosa se unen de distintas maneras (Tam, 2013).

1.1.2 Propiedades de betaglucanos

Los betaglucanos en solución tienen propiedades físicas altamente apreciadas en la industria alimentaria, ya se pueden emplear para generar: espesamiento, estabilización, emulsión y gelificación (Zhu, 2015). Estos compuestos proporcionan no solo características organolépticas y valor nutricional, sino también propiedades funcionales beneficiosas para la salud humana (Mena-García, 2019). Pinto y colaboradores (2015) describieron que los betaglucanos poseen actividades inmunoestimulantes, antioxidantes y antitumorales, además de efectos emulsionantes y prebióticos. Los betaglucanos con enlaces (1-3) y (1-6) han demostrado actividad hipoglucémica en estudios con animales, también son conocidos por su actividad hipocolesterolémica y en la reducción de aterosclerosis (Perez-Quirce *et al.*, 2018).

Los beneficios para la salud de las cepas productoras de betaglucanos están relacionados con las actividades biológicas de estos biopolímeros. La ciencia funcional de los alimentos tiene como objetivo promover la microbiota del colon mediante el uso de prebióticos, los cuales son ingredientes / componentes / suplementos alimenticios no digeribles que confieren beneficios para la salud del huésped tras la estimulación específica de poblaciones seleccionadas. En consecuencia, se pueden utilizar como base de productos de valor agregado (Yildiz, 2018).

1.1.3 Aplicaciones de betaglucanos

La industria alimentaria puede obtener los beneficios del betaglucano para la obtención de productos alimenticios nutraceuticos debido a su función inmunoestimuladora, antioxidante, antitumoral y con efectos prebióticos (Pinto, 2014). En la industria de alimentos puede usarse para mejorar propiedades

reológicas. Además, los betaglucanos tienen potencial como estabilizantes, sustitutos de grasa, agentes aglutinantes, de retención de aceite y de batido, todas estas características lo hacen adecuado para su uso como ingrediente en productos alimenticios (Ahmad, 2018).

1.2 Fuentes de obtención de betaglucano

Los betaglucanos pueden obtenerse de diversas fuentes naturales, generalmente, como parte de la estructura de la pared celular. Este puede encontrarse en organismos como levaduras; por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, hongos como *Aspergillus* y especies de *Agaricus*, algas, hongos comestibles como el reishi, *Ganoderma applanatum* y cereales como la avena, cebada, trigo y centeno.

1.2.1 Cereales

El β -(1-3)- y β -(1-4)-glucano es un polisacárido de la pared celular presente en los granos de cereales y se puede encontrar de manera específica en el endospermo del cereal y células de aleurona (Nie, 2018). Estos betaglucanos son polímeros distintivos de la glucosa y se diferencian de otros polímeros, no solo por su origen sino también por sus propiedades físico-químicas. Dichas propiedades contribuyen a que la extracción de betaglucano del cereal sea difícil, además de que incrementa su costo respecto de otras fuentes (Zhu, 2016; Jayachandran, 2018). Estudios han demostrado que poseen actividad biológica reduciendo el colesterol en sangre y regulando los niveles de glucosa; estos efectos están relacionados con la capacidad de los glucanos para contribuir al aumento de la viscosidad en el tracto gastrointestinal y pueden ralentizar la absorción de glucosa, interferir con la digestión del almidón y la absorción del colesterol. Además, los betaglucanos de los cereales son activos como fibras solubles, modificando los indicadores clínicos en la fisiopatología de las enfermedades degenerativas crónicas como la diabetes y la dislipidemia (Kagimura y col., 2015).

Ejemplos de cereales donde puede encontrarse este polisacárido incluyen avena, cebada, centeno y trigo. El contenido de betaglucano en trigo, centeno, avena y cebada está generalmente en los intervalos <1, 1-2, 3-7 y 3-11 %, respectivamente,

siendo las más relevantes en avena y cebada por su alto contenido respecto a las otras (Wang, 2017).

1.2.2 Bacterias

Gran variedad de bacterias; incluidos patógenos importantes de los seres humanos, del ganado y de las plantas, producen polisacáridos extracelulares y capsulares. Un ejemplo de estos son los betaglucanos, estos polisacáridos producidos en algunas bacterias son moléculas relativamente simples y pueden encontrarse con una estructura lineal, ramificada o cíclica, o bien, como una cadena lateral (McIntosh, 2005). Los glucanos lineales incluyen los β -(1-3)-glucanos, los β -(1-3)- y β -(1-6)-glucanos son aquellos que tienen estructuras ramificadas o cíclicas y los β -(1-3)- y β -(1-2)-glucanos son glucanos de cadena lateral (Lam y Cheung, 2013).

Los betaglucanos lineales, detectados por primera vez en bacterias pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, se conocen comúnmente como Curdlán, un polímero hidrofóbico, el cual puede estar estructurado hasta por 12,000 unidades de glucosa. Por el contrario, los glucanos cíclicos son compuestos hidrófilos producidos por varias especies de bacterias simbióticas de plantas, incluidos *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium loti*. Finalmente, el glucano de cadena lateral es un polisacárido soluble en agua, que muestra una estructura principal de β -(1-3)-glucano y presenta ramas laterales densamente unidas por un enlace β -(1-2) (Watson, 2015).

1.2.3 Hongos y levaduras

El betaglucano es uno de los componentes clave de la pared celular de los hongos. La levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) es una fuente típica de betaglucano, cuya pared celular está conformada por dos tipos de este polisacárido. Uno de los polisacáridos de glucosa, el β -(1-3)-glucano, es el componente estructural principal de la pared celular, mientras que el β -(1-6)-glucano se encuentra relativamente en menor cantidad, pero es muy importante para la reticulación (Borchani, 2014).

1.2.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Las células de levadura están rodeadas por una pared celular rígida y resistente. La pared celular de *S. cerevisiae* puede representar hasta el 30% de la masa seca

celular. Se compone principalmente de glucanos y manoproteínas. También contiene una pequeña cantidad de quitina y lípidos. La estructura de la pared celular de *S. cerevisiae* se puede dividir en dos partes: capa interna y capa externa. La capa externa de la pared celular consiste en manoproteínas glicosiladas. La capa interna consiste en betaglucano y quitina. Las cadenas de (1-3)-glucano tienen una estructura helicoidal triple y son responsables de la resistencia mecánica de la pared celular (Kim, 2006). El β -(1-3)-glucano, es el componente estructural principal de la pared celular. Mientras que el β -(1-6)-glucano se encuentra relativamente en menor cantidad, pero es muy importante para la reticulación (Borchani, 2014). El glucano que se encuentra en *S. cerevisiae* consiste en aproximadamente el 85% de (1-3)-glucano y el 3% de (1-6)-glucano (Kim, 2006). Los glucanos representan el 50-60% de la composición de la pared celular, las manoproteínas y la quitina representan el 35-40 % y el 1-3 %, respectivamente (Kwiatkowski, 2012).

1.3 Métodos de extracción de betaglucanos

1.3.1 Extracción por medio de agua caliente a presión

Es el método tradicional para extraer polisacáridos, debido a su bajo costo (Nie, 2018). Es una técnica que utiliza agua líquida como solvente de extracción a temperaturas superiores al punto de ebullición del agua (100 °C/373 K, 0.1 MPa a nivel del mar), pero por debajo de su punto crítico (374 °C/647 K, 22.1 MPa a nivel del mar) (Plaza, 2015). La alta temperatura y presión pueden aumentar la solubilidad de los compuestos de interés, así como disminuir la viscosidad y tensión superficial del disolvente, permitiendo una mejor penetración en la matriz de la muestra (Yuan, 2019). El tiempo y la temperatura de extracción, así como la relación entre el volumen de agua y el peso de la materia prima son importantes en este proceso. Normalmente, los lípidos y otras sustancias de bajo peso molecular se eliminan primero con etanol al 95 % (v/v). Luego, el residuo que contiene los polisacáridos se seca y se extrae el betaglucano con agua hirviendo varias veces. Finalmente, los líquidos de extracción se separan y se recogen por centrifugación (Nie, 2018).

1.3.2 Extracción alcalina

La materia prima se mezcla con una solución de NaOH a pH de 9.0-10.0. Luego se neutraliza, se concentra mediante centrifugación y se precipita con etanol al 75 % (v/v) a 4 °C durante 24 h. Después se desproteiniza para producir un extracto purificado, se dializa y finalmente se liofiliza para obtener el polisacárido deseado (Sun, 2018).

1.3.3 Extracción ácida

Se extrae el polisacárido con un ácido mineral a pH 2.0 con calentamiento para la degradación de la pared celular de la levadura. Después de la acidólisis la solución se neutraliza con NaOH a temperatura ambiente, seguido de centrifugación para obtener un sobrenadante; el sobrenadante se dializa, seguido de liofilización para obtener el betaglucano (Sun, 2018; Zheng, 2019).

1.3.4 Ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido (UAE por sus siglas en inglés) se puede definir como la aplicación de ondas ultrasónicas de alta intensidad para acelerar la extracción de un material sólido en un solvente líquido. La mejora ultrasónica de la extracción sólido-líquido se atribuye principalmente a las actividades hidrodinámicas de la cavitación acústica. Las fuerzas hidrodinámicas pueden causar la ruptura de las paredes celulares y reducir la resistencia al transporte de moléculas a través de las partículas sólidas y al líquido, mejorando la extracción (Cheung, 2013).

La UAE es una técnica rápida y eficiente que se desarrolló para la extracción de polisacáridos. Como es bien sabido, la aplicación de los UAE podría ofrecer muchas ventajas, incluida la reducción de disolventes, la temperatura y el tiempo de extracción. Se ha informado que la tasa de extracción de los UAE está correlacionada con la potencia de ultrasonido por unidad de volumen de líquido, y la cinética de los UAE depende en gran medida de la microestructura y morfología de las partículas sólidas, así como a su grado de agregación o dispersión en el líquido de extracción (Nie, 2018).

1.3.5 Extracción asistida por enzimas

El principio básico de la extracción asistida por enzimas es la ruptura de la pared celular del material biológico al hidrolizarla utilizando una enzima como catalizador en condiciones experimentales óptimas, para liberar los componentes intracelulares. El sitio activo de la enzima se une a la pared celular, esto hace que la enzima sufra un cambio en su conformación para que el sustrato se ajuste a su sitio activo, lo que provoca una interacción máxima entre los dos. La ruptura de los enlaces glicosídicos debido a la actividad catalítica de la enzima libera así los componentes activos de la pared celular (Shamraja, 2018). Este método involucra bajas temperaturas y no necesita solventes ácidos o básicos que representarían un problema en su disposición que puede causar un daño ambiental (Nadar, 2018).

Hay dos enfoques posibles para la extracción asistida por enzimas de polisacáridos: el primero es el uso de enzimas que son capaces de destruir barreras biológicas, es decir, la pared celular y las membranas para promover el aislamiento del polisacárido deseable. El segundo consiste en el uso de enzimas que degradan parcialmente los polisacáridos deseables en pequeños fragmentos para facilitar la extracción (Shamraja, 2018).

