



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Obtención de un extracto enriquecido de β -glucanos a partir de levadura agotada de cerveza mediante microondas y ultrasonido, asistido enzimáticamente y evaluación de su actividad biológica”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

IAG. Héctor Abdiel Hernández Hernández

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigido por:

Dr. Vicente Espinosa Solís

CENTRO UNIVERSITARIO, QUERÉTARO, QRO.

DICIEMBRE DE 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Obtención de un extracto enriquecido de β -glucanos a partir de levadura agotada de cerveza mediante microondas y ultrasonido, asistido enzimáticamente y evaluación de su actividad biológica

por

Héctor Abdiel Hernández Hernández

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-309127



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Obtención de un extracto enriquecido de β -glucanos a partir de levadura agotada de cerveza mediante microondas y ultrasonido, asistido enzimáticamente y evaluación de su actividad biológica”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

IAG. Héctor Abdiel Hernández Hernández

Dirigido por

Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigido por

Dr. Vicente Espinosa Solís

Dr. Carlos Regalado González

Presidente

Dr. Vicente Espinosa Solís

Secretario

Dr. Aldo Amaro Reyes

Vocal

Dra. Rosalia Reynoso Camacho

Suplente

Dra. Rocio Campos Vega

Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Diciembre de 2023

Dedicatorias

Le dedico este trabajo a mis papás que nunca dejaron de creer en mí y que se esforzaron cada día por hacer de mí la persona que soy hoy en día.

A mis maestros a los cuales agradezco todo lo que me han enseñado.

A mis hermanos Carolina, Noelia y Salvador por darme la motivación para continuar este proceso y por la ayuda en cada paso de mi vida.

A Yuridia Bueno por ser la persona que estuvo a mi lado en todo momento, siendo mi pilar y mi compañera.

Agradecimientos

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Regalado González por la paciencia, por el tiempo, por el apoyo, por la guía, por darme todo lo necesario para poder iniciar este proceso y el poder plasmarlo en este trabajo.

Agradezco a mis padres y mis hermanos por la motivación que me dieron para poder creer en mí mismo. Ustedes ven en mí algo que yo no alcanzo a ver y es por eso por lo que sigo adelante.

Agradezco a mi compañera de vida, Yuridia Sarahí quien me acompañó en el proceso desde el principio hasta el final, velando por los dos y dando esfuerzos dobles o hasta triples para lograr lo que hoy en día somos.

A mis amigos Claudio, Karla, Mónica, Fernando, Mimi, Tere, Efraín los cuales me han enseñado valiosas lecciones de vida a través de miles de aventuras, son quienes hacen de estos procesos algo único que merece ser compartido.

A los miembros de mi comité Dr. Aldo, Dr. Vicente, Dra. Roció, Dra. Rosalía, sin sus valiosos conocimientos no se habría concretado este trabajo.

A CONAHCYT por el financiamiento para llevar a cabo este proyecto.