1.3.5.1 Glucanex

La enzima de lisis de *Trichoderma harzianum* conocida también con el nombre de Glucanex, es un complejo enzimático que consta de varias isoenzimas que contienen actividad de β -1,3 glucanasa involucradas en hongos, bacterias o plantas. Generalmente, esta enzima se usa para hidrolizar los oligosacáridos de la célula de levadura para obtener β -glucano de la pared celular (Bey, 2016).

1.3.6 Extracción ultrasónica asistida por enzimas

Dos de los principales tipos de alteración celular son el método físico (mecánico) y químico / enzimático (no mecánico), estos métodos también se pueden usar en combinación entre sí para lograr una sinergia (Tavanandi, 2018). Las extracciones asistidas por enzimas combinadas con ultrasonidos, son un ejemplo de método físico-enzimático, y se han desarrollado como nuevos métodos para la extracción de

moléculas bioactivas (Tavanandi, 2019). Teniendo en cuenta la alta eficiencia de la reacción asistida por enzimas y la simplificación de la operación experimental, se utiliza irradiación ultrasónica para acelerar el pretratamiento enzimático y lograr la extracción (Feng Li, 2017). La extracción enzimática asistida por ultrasonido (EEAU) es un método novedoso que utiliza la hidrólisis enzimática específica a modo de pretratamiento, posteriormente, acopla las ondas ultrasónicas que pasan a través del medio disolvente, produciendo una cavitación acústica que da como resultado un rendimiento de extracción mejorado (Lin, 2020).

1.4 Métodos de purificación de betaglucanos

Después de la extracción de polisacáridos, las muestras podrían someterse a varios pasos de purificación para eliminar otras sustancias como proteínas, compuestos fenólicos, monosacáridos, aminoácidos u otras moléculas relacionadas (Ruthes, 2015).

1.4.1 Precipitación de proteínas

Las proteínas pueden eliminarse mediante precipitación con ácido tricloroacético (20%, p/v), mediante tratamiento con la enzima proteasa a 40 °C durante 1 h (pH 7.5) utilizando el método Sevag, o por tratamiento con reactivo fenólico (Smiderle, 2013).

1.4.2 Tratamiento con solventes

El tratamiento con solvente más común es la precipitación con 2 o 3 volúmenes de etanol frío. Este solvente deshidrata los polisacáridos y los hace precipitar, separando estas moléculas de alto peso molecular de las de bajo peso molecular. Además, los D-glucanos en configuración β suelen ser más solubles en solventes apolares como el dimetilsulfóxido. Por lo tanto, el tratamiento con este solvente es un método efectivo para separar los β -D-glucanos de otros polisacáridos o D-glucanos solubles en agua (Ruthes, 2015).

1.4.3 Columna de fraccionamiento

Otra forma de obtener fracciones de polisacárido puro es el fraccionamiento en columna. Los extractos crudos pueden contener varios polisacáridos con diferentes tamaños moleculares. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus

siglas en inglés) es el método más común utilizado porque permite la separación de polisacáridos de acuerdo con su tamaño, y también permite la determinación posterior de su peso molecular. La cromatografía de intercambio iónico también se puede utilizar, especialmente para separar polisacáridos neutros de los cargados (Zhu, 2015).

1.5 Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (RSM por sus siglas en inglés), es una técnica estadística eficaz, puede investigar y optimizar procesos complejos cuando las variables independientes tienen un efecto combinado sobre los valores de respuesta. La principal ventaja de esta técnica es que se puede reducir significativamente el número de ensayos experimentales necesarios y aun así reflejar los efectos completos de las variables en un proceso (Huizen 2019). En este método se evalúan múltiples parámetros con sus interacciones y a través de los datos obtenidos, se genera un modelo matemático que pueda predecir los valores óptimos de un proceso (Feng Li, 2017; Nadar, 2018). Actualmente, la RSM se utiliza como una popular herramienta de modelado de simulación para la predicción de condiciones de proceso para estudios científicos y procesos industriales. Muchos investigadores han utilizado la metodología de superficie de respuesta para optimizar los parámetros del proceso a través del desarrollo de una ecuación de regresión para predecir una respuesta (Zhang, 2020) (Chelladurai, 2020). El diseño Box–Behnken es un diseño experimental para RSM que se puede utilizar para optimizar los parámetros del proceso para mejorar el rendimiento, la recuperación y la rentabilidad. Además, ha sido ampliamente utilizado en muchos estudios sobre extracción de componentes bioactivos (Zhang, 2020) Es un diseño cuadrático independiente, es decir, que no contiene un diseño factorial incrustado o factorial fraccional. En este diseño, las combinaciones de tratamiento están en los puntos medios de los bordes del espacio de proceso y en el centro. Estos diseños son rotativos y requieren 3 niveles de cada factor. Adicionalmente, ha probado ser más eficiente y más fácil de organizar e interpretar experimentos con este diseño en comparación con otros (Chen, 2014).

2. HIPÓTESIS

La extracción de betaglucanos de *Saccharomyces cerevisiae* mediante un proceso enzimático asistido por ultrasonido será más eficiente que los métodos convencionales, debido a que en conjunto las enzimas favorecen el debilitamiento de la pared celular de manera específica y el ultrasonido completa el proceso de lisis celular.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Desarrollar un procedimiento de extracción enzimática asistida por ultrasonido para la extracción y purificación parcial de betaglucanos a partir de levadura agotada de cerveza.

3.2 Específicos

- ▲ Determinar a través de un diseño experimental el efecto de la relación betaglucanasa-levadura, tiempo, pH y temperatura sobre la hidrólisis de la levadura y establecer los parámetros óptimos para el tratamiento enzimático de extracción.
- ▲ Determinar mediante un diseño experimental el efecto del tiempo, amplitud y relación sólido-líquido sobre la lisis de la pared celular de células de levadura por medio de ultrasonido, y evaluar los parámetros óptimos de extracción asistida por ultrasonido.
- ▲ Caracterizar los betaglucanos obtenidos del proceso de extracción mediante espectroscopía de infrarrojo y determinar la estructura celular de la levadura mediante microscopía electrónica de barrido.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

Crema de levadura Plasset, REX-1115 donada por la empresa RICAP (0.41 g de proteína/g de célula de levadura), Glucanex (enzima de lisis de *Trichoderma harzianum*, ≥ 10 unidades/g) (Merck, Darmstadt, Alemania), kit enzimático β -Glucan Assay Kit: Yeast & Mushroom (Megazyme, Wicklow, Irlanda). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico y obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania).

4.2 Métodos

4.2.1 Obtención de células de levadura

Las muestras de levadura fueron obtenidas de crema de levadura, residuo del proceso de fermentación alcohólica de la cerveza. Esta fue adquirida en forma de un polvo de levadura, a la cual se le realizó el tratamiento EEAU para la extracción de los betaglucanos. Se hizo un recuento del número de células de levadura utilizando una cámara de Neubauer (Bright light, Horseham, PA, EUA) y una tinción con azul de metileno para revisar la viabilidad de las células.

4.2.2 Diseño experimental

Para optimizar el proceso de EEAU se estableció una metodología de superficie de respuesta (MSR), bajo un diseño de Box-Behnken (DBB), el cual se hizo de manera independiente; para la extracción enzimática y la extracción enzimática-ultrasónica.

Para el primer procedimiento de extracción, se llevó a cabo un proceso enzimático para el debilitamiento de la pared celular de la levadura, para ello, se realizó un diseño experimental Box-Behnken. Los cuatro factores seleccionados con tres niveles fueron:

- La relación betaglucanasa-levadura de 5, 10 y 15 %, representada por X_1 .
- El tiempo de reacción de 1, 3 y 6 horas, representada por X_2 .
- La temperatura de la reacción de 25, 30 y 37 °C, representada por X_3 .
- El pH de la reacción de 5, 6 y 7.5, representada por X_4 .

La variable respuesta (lisis celular) fue el contenido de proteína soluble liberada después de cada tratamiento, la cual se midió por el método de Lowry (Lowry, 1951) utilizando albúmina de suero bovino como estándar. La codificación de los niveles y los factores para la extracción enzimática se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Codificación de los factores de la extracción enzimática con sus respectivos niveles.

Factores	Símbolo	Códigos de niveles		
		-1	0	1
Relación betaglucanasa-levadura (% p/p)	X ₁	5.0	10.0	15.0
Tiempo (h)	X ₂	1	3	6
Temperatura (°C)	X ₃	25	30	37
pH	X ₄	5.0	6.0	7.5

Posterior a la lisis enzimática, se realizó un procedimiento enzimático-ultrasónico para continuar con la ruptura de la pared celular de la levadura. Al igual que en la primera extracción, se realizó un diseño Box-Behnken, los tres factores seleccionados con sus respectivos niveles (tres) fueron:

- Tiempo de sonicación de 5, 10 y 15 min, representada por X₅.
- Proporción sólido: líquido de 1:50, 1:125 y 1:200, representada por X₆.
- Amplitud de 40, 55 y 70 %, representada por X₇.

De la misma manera que en el proceso anterior, la variable respuesta (lisis) fue lisis la proteína soluble liberada después de la ultrasonificación. La codificación de los niveles y los factores de la extracción enzimática-ultrasónica se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Codificación de los factores de la extracción ultrasónica con sus respectivos niveles.

Factores	Símbolo	Códigos de niveles		
		-1	0	1
Tiempo de sonicación (min)	X ₅	5	10	15
Relación sólido:líquido	X ₆	1:50	1:125	1:200
Amplitud (%)	X ₇	40	55	70

4.2.3 Rendimiento de disrupción celular (determinación de proteína)

Una vez terminados los tratamientos enzimático y ultrasónico, las soluciones resultantes se centrifugaron a 4,000 rpm durante 15 min, y se determinó la concentración de proteína soluble en el sobrenadante de la solución utilizando el método de Lowry, leyendo en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10-UV, Waltham, MA, EUA) a una longitud de onda de 750 nm. El rendimiento de disrupción celular se definió como la relación entre el contenido de proteína soluble en el extracto y el contenido de proteína total en la suspensión de levadura, usando la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{P_D - P_A}{P_T - P_A} \times 100$$

Donde LC: rendimiento de disrupción celular, P_D: proteína soluble después de la disrupción, P_A: proteína soluble antes de la disrupción, P_T: proteína total, obtenida por el método Kjeldahl (Nx6.25) (Kjeldahl, 1883).

La concentración final se comparó con la concentración al comienzo de la reacción. La diferencia entre las concentraciones iniciales y posteriores a la reacción son las proteínas citoplasmáticas filtradas de la levadura lisada.

4.2.4 Preparación de células de levadura

Antes de iniciar con el proceso de extracción, se llevó a cabo un lavado de la crema de levadura para eliminar cualquier impureza remanente de su anterior procesamiento. Para ello, se pesaron 0.5 g de crema de levadura en polvo y se suspendieron en 50 mL de agua destilada, la suspensión se dejó lavando durante 5 min en agitación constante (180 rpm) y posteriormente se centrifugó a 4,000 rpm, 4 °C durante 15 min, desechando el sobrenadante. Este proceso se repitió tres veces más con la misma muestra.

Una vez finalizado el lavado, se determinó el peso seco de la pasta húmeda de células de levadura, esto con la intención de cuantificar la pérdida de masa a través de los lavados. La determinación de peso seco después del lavado se realizó por triplicado y se estableció como la masa a tomar en cuenta para los procedimientos futuros.

4.2.5 Extracción enzimática asistida por ultrasonido (EEAU)

4.2.5.1 Extracción enzimática

Para la extracción enzimática (EE) se siguió la metodología propuesta por Feng Li, 2017, con algunas modificaciones. Se colocó la pasta de células de levadura en un matraz volumétrico y se añadieron 130 mL de una solución amortiguadora de fosfatos a pH correspondiente (5, 6 o 7). Posteriormente se colocó la enzima lítica “Enzima de lisis” (“Lysing Enzyme” por su nombre en inglés), obtenida de *Trichoderma harzianum* para la ruptura de la pared celular. Dicha enzima se adicionó en las diferentes concentraciones mencionadas en el diseño experimental (5.0, 10.0 o 15.0 % p/p seco de células de levadura), tomando en cuenta un peso de aproximadamente 0.2 g peso seco de células de levadura. La suspensión se incubó en un agitador orbital probando diferentes temperaturas de acuerdo al diseño experimental (25, 30 o 37 °C) en agitación constante durante 6 horas, tomando una alícuota al cabo de 1, 3 y 6 horas. Inmediatamente después de la toma de cada alícuota, se inactivó la enzima llevándola a ebullición durante 5 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y después se centrifugaron a 4,000 rpm, 4°C durante 15 min. A cada sobrenadante obtenido se le midió el contenido de proteína soluble por el método de

Lowry y se leyó a una longitud de onda de 750 nm.

Los experimentos realizados para la extracción enzimática obtenidos a partir del software Minitab v. 18.0 (Proveedor Pensilvania, EUA), se presentan en el Anexo 1.

4.2.5.2 Extracción ultrasónica

Para la extracción ultrasónica (EU) se eligió la muestra con el mayor contenido de proteína soluble obtenida del proceso enzimático, dicha muestra se centrifugó a 4000 rpm, 4°C durante 15 min, finalmente se secó en una estufa a 40 °C durante toda la noche (Felisa Horno AR – 290, Zapopan, JAL, MEX) hasta alcanzar peso constante. La muestra seca se colocó en agua destilada acorde a la proporción sólido-líquido propuesta en el diseño experimental (1:50, 1:100 y 1:200). Las muestras se sonicaron utilizando un procesador ultrasónico (Vibracell Sonics, vcx500, Newtown, CT, EUA) las variables utilizadas en este experimento fueron amplitud (40, 55 y 70 %) y tiempo (5, 10 y 15 min). El equipo se programó con pulsos de 40 segundos y descansos de 20 segundos, la suspensión se mantuvo en baño de hielo durante todo el procedimiento. Al finalizar la sonicación, la solución fue centrifugada a 4000 rpm, 4 °C durante 15 min, se determinó la proteína soluble en el sobrenadante mediante el método de Lowry y la pastilla celular fue secada en estufa a 40 °C durante toda la noche. Los experimentos realizados para la extracción ultrasónica se encuentran en el Anexo 2.

4.2.6 Determinación de proteínas por el método de Lowry

Al finalizar cada etapa de la extracción, se determinó la concentración de proteína soluble en el sobrenadante de las suspensiones utilizando el método de Lowry. La concentración de proteína final se comparó con la concentración al comienzo de extracción. La diferencia entre las concentraciones iniciales y posteriores a las extracciones son las proteínas citoplasmáticas filtradas de la levadura lisada.

4.2.7 Modelo de optimización

Los resultados de proteína soluble de ambas extracciones permitieron la obtención de un modelo para la predicción de los experimentos óptimos, basándose en aquellas combinaciones que resultasen en una mayor cantidad de proteína soluble después

de cada tratamiento. Los modelos para las extracciones EE y EEAU se construyeron con base en la Ecuación 1:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (1)$$

Donde β_0 es un valor de compensación; β_i es el efecto lineal del factor de entrada X_i ; β_{ii} es el efecto cuadrático del factor de entrada X_i y β_{ij} es el efecto de interacción lineal entre el factor de entrada X_i y X_j (Myers, 2009).

Para la validación del modelo se utilizó la siguiente ecuación:

Error porcentual absoluto medio:

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{y - \hat{y}}{y} \right| * 100 \quad (2)$$

Donde, n es el número de experimentos/ datos, y es el valor real y \hat{y} es el valor predicho. Valores pequeños del error porcentual absoluto medio (MAPE por sus siglas en inglés), así como un valor de R^2 alto indican una mejor precisión del modelo.

4.2.8 Determinación de betaglucano

Después de la validación del modelo, se determinó el contenido de betaglucano del experimento óptimo, de acuerdo con el método de McCleary y Glennie-Holmes (1985), utilizando el kit enzimático β -Glucan Assay Kit: Yeast & Mushroom (Megazyme, Wicklow, Irlanda) (Borchani, 2014).

4.2.9 Cálculo del rendimiento del betaglucano producido.

El rendimiento de sólidos de los betaglucanos producidos se calculó como el porcentaje de peso seco de los betaglucanos obtenidos después de la EEAU (precipitado secado en la estufa) a partir del betaglucano total contenido en la

levadura gastada sin tratamiento alguno (Varelas, 2016).

4.2.11 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Se determinó el análisis de estructura por FT-IR modelo LabRAM IR² (HORIBA Jobin Yvon, Kioto, Japón) 32 escaneos, con resolución de 4 cm⁻¹ en un rango 400 a 4000 cm⁻¹.

4.2.12 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se determinó la modificación en la estructura celular de la levadura después de cada extracción utilizando un microscopio electrónico de barrido (EVO-50, Carl Zeiss UltraPlus, Oberkochen, Alemania).

4.2.13 Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizarán por triplicado. Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los factores experimentales se utilizó la prueba de ANOVA ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS

5.1 Conteo y viabilidad celular

La viabilidad de las levaduras previa al tratamiento de extracción de betagluanos, se muestra en la Figura 2, en donde las células de levadura teñidas con azul de metileno indican muerte celular. En la micrografía se observa que todas las células presentes en la muestra están muertas.

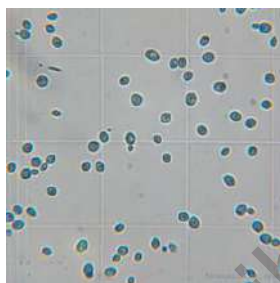


Figura 2. Viabilidad celular. Micrografía 100x.

5.2 Obtención de modelos para el cálculo de la proteína soluble

De la Ecuación 1 se obtuvo el modelo para la EE (Ecuación 3):

$$Y \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = -2282 + 2536X_1 + 59.2X_2 - 4.3X_3 + 707.6X_4 - 6914X_1^2 - 3.10X_2^2 + 0.176X_3^2 - 2.26X_2X_4 \quad (3)$$

Donde Y es proteína soluble, X_1 es la concentración de enzima, X_2 el tiempo de enzimólisis, X_3 la temperatura y X_4 el pH a las cuales se lleva a cabo la reacción.

De igual manera se obtuvo el modelo para la EEAU (Ecuación 4):

$$Y \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = -365 + 426.2X_5 - 9.2X_6 - 32.15X_7 - 10.26X_5^2 + 0.158X_6^2 + 0.08411X_7^2 - 2.434X_5X_6 - 0.2162X_5X_7 + 0.2345X_6X_7 \quad (4)$$

Donde Y es proteína soluble, X_5 es el tiempo de sonicación, X_6 la amplitud y X_7 relación sólido: líquido.

5.3 Superficie de respuesta en el rendimiento de lisis celular

Las interacciones entre las variables con la relación entre las respuestas y los niveles

experimentales de cada variable se ilustran mediante las gráficas de superficie de respuesta (Figura 3). En el presente estudio, los resultados del análisis de significancia mostraron que las variables independientes: concentración de enzima, tiempo de enzimólisis, temperatura y pH fueron significativas ($p < 0.05$) para el modelo enzimático, así como el tiempo de sonicación, amplitud y relación sólido: líquido fueron significativas para el modelo ultrasónico.

En la Figura 3A, se muestra la cantidad de proteína soluble cuando las variables de concentración de enzima y tiempo de enzimólisis se encuentran en conjunto. Como puede observarse, la mayor cantidad de proteína soluble obtenida al evaluar estas dos variables es cuando ambas se encuentran en el valor máximo de su rango experimental. Por lo que, a mayor concentración de enzima y mayor tiempo de reacción, se obtendrá un mayor contenido de proteína. Algo similar sucede en la Figura 3B, donde el mayor contenido de proteína soluble se obtuvo cuando las variables concentración de enzima y temperatura se encontraban en su valor máximo de su respectivo rango de operación. En el caso de la Figura 3C, el mayor contenido de proteína soluble se obtuvo cuando la variable tiempo de enzimólisis estaba en su máximo nivel de operación, mientras que la variable pH quedó en un valor central del rango experimental.