Resumen

La levadura agotada de cerveza (LAC) es un residuo generado por la industria cervecera, y este subproducto representa aproximadamente 650 millones de toneladas de residuos por año a nivel nacional. Se propone el uso de LAC como fuente de productos de valor agregado, como los beta-glucanos, para contribuir a la economía circular. Estas macromoléculas se utilizan en diferentes áreas debido a su variedad de actividades biológicas, como antioxidantes y antiinflamatorias, entre otras. El objetivo de esta investigación fue la extracción de los beta-glucanos fortificados de la LAC. Se evaluaron dos tratamientos, uno que implicaba una extracción enzimática asistida por microondas (MWE), mientras que el otro consistió en una extracción enzimática asistida por ultrasonido (USE). Estos experimentos fueron diseñados para obtener la mayor cantidad posible de carbohidratos solubles de la LAC. Para el tratamiento con MWE, las variables fueron la potencia (20 y 60 %), el tiempo (2 y 5 min) y HCl (0.0 y 0.1 M), seguido de una hidrólisis proteolítica a 40 ± 1 °C. Para las pruebas de USE (realizadas a 50 ± 2 °C), los factores fueron el tiempo (60 y 90 min), la amplitud de la onda (20 y 50 %), los pulsos intermitentes (10 y 30 %) y la glucanasa (10 % en peso del total de sólidos). La LAC contenía (en peso) un 32.3 ± 2 % de carbohidratos totales y un 47.0 ± 2.7 % de proteínas (Nx6.25). El rendimiento total de extracción de carbohidratos solubles del mejor tratamiento con MWE fue de 55.87 ± 1.5 %. Los sólidos resultantes del tratamiento con MWE se sometieron a una hidrólisis con Flavourzyme, que extrajo un 16.43 ± 0.5 % de carbohidratos. Los tratamientos combinados representaron el 72.3 ± 1.5 % de carbohidratos extraídos. Por otro lado, el tratamiento con USE extrajo un 37.1 ± 0.6 % de carbohidratos totales. Se realizaron pruebas de actividad antiinflamatoria en los extractos utilizando naproxeno como control, donde la inhibición de hemólisis del extracto de MWE alcanzó el 88.9 ± 0.3 %, mientras que el de USE mostró un 44.5 ± 7.0 % de inhibición. El rendimiento y la actividad antiinflamatoria del tratamiento con MWE mostraron los mejores resultados, lo que sugiere que este extracto de LAC puede ser útil como producto natural antiinflamatorio.

Palabras clave: Levadura de cerveza agotada, β -glucanos, ultrasonido, microondas, hidrólisis enzimática.

Abstract

Brewer's spent yeast (BSY) is a by-product generated by the brewing industry, and this byproduct represents approximately 650 million tons of waste annually at the national level. The use of BSY is proposed as a source of value-added products, such as beta-glucans, to contribute to the circular economy. These macromolecules are used in various fields due to they possess a variety of biological activities, including antioxidants and anti-inflammatory properties, among others. The aim of this research was the extraction of fortified beta-glucans from SBY. Two treatments were evaluated, one involving microwave-assisted enzymatic extraction (MWE), while the other consisted of ultrasound-assisted enzymatic extraction (USE). These experiments were designed to obtain the highest possible amount of soluble carbohydrates from BSY. For the MWE treatment, the factors were power (20% and 60%), time (2 and 5 minutes), and HCl (0.0 and 0.1 M), followed by proteolytic hydrolysis at 40 ± 1 °C. For the USE tests (performed at 50 ± 2 °C), the factors were time (60 and 90 minutes), wave amplitude (20% and 50%), intermittent pulses (10 and 30%), and glucanase (10% by weight of total solids). BSY contained (by weight) $32.3\pm 2\%$ total carbohydrates and $47.0\pm 2.7\%$ proteins (Nx6.25). The total extraction yield of soluble carbohydrates from the best MWE treatment was $55.87\pm 1.5\%$. The BSY solids resulting from the MWE treatment were subject to hydrolysis with Flavourzyme, which extracted $16.43\pm 0.5\%$ of carbohydrates. The combined treatments represented $72.3\pm 1.5\%$ of extracted carbohydrates. On the other hand, the USE treatment extracted $37.1\pm 0.6\%$ of total carbohydrates. Anti-inflammatory activity tests were conducted on the extracts using naproxen as a control, where the hemolysis inhibition of the MWE extract reached $88.9\pm 0.3\%$, while the USE extract showed $44.5\pm 7.0\%$ inhibition. The yield and anti-inflammatory activity of the MW treatment showed the best results, suggesting that this BSY extract can be useful as a natural anti-inflammatory product.

Keywords: Spent brewer's yeast, β -glucans, ultrasound, microwaves, enzymatic hydrolysis.