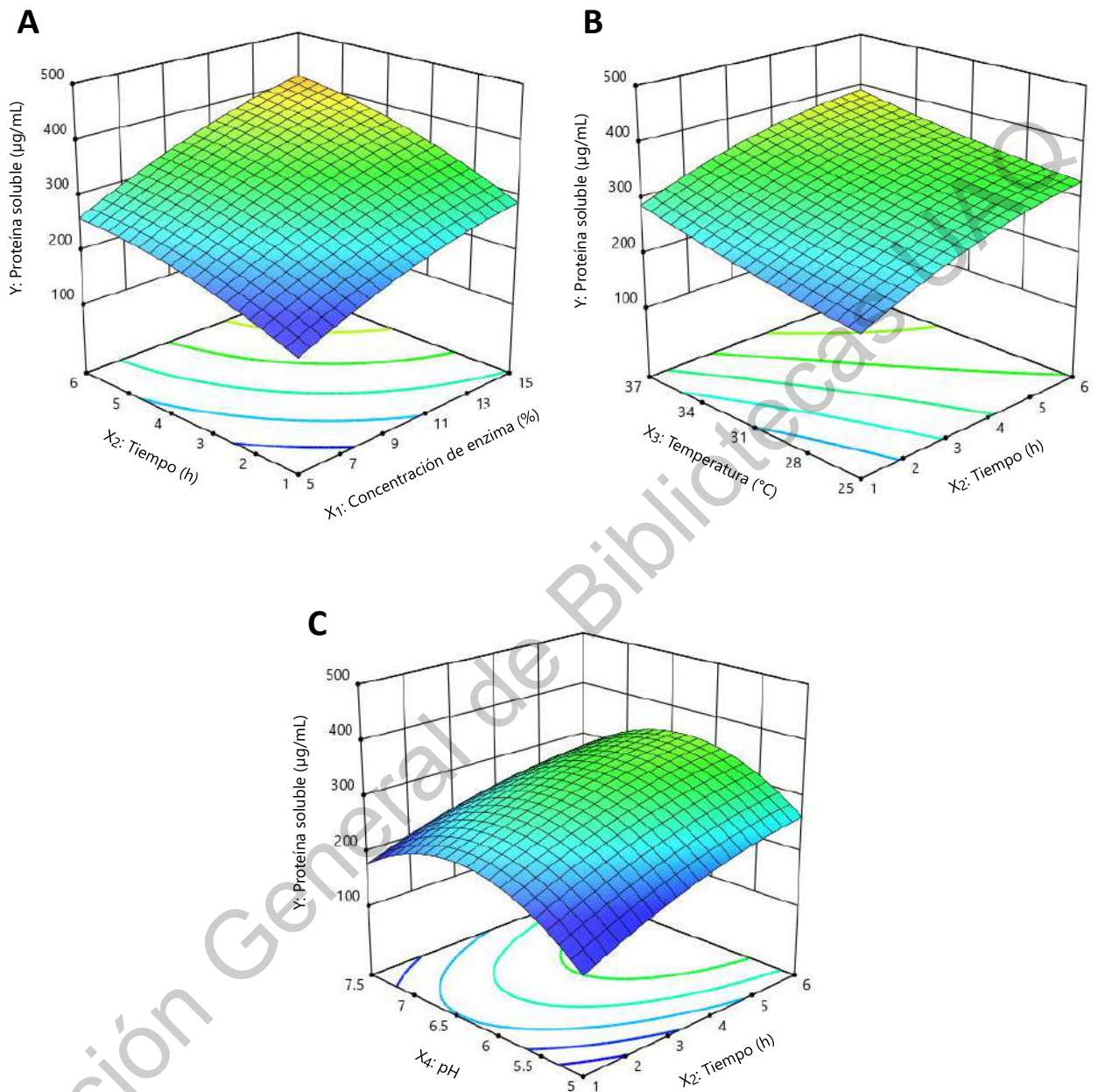


Figura 3. Gráficas de superficie de respuesta para proteína soluble. (A) efecto de la concentración de enzima y tiempo en el rendimiento de proteína soluble con valores constantes de temperatura (31 $^{\circ}\text{C}$) y pH (6.25). (B) efecto del tiempo y la temperatura en el rendimiento de proteína soluble con valores constantes de concentración de enzima (10 %) y pH (6.25). (C) efecto del tiempo y pH en el rendimiento de proteína soluble con valores constantes de concentración de enzima (10 %) y temperatura (31 $^{\circ}\text{C}$).

En la Figura 4A se encuentra la cantidad de proteína soluble cuando las variables X_5 (tiempo) y X_6 (amplitud) se encuentran en conjunto. En esta gráfica se puede observar que el mayor contenido de proteína se obtiene cuando la amplitud se encuentra en su máximo valor experimental, mientras que en la variable tiempo se encuentra en un valor más cercano al nivel intermedio del rango experimental. En la Figura 4B, se muestra la interacción de las variables concentración de enzima y temperatura, la relación sólido-líquido se encuentra en los dos extremos de su rango experimental, indicando que ya sea a un nivel mínimo o máximo de volumen, se liberará la mayor cantidad de proteína soluble mientras que la variable tiempo se encuentre en su máximo valor. Por último, la Figura 4C, muestra las interacciones entre las variables tiempo y temperatura, donde se puede observar la mayor cantidad de proteínas solubles en tanto ambas variables se encuentren en niveles similares de sus respectivos rangos experimentales, es decir, la combinación de los valores mínimos de tiempo y temperatura, o sus opuestos; ambos valores máximos.

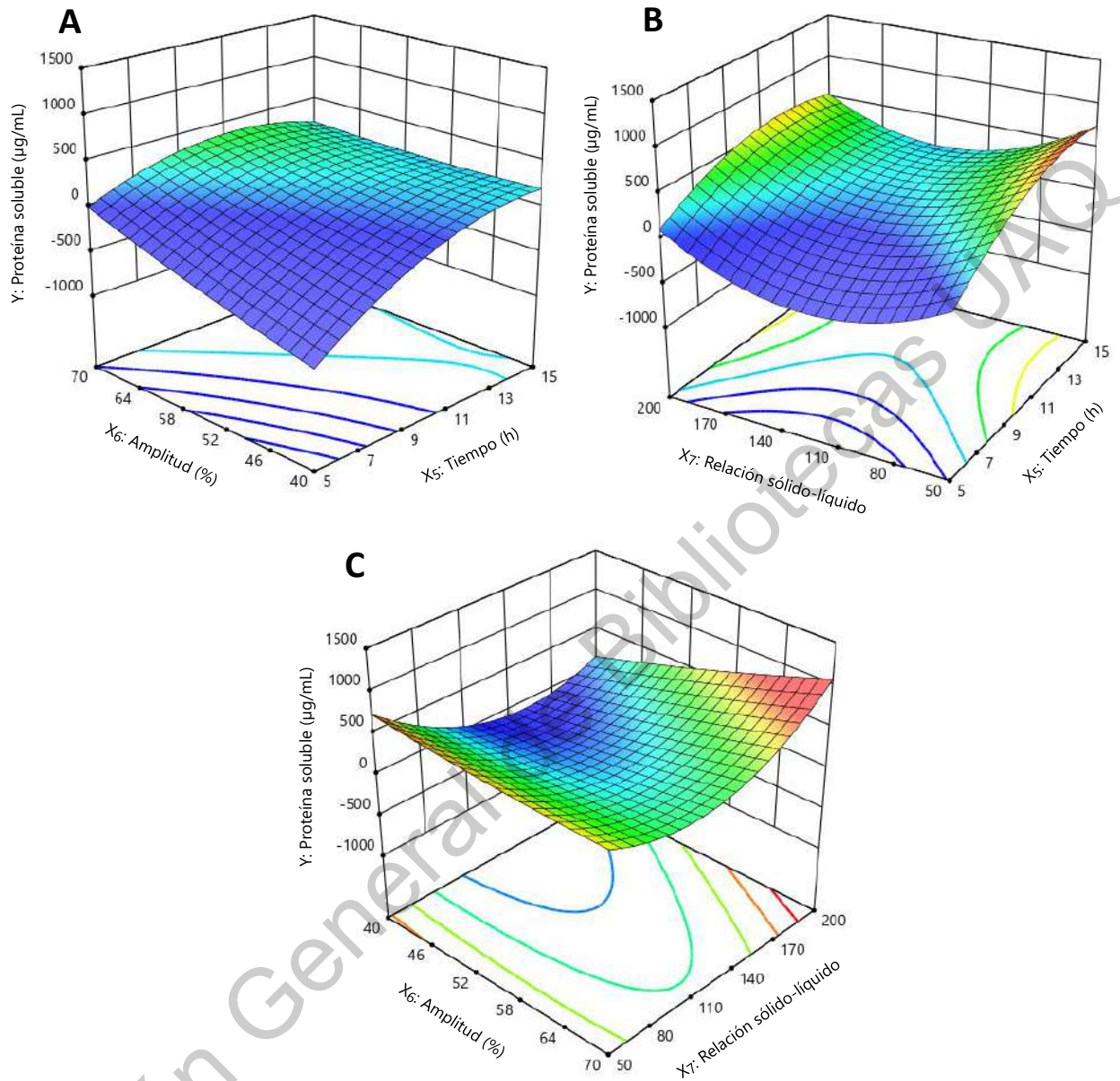


Figura 4. Gráficas de superficie de respuesta para proteína soluble. (A) efecto del tiempo y la amplitud en el rendimiento de proteína soluble con valor de relación sólido-líquido constante (1:125). (B) efecto del tiempo y la relación sólido-líquido en el rendimiento de proteína soluble con valor de amplitud constante (55 %). (C) efecto de la amplitud y la relación sólido líquido en el rendimiento de proteína soluble con valor de tiempo constante (10 min).

5.4 Validación del modelo de optimización

Los datos obtenidos a través del diseño experimental de Box-Behnken, fueron ingresados al software estadístico Minitab para obtener una optimización de la variable respuesta siguiendo los valores experimentales de las variables establecidos inicialmente. De acuerdo al programa, la respuesta óptima de proteína soluble es de 460.11 ± 3.3 $\mu\text{g/mL}$ para la extracción enzimática, siguiendo un proceso de 6 horas, con 15 % de enzima a 37 °C y pH 6.28. Mientras que para el proceso ultrasónico se obtuvo una concentración óptima teórica de 1050.94 ± 23.3 $\mu\text{g/mL}$ con una amplitud de 40 %, tiempo de 15 min y relación sólido líquido de 1:50.

Los datos obtenidos de manera experimental resultaron ser de 463.8 ± 2.1 $\mu\text{g/mL}$ para el tratamiento enzimático, mientras que para el proceso enzimático-ultrasónico se obtuvo una concentración de 1041.7 ± 6.1 $\mu\text{g/mL}$. El valor de MAPE obtenido en los modelos teóricos fue de 3.30 para la EE, con una R^2 igual a 96.97 %, en cuanto a la EEAU, se obtuvo un valor de MAPE de 23.35 y un valor de R^2 de 99.18 %.

5.5 Determinación de betaglucano

Se determinó que el 42.3 ± 1.3 % p/p de los 90 mg de la muestra control resultó ser betaglucano. En cuanto a las muestras procesadas, se determinó que de 90 mg de muestra obtenida por EE, el 34.5 ± 3.2 % p/p eran betagluconos, mientras que para el mismo peso extraído a través de EEAU, se obtuvo un contenido del 33.2 ± 2.5 % p/p.

5.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La Figura 5 muestra los espectros representativos en la región de 800-1800 cm^{-1} de cada fase del proceso de EEAU, en donde se observaron picos en diferentes puntos clave para la identificación de betagluconos. Los picos más remarcables para la identificación de betagluconos se identificaron en la región de 1029-1130 cm^{-1} , así como los picos en 1580, 1627 cm^{-1} , paralelamente también se detectaron regiones específicas que ayudan en la identificación de los carbohidratos de interés, estas fueron: 100-800, 1500-1800 y 3000-3700 cm^{-1} .

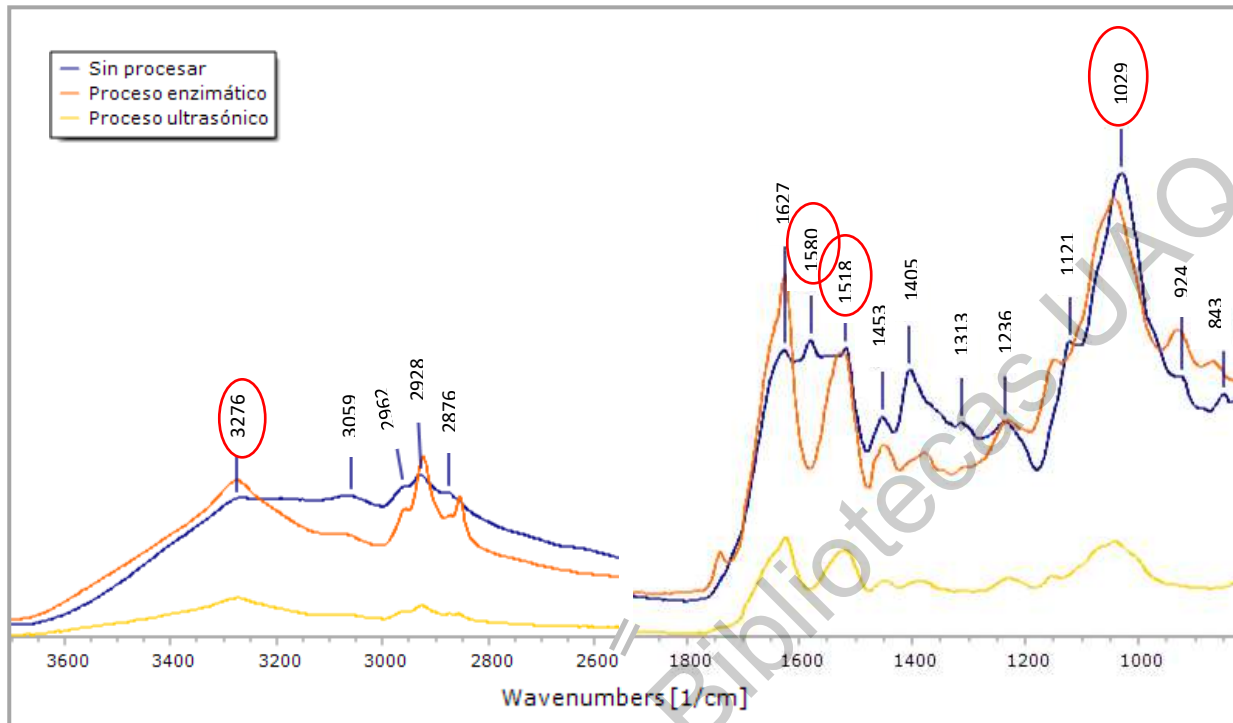


Figura 5. Espectro de FT-IR de levadura sin procesar (color azul), levadura con proceso enzimático (color naranja) y levadura con proceso ultrasónico (color amarillo). (El espectro del proceso ultrasónico se obtuvo de una muestra a la que previamente se le realizó el tratamiento enzimático).

5.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

En la Figura 6 se muestra la micrografía de células gastadas de levadura y de los diferentes procesos de extracción de betaglucanos. La Figura 6A corresponde a las células de levadura sin tratamiento alguno, en ella se observan células de forma esférica, algunas incluso en etapas de gemación. La superficie de la mayoría de ellas se encuentra sin alteraciones, conservando en esencia la forma típica de las levaduras, también puede observarse que algunas células conservan una alta turgencia. En la Figura 6B se encuentran las células después de la EE, como puede observarse, la estructura celular se deformó con respecto a las de la Figura 6A. En este paso del proceso, las células presentan una forma irregular, similar a un óvalo, algunas de ellas pueden notarse con poros o daños en la superficie. En la Figura 6C, se observan células lisadas, contraídas, completamente perforadas, algunas conservan un contorno de lo que en un momento era una forma ovoide, mientras que

otras no poseen una estructura o forma definida. Las paredes celulares que mantienen su esqueleto, presentan múltiples poros en su superficie, así como un marcado desgaste.

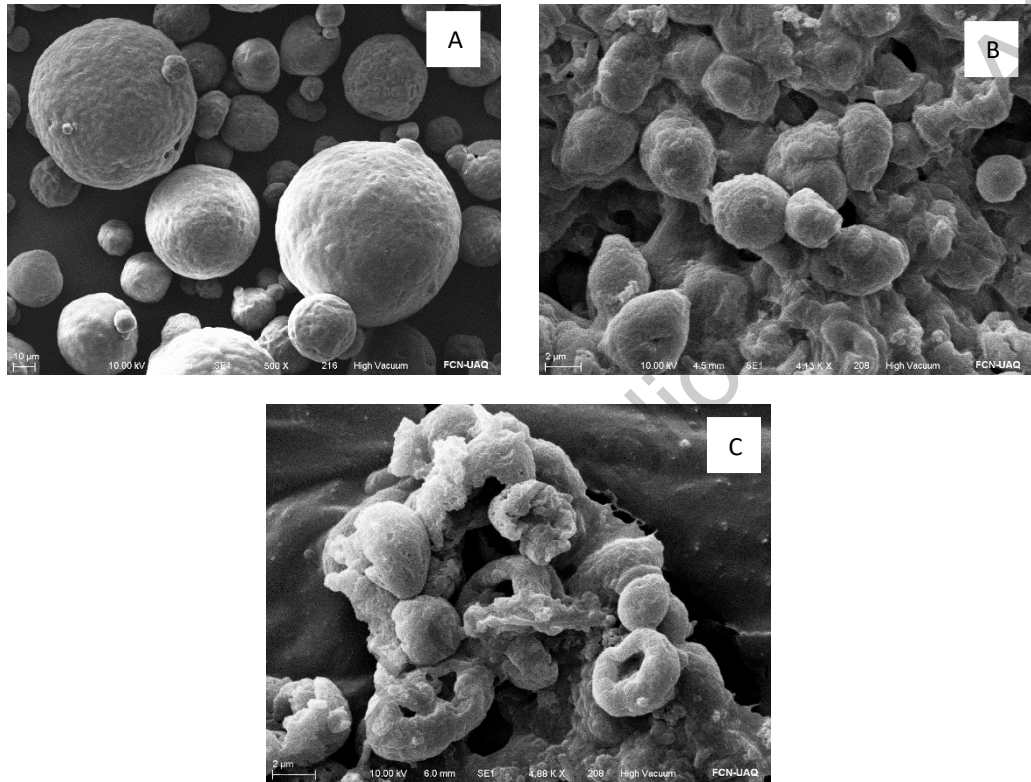


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido de células gastadas de levadura A) células sin tratamiento alguno, B) Células después de tratamiento enzimático, C) Paredes celulares después del tratamiento enzimático-ultrasónico.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Conteo y viabilidad celular

Las células vivas contienen enzimas capaces de reducir el azul de metileno a compuestos incoloros. Cuando las células están inmersas en azul de metileno, este penetra dentro de las células y las enzimas de las células vivas lo decoloran. Las células muertas, donde la enzima es inactiva, no presentan esta capacidad de reducir el colorante y, por consiguiente, permanecen teñidas de azul. Lo cual se observó en la prueba de viabilidad celular (Figura 2). El porcentaje de células no teñidas es entonces una mediada de la viabilidad (Aráoz *et al.*, 2016), que en este caso en particular es de 0 %, puesto que son levaduras “agotadas” por el proceso de fermentación para elaboración de cerveza.

6.2 Análisis estadístico y ajuste de modelos

El coeficiente de determinación R^2 para la extracción enzimática fue igual a 0.9697, lo que indica que el modelo es capaz de predecir la variabilidad de respuesta en un 96.97 %, en otras palabras, el modelo se adapta de manera exacta al comportamiento del fenómeno experimental. Para la extracción ultrasónica, en cambio, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.992, lo que sugiere que el modelo se adapta en un 99.2 % al fenómeno experimental establecido, prediciendo de manera exacta la variabilidad de respuesta. Estos valores obtenidos reafirman una buena precisión.

6.3 Análisis de superficie de respuesta en el rendimiento de lisis celular

En las gráficas de superficie de respuesta se muestran distintas tonalidades a través del mapa de superficie, indicando la cantidad de proteína soluble. El color rojo indica los puntos de las variables en los cuales se puede obtener la mayor cantidad de proteína soluble, y el color azul para las combinaciones de variables con menor rendimiento. Lo ideal sería que el punto máximo de proteína se encontrara al centro de la superficie, indicando el punto exacto donde se obtiene el mayor rendimiento.

Como puede observarse en todas las gráficas de superficie de respuesta, no se encuentra dicho punto al centro, sino que las tonalidades que más se acercan al color

rojo se encuentran en diferentes orillas de los mapas de superficie, indicando que existen rangos experimentales más amplios en los que se puede obtener la máxima cantidad de proteína que los que se habían establecido inicialmente en el modelo. Si bien, el modelo permite optimizar el proceso proporcionando la mejor combinación posible para obtener un máximo rendimiento de proteína según los niveles proporcionados, también posibilita hacer extrapolaciones que permitan explorar nuevos valores en las variables independientes, y así poder obtener un rendimiento aun mayor de lo que se había predicho de manera inicial. Lo ideal sería establecer los límites para cada caso y hacer las combinaciones más convenientes dependiendo de estas limitantes.

En la Figura 3A, se muestra un incremento de la proteína soluble respecto al incremento del tiempo y la concentración de enzima. Esto indica que, trabajando la enzima en su máxima concentración, se necesitan de tiempos prolongados para conseguir la mayor lisis posible. Lo anterior podría significar que la concentración de enzima no es suficiente para cubrir todo el sustrato presente, o bien, que el tiempo de reacción es insuficiente para que la enzima actúe en su máxima actividad.

Cuando la concentración de la enzima es significativamente menor que la concentración del sustrato, la velocidad de una reacción catalizada por enzima depende directamente de la concentración de la enzima. Por lo que la velocidad de reacción solo aumentará a medida que aumente la concentración del catalizador (Liu, 2020). No obstante, el aumento de la concentración de enzima acelerará la reacción siempre que haya sustrato disponible para unirse. Una vez que se une todo el sustrato, la reacción ya no se acelerará, ya que no habrá nada a lo que se unan las enzimas adicionales. Por otra parte, también se considera la posibilidad de que exista un exceso de sustrato al momento de realizar la reacción. Según Waldrop (2020) emplear concentraciones muy altas de sustrato puede inhibir la actividad de una enzima. Si bien las enzimas funcionarán mejor si hay mucho sustrato, puesto que a medida que aumenta la concentración del sustrato, también lo hace la tasa de actividad enzimática. Sin embargo, la tasa de actividad enzimática no aumenta para siempre (Scanlon, 2018). Esto se debe a que una solución de enzima tiene un

número fijo de sitios activos a los que se pueden unir los sustratos. A altas concentraciones de sustrato, todos estos sitios pueden estar ocupados por sustratos y saturar el catalizador, resultando en una insuficiencia de moléculas de enzima disponibles para descomponer el exceso de moléculas de sustrato (Waldrop, 2020).

Analizando este comportamiento, se podría considerar el aumento de ambas o una sola variable más allá de los límites establecidos, esto con el objetivo de aumentar el rendimiento de proteína.

Aprovechando las ventajas de la MSR, se realizaron extrapolaciones de las variables, en donde se identificó una combinación en la que se podría obtener una concentración de proteína soluble muy similar a la del óptimo teórico. Según el modelo, si se deseara disminuir el tiempo de reacción, sería necesario aumentar la concentración de la enzima al 20 % p/p, la temperatura a 42 °C y el pH mantenerlo en 6.28, con estas condiciones, se reduciría el tiempo de reacción a la mitad (3 h) y se obtendría una concentración de proteína soluble de 459.59 ± 3.3 µg/mL.