Índice

	Contenido	Página
	Índice de cuadros	VII
	Índice de figuras	VIII
1	Introducción	1
2	Antecedentes	4
2.1	Cerveza	4
2.2	Levadura	5
2.3	Estructura celular de la levadura	6
2.4	Glucanos	6
2.4.1	β 1,3-glucano	8
2.4.2	β 1,6-glucano	8
2.5	Beneficios de los glucanos	9
2.6	Extracción de β glucanos	10
2.6.1	Tratamiento con ultrasonido	11
2.6.2	Tratamiento enzimático	11
2.6.3	Tratamiento con microondas	12
2.6.4	Características destacadas de los métodos de extracción	13
3	Justificación	17
4	Objetivos	18
4.1	Objetivo general	18

4.2	Objetivos específicos	18
5	Metodología	19
5.1	Materiales	19
5.2	Métodos	19
5.2.1	Cuantificación de proteína y carbohidratos totales en levadura agotada de cerveza (LAC)	19
5.2.2	Recuperación de la LAC del subproducto agroindustrial	19
5.2.3	Evaluación del rendimiento de extracción de β -glucanos de LAC, utilizando un tratamiento por microondas	20
5.2.4	Determinación del efecto del tratamiento enzimático usando una proteasa de <i>Aspergillus oryzae</i> en la extracción del β -glucano y la extracción de proteína de LAC previamente tratada con microondas.	20
5.2.5	Evaluación del efecto del tratamiento con proteasa de <i>Aspergillus oryzae</i> asistida por ultrasonido sobre el rendimiento de la extracción de β -glucanos de la pared celular de la levadura	21
5.2.6	Evaluación de la capacidad antiinflamatoria mediante ensayos <i>in vitro</i> de los β -glucanos extraídos con los diferentes tratamientos	21
5.2.6.1	Ensayo de actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los β -glucanos	21
5.2.6.2	Ensayo de estabilidad de membrana reactiva	23
5.2.7	Análisis FTIR	23
5.2.8	Análisis SEM	23
5.3	Diseño experimental	24

5.4	Análisis estadístico	26
6	Resultados y discusión	27
6.1	Determinación del contenido de proteínas y carbohidratos en la LAC sin tratar	27
6.2	Evaluación del efecto de microondas sobre la remoción de proteína soluble de la levadura agotada de cerveza (LAC)	27
6.3	Evaluación del efecto de la enzima Flavourzyme (proteasa de <i>Aspergillus oryzae</i>) sobre la remoción de proteína y carbohidratos solubles de la levadura agotada de cerveza (LAC) tratada con microondas	30
6.4	Evaluación del efecto de la proteasa Flavourzyme (proteasa de <i>Aspergillus oryzae</i>) asistido por un tratamiento de ultrasonido sobre la extracción de proteína y carbohidratos de la pared celular de la levadura agotada de cerveza (LAC)	32
6.5	Evaluación del efecto de los extractos de los tratamientos de microondas, microondas/proteasa y ultrasonido/proteasa sobre la estabilidad de membrana de los glóbulos rojos para caracterizar la actividad antiinflamatoria de los mismos.	36
6.6	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) de los extractos de los tratamientos de microondas, microondas-proteasa, microondas-proteasa-glucanasa y ultrasonido-proteasa	41
6.7	Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) para la levadura agotada de cerveza antes y después de los tratamientos	44

6.8	Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) para la levadura agotada de cerveza antes y después de los tratamientos.	46
7	Conclusiones	50
8	Bibliografía	51
	Anexos	64

Índice de Cuadros

Cuadro		Página
1	Técnicas y características de distintos procesos de extracción de polisacáridos	14
2	Diseño factorial 2^3 con dos puntos al centro, del tratamiento enzimático asistido por microondas.	24
3	Lista de tratamientos llevados a cabo para la extracción con microondas	24
4	Diseño 2^3 del tratamiento enzimático asistido por ultrasonido.	25
5	Lista de tratamientos llevados a cabo para la extracción con ultrasonido asistido con proteasa	25

Índice de Figuras

Figura		Página
1	Etapas del procesamiento de cerveza y los principales subproductos que se generan	4
2	Composición de la pared celular de la levadura	6
3	Diferentes conformaciones de enlaces glicosídicos	7
4	Estructura de los β -glucanos (a): β -1,3-glucano; (b): β -1,6-glucano; (c): β -(1,3-1,6)-glucano; (d): β -(1,6-1,3)-glucano	7
5	Estructura química del β -1,3-glucano	8
6	Estructura química del β -1,6-glucano	9
7	Efectos de los β -glucanos en la fisiología humana. IL-8 interleucina 8; LDL, lipoproteínas de baja densidad; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad	10
8	Contenido de Proteína soluble (mg) en sobrenadante después del tratamiento con microondas	28
9	Estructura de la pared celular de la levadura	29
10	Contenido de carbohidratos solubles (mg) en sobrenadante después del tratamiento con microondas	31
11	Contenido de Proteína soluble (mg) en sobrenadante después del tratamiento con proteasa	33