Por el contrario, si lo que se desea es reducir la concentración del complejo enzimático utilizado, el modelo muestra una posibilidad de aumentar la temperatura a 42 °C, el tiempo de reacción a 7.5 h, y mantener el pH de 6.28, dicha combinación lograría disminuir la concentración de enzima a un 10 % p/p. Sin embargo, con esta combinación solo se conseguiría un rendimiento de 430.44 ± 3.3 µg/mL de proteína soluble. Como puede observarse existen múltiples posibilidades, pero se hace hincapié en los requerimientos con los que dispone el analista para realizar el proceso. Adicionalmente, es importante hacer énfasis en las limitaciones del material biológico, por ejemplo, en el caso de la reducción del tiempo de reacción,

Es posible que al aumentaren cierto punto la concentración de la enzima, esta pueda inhibirse a ella misma, con lo cual se perdería actividad, y, por ende, rendimiento en la proteína soluble. Lo mismo sucede si se realizara un incremento del tiempo para lograr la reducción de enzimas. Donde es posible que no sea suficiente la cantidad de enzima para el sustrato empleado, o bien, pasado un largo periodo de incubación, pierda su actividad antes de terminar tiempo programado (Scanlon, 2018).

En la Figura 3B, el degradado de colores indica que la mayor concentración de proteína soluble se obtiene a partir del máximo nivel de tiempo y temperatura establecidos. Pese a ello, al estudiar el comportamiento de la variable respuesta aumentando la concentración de enzima a su máximo nivel (15 % p/p), se puede observar que la cantidad de proteína podría aumentar más allá del máximo obtenido si se incrementara cualquiera de las dos variables o ambas. Mediante el modelo, se hicieron predicciones para cualquiera de los casos, en donde se mostró que para conseguir una cantidad de proteína similar al óptimo teórico a través de un aumento únicamente en la variable tiempo, se necesitan de 7.5 horas para conseguir una concentración de proteína soluble de 458.00 ± 3.3 $\mu\text{g/mL}$. Según las predicciones del modelo, después de 7.5 horas comienza un decremento en el rendimiento de proteína, por lo que este valor tendría que ser cuidadosamente probado en diseños experimentales futuros. Ahora bien, si solo se aumentara la temperatura manteniendo constantes el resto de condiciones, se obtienen predicciones de altos contenidos de proteína respecto al aumento en la temperatura. De acuerdo a Choudhury (2020) la velocidad de una reacción catalizada por enzimas aumenta a medida que aumenta la temperatura. Sin embargo, a altas temperaturas, la velocidad tiende a disminuir debido al cambio en la estructura tridimensional de la enzima, conocido como desnaturalización. Este cambio provoca la inactivación de la enzima y pierde su funcionalidad (Liu, 2020). Por ello, es vital tomar en consideración los requerimientos del complejo enzimático, puesto que un aumento drástico en la temperatura podría provocar la desnaturalización de las enzimas, lo cual resultaría en rendimientos bajos de proteína.

Por otra parte, al extrapolar ambas variables (tiempo y temperatura) en el modelo, se obtiene un rendimiento de 496.52 ± 3.3 $\mu\text{g/mL}$ de proteína soluble, en condiciones de 10 h de reacción y temperatura de 45 °C. Si bien este rendimiento supera al valor óptimo teórico, habría que analizar estos niveles de manera experimental para comprobarlo.

Por su parte, la Figura 3C, se encuentra en el rango apropiado para la variable de pH, puesto que no existe un cambio favorable en el rendimiento de proteína soluble

hacia ninguno de los dos extremos de los niveles, esto se debe a que las enzimas tienen un pH óptimo, o un intervalo de pH, en el que su actividad es máxima; a valores superiores o inferiores de pH la actividad disminuye (Nelson, 2018). La pérdida de su actividad se atribuye a que ciertas enzimas tienen grupos ionizables en sus sitios activos y estos grupos ionizables deben estar en una forma adecuada (ácido o base) para funcionar (Amiour, 2016) Las variaciones en el pH del medio dan como resultado cambios en la forma ionizable del sitio activo y cambios en la actividad de la enzima y, por lo tanto, en la velocidad de reacción. Los cambios en el pH también pueden alterar la forma tridimensional de la enzima (Liu, 2020). En algunos casos, el sustrato puede contener grupos ionizables y el pH del medio afecta la afinidad del sustrato por la enzima Por estas razones, las enzimas solo están activas en un cierto rango de pH (Choudhury, 2020). La fuerte limitante de la variación del pH restringe, por lo tanto, a realizar una variación en el tiempo del proceso, o bien la variación de los otros factores en cuestión en caso de querer aumentar el rendimiento de proteína mediante extrapolaciones.

Como se observó en la Figura 4A, la mayor cantidad de proteína obtenida empleando una relación sólido-líquido con un valor experimental intermedio (1:125), se obtenía cuando la amplitud utilizada estaba en su máximo nivel. La amplitud representa la distancia a la que la punta del sonicador puede fluctuar longitudinalmente y, al aumentar la amplitud, también aumenta la intensidad de la cavitación dentro del líquido (Jamileh, 2020). Por lo tanto, de manera inicial, podría preverse que un aumento en la amplitud resultaría en un mayor contenido de proteína, esto, sin tener que realizar una extrapolación en el tiempo, puesto que, en esta variable, el valor óptimo ya se encuentra en el rango adecuado. A través del modelo se realizaron extrapolaciones donde se modificó la amplitud para observar el comportamiento de la variable respuesta. Al analizar los resultados, se concluyó que aún con el máximo aumento posible en la amplitud (100 %) no es posible igualar la concentración de proteína del óptimo teórico, y ya que esto conlleva un aumento en la intensidad del proceso, no se considera la opción más viable. Por lo que sería necesario tomar en consideración el factor restante, que es la relación sólido-líquido para notar un

cambio significativo en la variable respuesta.

En la Figura 4B, es posible visualizar dos posibles combinaciones en la variable X₇ (relación sólido-líquido), ya que en el mapa de superficie se muestran dos extremos con dirección hacia tonalidades rojas, indicando que existen dos diferentes óptimos dependiendo del nivel de la variable. Lo anterior ocurre porque existe una relación directa con la amplitud, la cual tiene una mejor interacción con la variable ratio al estar las dos en su valor máximo o mínimo. Por consiguiente, es importante considerar la sinergia de estas dos variables y la dependencia de la variable respuesta ante sus aumentos o disminuciones de manera proporcional.

Ahora bien, si se analiza la gráfica considerando un valor intermedio de la amplitud (55 %), se puede identificar que empleando una relación sólido-líquido de 1:200 y tiempo de 12 min, se obtiene menos proteína que si el proceso se llevara a cabo con la relación sólido-líquido mínima de 1:50 y un tiempo de 14 min. Lo anterior conduce a optar por la segunda opción, ya que se requiere un mínimo de amplitud y el incremento del tiempo a utilizar es muy bajo.

En contraste con el análisis previo, Al analizar las interpolaciones que construyen el mapa de superficie, se encontró una combinación de variables que presentaba un contenido de proteína superior al óptimo teórico. Las condiciones requeridas para lograr este contenido consistieron en una relación sólido-líquido de 1:200, amplitud de 70 % y tiempo de 10.4 min, resultando en una concentración de proteína igual a 1083.71 ± 23.3 µg/mL. Estas condiciones podrían considerarse las mejores de manera teórica, ya que, por ejemplo, para la relación sólido-líquido se considera que entre mayor sea esta, se asegura una mezcla homogénea que permite la penetración del solvente en las partes internas de las células. Además, de manera general, un mayor volumen de disolvente puede disolver los compuestos objetivo de manera más eficaz y dar como resultado un mejor rendimiento de extracción (Dhiraj, 2017).

Si bien, se libera un poco más de proteína en menos tiempo, es necesario llegar al límite superior de las otras variables, y dado que el modelo toma en consideración realizar el menor gasto de recursos posible para determinar el valor óptimo, lo más

conveniente es utilizar valores de relación sólido-líquido y amplitud pequeños y tiempos de 15 min. Debido a las pequeñas cantidades de muestra con las que se trabajó, fue difícil trabajar con valores de la relación sólido-líquido más bajos, sin embargo, al emplear muestras de mayor tamaño, podrían tenerse aproximaciones más precisas sobre un óptimo teórico a relaciones sólido-líquido más pequeñas.

Una situación similar sucede para el caso de la Figura 4C, donde existen dos posibles combinaciones para obtener el mayor rendimiento de proteína soluble. En este caso se puede encontrar un alto rendimiento cuando la amplitud y la relación sólido líquido se encuentran en conjunto en sus niveles máximos o mínimos. En esta interacción es necesario considerar el ahorro de recursos, por lo que se podría suponer que la mejor combinación es cuando ambas variables se encuentran en sus valores de operación mínimos. Esto se comprueba al revisar las interpolaciones proporcionadas por el modelo, donde, como se mencionó anteriormente, se da prioridad al ahorro de recursos físicos y energéticos, resultando en la determinación de amplitud y relación sólido-líquido bajas; 40 % y 1:50, respectivamente.

6.4 Experimentos de verificación de EEAU

Para la producción de betaglucano, se deben preparar las paredes de las células de levadura. Estos se obtienen después de que la célula de levadura se lisa o se rompe y el citoplasma de la célula fluye hacia afuera (Feng Li, 2017). La lisis o rotura de las células de levadura se logra con un procedimiento físico (sonicación, homogeneización), químico (álcali, ácido) y/o enzimático (enzimas líticas, glucanasas) (Bzducha, 2014). En un paso posterior, las paredes celulares de levadura obtenidas deben purificarse, retirando en primera instancia las manoproteínas y luego los lípidos. Con la eliminación progresiva de las proteínas se da lugar a diferentes fracciones de betaglucano purificado.

En los procesos químicos más comunes (álcali), el propósito de la extracción es hidrolizar y solubilizar las proteínas celulares, ácidos nucleicos, mananos, glucano soluble y lípidos polares. La extracción se completa con la eliminación de glucógeno, quitina y proteínas restantes con ácido (Varelas, 2016). En comparación con el

proceso químico, en la EUAE la degradación de proteínas y otros componentes celulares se obtiene mediante la implementación de enzimas específicas, seguido de separación de las partes celulares (centrifugación), y sonicación para terminar de perforar las células y solubilizar los componentes no deseados.

En este estudio se utilizó la EEAU para la extracción de betaglucano y se optimizó mediante la metodología de superficie de respuesta, utilizando un diseño de Box-Behnken. Las condiciones experimentales óptimas se determinaron ingresando los datos de los experimentos preliminares al software estadístico Minitab. Se proporcionó un diseño experimental óptimo teórico para cada tipo de extracción, con el cual, se obtendría la mayor cantidad de proteína (mayor porcentaje de lisis celular) utilizando la mejor combinación posible de los niveles experimentales establecidos. Todo esto considerando el menor gasto de recursos y reactivos posible.

En esta extracción, la especificidad y selectividad de la enzima están influenciadas por múltiples factores como la temperatura, el tiempo, el pH y la concentración de la enzima. Además, es necesario el uso de condiciones óptimas de reacción de la enzima para obtener la mayor actividad hidrolítica. En la mayoría de los casos, se utiliza una combinación de enzimas para ampliar el rango de actividades y mejorar la eficiencia de la extracción (Mena-García, 2019). Para los fines de esta investigación, se escogió el complejo enzimático Glucanex que contenía tres enzimas diferentes que ayudarían en la ruptura de la pared celular.

Los valores teóricos de las variables que dieron un rendimiento optimizado de proteína soluble; obtenidos a través del software (mencionados en la sección de resultados), fueron muy similares a los valores que presentaron un mayor contenido de proteína en los experimentos iniciales. Lo anterior puede explicarse a través de la selección de los niveles en los experimentos iniciales. Parte de la selección se basó en los niveles óptimos establecidos en los manuales del material biológico usado; por ejemplo, para la temperatura, se estableció un rango que comprendiera las temperaturas óptimas de cada enzima que componía el complejo de Glucanex, y se determinó que 37 °C era la temperatura más eficiente, esto es debido a que a esa

temperatura existe mayor actividad proteasa y celulasa, por consiguiente, existe un mayor debilitamiento de la pared celular. Lo mismo sucedió con el pH, en donde se determinó el valor intermedio del rango experimental (pH 6) como el óptimo, ya que se liberaba una mayor cantidad de proteína al medio. Al igual que en la temperatura, este pH corresponde a la mayor actividad proteasa, por lo que, al utilizarlo en combinación con la temperatura más eficiente, se obtuvo un mayor debilitamiento de la pared. Esta combinación de variables que priorizan la actividad proteasa por sobre las otras, se puede sustentar si se revisa la estructura de la célula de levadura y el proceso necesario para lisarla. La parte externa contiene principalmente manoproteínas que están densamente empacadas y limitan la permeabilidad de los solutos (Álcazar, 2016) Las células de *Saccharomyces cerevisiae* son muy resistentes y, debido tanto al grosor como la rigidez de la pared celular, la sonicación no es suficiente para romperlas. Sin embargo, la estructura de la pared celular cambia después de la eliminación de manoproteínas, que contribuyen a su resistencia mecánica y le confieren resistencia a la presión externa. Además, después de la eliminación de las manoproteínas, el β -D-glucano se hincha, alterando su compacidad, lo que también conduce a una disminución de la resistencia mecánica de la pared celular (Magnani, 2009). Además de ser rápido y económico, la sonicación también elimina la necesidad de químicos potencialmente dañinos para el medio ambiente. Según Xing *et al.*, (2018) la sonicación ayuda en la eliminación de impurezas, como las porciones amorfas de (1-6)- β -D-glucano, que quedan atrapadas entre las fibrillas del glucano en la pared celular.

En la extracción asistida por ultrasonido, se aumenta la permeabilidad de la pared celular, permitiendo una mayor penetración del solvente en la pared celular, lixiviando biomoléculas hacia la fase líquida, dando como resultado un rendimiento de extracción mejorado (Rao, 2015). De acuerdo a Mohit (2021) la extracción asistida por ultrasonido opera según el principio de cavitación acústica, que daña las paredes celulares de la unidad experimental y, por lo tanto, ayuda en la liberación de compuestos bioactivos.

Las ondas de ultrasonido pueden propagarse a través de cualquier medio como una

onda mecánica dentro de un rango de frecuencia de 20 kHz a 100 MHz. La exposición de dichas ondas de ultrasonido al medio solvente produce pequeñas burbujas llenas de vapor, ocasionando un fenómeno conocido como cavitación. Cuando estas burbujas crecen más allá de cierto tamaño, se conduce a su explosión, resultando en altas presiones y temperaturas localizadas (Arvayo-Enríquez *et al.*, 2013; Nadar, 2016). Al momento de que las burbujas colapsan cerca de la superficie de la pared celular, la alta presión y temperatura liberadas generan chorros de líquido, causando que las fuerzas de cizallamiento se dirijan hacia la superficie de la pared celular. Estos chorros de líquido, así como las fuerzas de cizallamiento involucradas en el proceso causan daño físico a la integridad de la pared o membrana celular, alterando los enlaces de hidrógeno y atracciones dipolares entre las moléculas para aumentar el grado de hidrólisis de proteínas y compuestos proteicos. Adicionalmente, esto conduce a la desnaturalización de las proteínas para liberar los grupos hidrófilos, aumentando así la solubilidad de las proteínas (Ekene, 2021).

6.5 Determinación de betaglucano

El contenido en peso de betaglucano obtenido de la EE (31.041 mg) resultó mayor en este paso que el peso obtenido de la EEAU (29.853 mg). Lo anterior pudo ocurrir debido a la degradación de una parte de los betaglucanos por efecto del procesamiento ultrasónico.

Generalmente se asume que el efecto de cizallamiento cuando la burbuja de cavitación colapsa, es el principal responsable de los cambios en la estructura de los biopolímeros, es decir, la rotura de los enlaces químicos dentro de la macromolécula (Camino, 2009; Zheng, 2019). Por tanto, se infiere que la cavitación ultrasónica resultó en la ruptura de agregados de betaglucano, destruyendo los enlaces intra e intermoleculares del carbohidrato, ocasionando que las cadenas de polímero se degradaran, disminuyendo su tamaño de partícula, por consiguiente, incrementarían su solubilidad en el medio. De acuerdo a Camino (2009), los efectos del ultrasonido sobre la degradación de polisacáridos dependen de la concentración, la temperatura de reacción, el tipo de disolvente y el tiempo de ultrasonidos. La degradación aumenta con el tiempo prolongado de ultrasonidos; siendo los polisacáridos de

mayor peso molecular los que tienden a degradarse con mayor facilidad. En este caso, la degradación del betaglucano obtenido por la EEAU fue moderada, debido a la potencia de ultrasonido y tiempo relativamente bajos aplicados en este estudio, en comparación con la despolimerización dramática de polisacáridos a altas potencias y tiempos prolongados de ultrasonido usados en otros estudios (Jing-Kun, 2016; Zheng, 2019). Por otra parte, Zheng (2019) menciona que, si bien un tiempo de ultrasonido prolongado puede reducir el tamaño de partícula, bajo un tratamiento de ultrasonido excesivo, el tamaño de partícula aumentaría y la solubilidad disminuiría, probablemente debido a la autoasociación del betaglucano a nanoescala. Tomando en consideración los puntos anteriormente señalados, es importante tener limitados el tiempo e intensidad de la degradación ultrasónica, ya que la degradación del ultrasonido puede cambiar la estructura primaria y afectar sus propiedades; como en el estudio de Magnani (2009), donde se utilizó tiempos de sonicación prolongados (>1 h) en la despolimerización del glucano y sus derivados.

El contenido de betaglucano obtenido después de la EEAU, fue de 33.17 % (p/p), Nie (2018) menciona que el contenido de betaglucano corresponde al 50 % del peso seco de la pared celular, mientras que la pared celular corresponde al 30 % del peso seco total de la levadura. Por lo tanto, después de la EEAU se obtuvo aproximadamente un 68±4.5% del betaglucano total de la levadura. En comparación con otros métodos comunes de extracción, se obtuvo un rendimiento muy similar a otros autores. Varelas (2016) obtuvo un rendimiento del 64.56 ± 1.25 % en el contenido de betaglucano empleando un tratamiento de autólisis seguida de extracción con álcali. Pengkumsri (2017) realizó una extracción ácida/básica, obteniendo un rendimiento de 72.68 ± 2.78 %. Si bien no se alcanzó un porcentaje igual o superior al de Pengkumsri, el rendimiento obtenido por medio de la EEAU es una muy buena alternativa debido a que es un proceso amigable con el ambiente.

6.6 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La Figura 5, comprende la región de 800-1800 cm^{-1} , en donde se observaron picos en diferentes puntos clave para la identificación de betagluconos. El espectro dentro de esta región se considera como el área de "huella digital" para los carbohidratos,

donde los tipos y configuraciones de polisacáridos pueden juzgarse por las bandas de absorción características (Zheng, 2019). Según Novak (2016), las bandas cercanas a la región de 853 cm^{-1} confirman la configuración α de los polisacáridos. Como se observa en la Figura 5, la ausencia de este pico en el espectro del proceso ultrasónico puede deberse a la pérdida de esta fracción como resultado de la lisis celular. Cercana a la región anterior, se encuentra un pico a 924 cm^{-1} , y otro a 1121 cm^{-1} , los cuales representan el contenido de glucano (Pengkumsri, 2017).

Unos de los picos más prominentes se encuentran a 1029 cm^{-1} , de acuerdo a lo reportado por Novak (2016), bandas cercanas a la región de 1040 cm^{-1} son típicas de β -glucanos. Sun (2019), reporta que las vibraciones cercanas a esta región son relativas al estiramiento de C-O en (1-3)- β -D-glucano, además de indicar que el monosacárido de la muestra estaba en forma de piranosa. Es posible que exista un desplazamiento ligero hacia la derecha de esta banda de la levadura sin procesar, ya que en los espectros de los dos procesos se encuentra una coincidencia de alineación cercana a 1043 cm^{-1} .

La región que comprende de $1200\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ refleja principalmente la absorción del grupo C-H y C-OH (Novak, 2016; Sun, 2019) Uno de los cambios más importantes visibles a través de FTIR, se puede observar en el espectro de la levadura sin procesar, en donde se detecta un pico a 1580 cm^{-1} . Estudios reportan que esta región comprende bandas propias del estiramiento de amida C-O, y grupos funcionales correspondientes a proteínas (Magnani 2009; Pengkumsri 2019). La ausencia de estos picos en los tratamientos enzimático y ultrasónico, indican una eliminación gradual de la proteína celular, la cual disminuyó conforme a los tratamientos.

Novak (2016) reporta que la región que comprende de $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a la región de vibraciones de carbonilo. En el caso de los tres espectros, se detectó un pico de absorción a $\sim 1626\text{ cm}^{-1}$, el cual probablemente se debió a la vibración de estiramiento C=O de los polisacáridos (Zheng, 2019), siendo el pico del espectro enzimático el de mayor proporción, se puede deber a que después de este tratamiento quedaron grupos carbonilo expuestos por efecto del debilitamiento de la

pare celular. La región comprendida en el rango de 2800-3000 cm^{-1} . Corresponde a las vibraciones del estiramiento del grupo C-H y C-H₂ (Sun, 2019. Zheng, 2019). Los picos encontrados en la región de 3000-3700 cm^{-1} se deben a la vibración de estiramiento de O-H, que es común a todos los polisacáridos (Magnani, 2009. Sun, 2019).

6.7 Microscopía electrónica de barrido

De acuerdo a lo observado en la Figura 6, se observa que el tratamiento enzimático rompe la estructura de la célula (Figura 6B), sin embargo, la lisis celular fue mayor aplicando ultrasonido (Figura 6C). Lo anteriormente descrito se debe a que el pretratamiento con ultrasonido interrumpió la estructura de agregación de glucano de levadura, lo que provocó una superficie rugosa e irregular, así como la exposición de la estructura interna (Zheng, 2019). Por lo que, para aumentar el rendimiento en la obtención de betaglucanos, es recomendable realizar el pretratamiento con ultrasonido.

7. CONCLUSIONES

Se desarrolló un procedimiento de extracción enzimática asistida por ultrasonido para la extracción y purificación parcial de betaglucanos a partir de levadura agotada de cerveza. El procedimiento desarrollado logró alcanzar un 68 ± 4.5 % de rendimiento de betaglucano, el cual fue similar a los rendimientos reportados por otros autores que implementaron extracciones químicas. Por esta razón, se considera que la EEAU es una buena alternativa a los tratamientos químicos.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

8. REFERENCIAS

Ahmad A, Kaleem M. β -Glucan as a food ingredient. *Biopol Food Design* **2018**;351-381.

Amiour S, Hambaba L. Effect of pH, temperature and some chemicals on polyphenoloxidase and peroxidase activities in harvested Deglet Nour and Ghars dates. *Postharvest Bio Techno* **2016**;111:77-82.

Bey H, Gtari W, Aschi A, Othman T. Structure and properties of native and unfolded lysing enzyme from *T. harzianum*: chemical and pH denaturation. *Int J Biol Macromol* **2016**;92:860–866.

Borchani C, Fonteyn F, Jamin G, Paquot M, Blecker C, Thonart P. Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). *Food Chem* **2014**;163:108-113.

Camino N, Pérez O, Pilosof A. Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, **2009**;23(4); 1089–1095.

Chelladurai S, Ray A, Upadhyaya M, Narasimharaj V. Optimization of process parameters using response surface methodology: A review. *Materials Today: Proceedings* **2020**.

Cheung Y-C, Siu K-C, Wu J-Y. Kinetic models for ultrasound-assisted extraction of water-soluble components and polysaccharides from medicinal fungi. *Food Bioprocess Tech* **2013**;6:2659-2665.

Choudhury R, A. K. Introduction to enzymes. *Sustainable Technologies for Fashion and Textiles* **2020**:75–90.

Dhiraj M. Patil, Krishnacharya G. Akamanchi, Ultrasound-assisted rapid extraction and kinetic modelling of influential factors: Extraction of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* plant, *Ultrasonics Sonochemistry*, **2017**:37;582-591.

Jamileh S, Dilpreet B. Holt Sonication amplitude and processing time influence the cellulose nanocrystals morphology and dispersion. *Nanocomposites* **2020**;6:41-46.

Javmen A, Grigiškis S, Gliebutė R. β -glucan extraction from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using *Actinomyces rutgersensis* 88 yeast lyzing enzymatic complex. *Biologija* **2012**;58:51-59.

Jayachandran M, Chen J, Chung S, Xu B. A critical review on the impacts of β - glucans on gut microbiota and human health. *J Nut Biochem* **2018**;101-110.

Jing-Kun Yan, Yao-Yao Wang, Hai-Le Ma, Zhen-Bin Wang. Ultrasonic effects on the degradation kinetics, preliminary characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Phellinus linteus* mycelia. *Ultrasonics Sonochemistry* **2016**:29:251-257.

Kagimura F, da Cunha M, Barbosa A, Dekker R, Malfatti C. Biological activities of derivatized d-glucans: a review. *Int J Biol Macromol* **2015**;72:588-598.

Kim K, Yun H. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Tech* **2006**;39:496-500.

Kjeldahl J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Fresenius, Zeitschrift f. anal. Chemie* **1883**:22:366-382.

Kwiatkowski S, Kwiatkowski S. The complex world of polysaccharides. Rijeka: InTech, **2012**:47-70.

Lam K, Cheung P. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioact Carbohydr Dietary Fibre* **2013**;2:45-64.

Lin H, Ni L, Chen H. Development and validation of a novel approach based on ultrasonic-assisted enzymatic extraction and RP-UHPLC for simultaneous determination of astaxanthin isomers and alpha-tocopherol in *Haematococcus pluvialis* derived supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2020**:113712.

Liu Y, Palma A, Feizi T, Chai W. Insights into glucan polysaccharide recognition using glucooligosaccharide microarrays with oxime-linked neoglycolipid probes. *Methods Enzymol* **2018**;84:139-167.

Liu S. Enzymes. *Bioprocess Engineering* **2020**:229–290.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**;193:265-275.

Magnani M, Calliari C, de Macedo F, Mori M, de Syllos Cólus I, Castro-Gomez R. Optimized methodology for extraction of (1→3)(1→6)- β -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydrate Polymers* **2009**:78(4);658-665.

Maheshwari G, Sowrirajan S, Joseph B. Extraction and isolation of β -glucan from grain sources-a review. *J Food Sci* **2017**;82:1535-1545.

McClear B, Glennie-Holmes M. Enzymic quantification of (1→3) (1→ 4)- β -d-glucan in barley and malt. *J Inst Brewing* **1985**;91:285-295.

McIntosh M, Stone B, Stanisich V. Curdlan and other bacterial (1→3)- β -d-glucans. *Appl Microbiol Biotech* **2005**;68:163-173.

Myers R, Montgomery D, Anderson-Cook C. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. Wiley, **2009**:78;81-83.

Nadar S, Rao P, Rathod V. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: a review. *Food Res Int* **2018**;108:309-330.

Nelson D, Cuchillo F, Lehninger A, Cox M. *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Barcelona, Omega **2018**:7.

Nie S, Cui S, Xie M. *Bioactive Polysaccharides*. London: Academic Press, **2018**:445-482.

Perez-Quirce S, Caballero P, Vela A, Villanueva M, Ronda F. Impact of yeast and fungi (1 → 3)(1 → 6)-β-glucan concentrates on viscoelastic behavior and bread making performance of gluten-free rice-based doughs. *Food Hydrocolloid* **2018**;79:382–390.

Pinto M, Coelho E, Nunes A, Brandão T, Coimbra M. Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: a structural characterization approach. *Carbohydr Polym* **2015**;116:215-222.

Plaza M, Turner C. Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trends Anal Chem* **2015**;71:39-54.

Rao P, Rathod V. Mapping study of an ultrasonic bath for the extraction of andrographolide from *Andrographis paniculata* using ultrasound. *Industrial Crops and Products* **2015**;66:312-318.

Ruiz-Herrera J, Ortiz-Castellanos L. Cell wall glucans of fungi a review. *Cell Surf* **2019**;5;1-14.

Ruthes A, Smiderle F, Lacomini M. D-glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydr Polym* **2015**;117:753-761.

Scanlon, M. G., Henrich, A. W., & Whitaker, J. R. Factors affecting enzyme activity in food processing. *Proteins in Food Processing*, **2018**:337–365.

Smiderle F, Alquini G, Tadra-Sfeir M, Lacomini M, Wichers H, Van Griensven L. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)-β-d-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydr Polym* **2013**;94:91-99.

Sun Y, Hou S, Song S, Zhang B, Ai C, Chen X, Liu N. Impact of acidic, water and alkaline extraction on structural features, antioxidant activities of *Laminaria japonica* polysaccharides. *Int J Biol Macromol* **2018**;112:985-995.

Tam T, Duy N, Minh N, Dao D. Optimization of beta-glucan extraction from waste brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* using autolysis, enzyme, ultrasonic and combined enzyme-ultrasonic treatment. *Am J Res Commun* **2013**;1:149-158.

Tavanandi H, Chandralekha A, Raghavarao K. Sustainable pre-treatment methods for downstream processing of harvested microalgae. *Separation and Purification Technology* **2018**:337–365.

Tavanandi, H, Raghavarao K. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of natural food colorant C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *LWT* **2019**:108802.

Waldrop, G. L.. Kinetics of Enzyme Inhibition. Reference Module in Life Sciences **2020** doi:10.1016/b978-0-12-819460-7.00027-x.

Wang Y, Maina N, Ekholm P, Lampi A, Sontag-Strohm T. Retardation of oxidation by residual phytate in purified cereal β -glucans. *Food Hydrocolloid* **2017**;66:161-167.

Watson R, Preedy V. Probiotics, prebiotics, and symbiotics: bioactive foods in health promotion. London: Academic Press, **2015**:423-430.

Xing, Y., Chen, C., Sun, W., Zhang, B., Sang, Y., Xiu, Z., & Dong, Y. An environment-friendly approach to isolate and purify glucan from spent cells of recombinant *Pichia pastoris* and the bioactivity characterization of the purified glucan. *Engineering in Life Sciences* **2018**:18(4); 227–235.

Xu L, Zhang J. Bacterial glucans: production, properties, and applications. *Appl Microbiol Biotech* **2016**;100:9023-9036.

Yildiz H, Karatas N. Microbial exopolysaccharides: resources and bioactive properties. *Process Biochem* **2018**;72:41-46.

Yuan Q, Lin S, Fu Y, Nie X, Liu W, Su Y, y col. Effects of extraction methods on the physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus*). *Int J Biol Macromol* **2019**;127:178-186.

Zhang H, Zhang N, Xiong Z, Wang G, Xia Y, Lai P, Ai L. Structural characterization and rheological properties of β -D-glucan from hull-less barley (*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hook f). *Phytochem* **2018**;155:155-163.

Zhang L, Fan G, Ammar Khan M, Yan Z, Beta T. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and identification of anthocyanin components from mulberry wine residues. *Food Chemistry* **2020**:126714.

Zheng Z, Huang Q, Ling C. Water-soluble yeast β -glucan fractions with different molecular weights: extraction and separation by acidolysis assisted-size exclusion chromatography and their association with proliferative activity. *Int J Biol Macromol* **2019**;123:269-279.

Zhu F, Du B, Xu B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloid* **2016**;52:275–288.

9. ANEXOS

Anexo 1. Experimentos para la extracción enzimática.

Experimento	Concentración de enzima (%)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	pH
1	5	1	37	6
2	5	2	37	6
3	5	3	37	6
4	5	6	37	6
5	10	1	37	5
6	10	2	37	5
7	10	3	37	5
8	10	6	37	5
9	10	1	37	6
10	10	2	37	6
11	10	3	37	6
12	10	6	37	6
13	10	1	37	7.5
14	10	2	37	7.5
15	10	3	37	7.5
16	10	6	37	7.5
17	15	1	25	6
18	15	2	25	6
19	15	3	25	6
20	15	6	25	6
21	15	1	30	6
22	15	3	30	6
23	15	6	30	6
24	15	1	37	6
25	15	2	37	6
26	15	3	37	6
27	15	6	37	6

Anexo 2. Experimentos preliminares realizados en el proceso ultrasónico.

Experimento	Tiempo (min)	Amplitud (%)	Relación sólido-líquido
1	5	40	1:50
2	5	55	1:50
3	5	70	1:50
4	5	40	1:125
5	5	55	1:200
6	5	70	1:125
7	10	40	1:200
8	10	55	1:125
9	10	70	1:50
10	10	40	1:50
11	15	55	1:200
12	15	55	1:50
13	15	70	1:125
14	15	40	1:125
15	10	55	1:125

APÉNDICE