12	Carbohidratos solubles (mg) en sobrenadante después del tratamiento con proteasa	34
13	Proteína soluble (mg) en sobrenadante después del tratamiento con proteasa/ultrasonido	37
14	Carbohidratos solubles (mg) en sobrenadante después del tratamiento con proteasa/ultrasonido	39
15	La formación de burbujas de cavitación mediante ciclos alternos de compresión y expansión de la onda de sonido	40
16	Mecanismo de acción de la enzima al ser asistida por tratamiento de ultrasonido	41
17	Porcentaje de estabilidad de membrana de los glóbulos rojos ante tratamiento térmico a 54°C usando los extractos de LAC como estabilizantes de la membrana, diclofenaco cómo control positivo	43
18	Análisis FTIR A) levadura agotada de cerveza; B) extracto obtenido con microondas de la LAC; C) extracto de la LAC obtenido después del tratamiento con microondas y proteasa; D) extracto de la LAC obtenido después del tratamiento con proteasa asistida por ultrasonido.	45
19	Análisis SEM de LAC anterior a los tratamientos	46
20	Análisis SEM A) LAC después de un tratamiento con microondas, 5 min, 630 W con HCl. B) Análisis SEM de LAC después del tratamiento con microondas-proteasa 5 min, 630 W, con HCl	47

21	Análisis SEM de LAC tras el paso de extracción con ultrasonido 220W, 90 min asistido por la proteasa Flavourzyme (de <i>Aspergillus oryzae</i>)	48
----	--	----

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and strokes, positioned above a horizontal line.

1. Introducción

En la actualidad, hay un creciente interés en encontrar nuevos compuestos saludables provenientes de los subproductos de la industria alimentaria. Esto motivado por la tendencia hacia la reutilización y explotación de estos subproductos, aspectos clave de la economía circular. Uno de estos subproductos es la levadura de cerveza agotada (LAC), generadas por la industria cervecera. El interés en la LAC se debe a los carbohidratos presentes en la pared celular (Caruso et al., 2022).

Uno de los carbohidratos que conforman la pared celular es el β -glucano que son monómeros de glucosa unidos por enlaces β -glucosídicos. Los cuales desempeñan números funciones en el microorganismo tales como: almacenamiento, el metabolismo energético y forman parte de la estructura celular siendo también mediadores de las interacciones célula-célula (Song et al., 2012).

Estos glucanos son producidos por diversos microorganismos, uno de ellos es *Saccharomyces cerevisiae* (Rodriguez-Philippini et al., 2020), quien los usa como parte estructural de su pared celular. Es aquí donde se sintetizan las cadenas de diversos tipos de glucanos, dentro de los que se encuentran los β -1,3-D-glucano y β -1,6-D-glucano (Kang et al., 2014).

Los β -glucanos son ampliamente estudiados debido a que pueden llevar a cabo numerosas actividades biológicas, las cuales incluyen: la mejora de la inmunidad del cuerpo humano, esto ya que pueden activar a los macrófagos y favorecer que haya una mayor proliferación celular (Min et al., 2012). Asimismo, se han reportado capacidades antioxidantes, antitumorales junto con actividades antibacterianas y antivirales, además, se encontró que los β -glucanos participán en la cicatrización de las heridas (Özcan & Ertan, 2018; Vetvicka et al., 2019).

Por otro lado, en la industria alimentaria se han usado estos polisacáridos para mejorar o modificar las propiedades funcionales de diversos productos. Dichas propiedades pueden ser la reología, la viscosidad, la textura y atributos sensoriales, de igual manera se han utilizado con éxito en la sustitución de grasas para productos cárnicos y productos alimenticios horneados (Kaur et al., 2020).

Por otro lado, respecto a la extracción de glucanos de la pared celular de la levadura se han desarrollado varios métodos como la degradación física (vía ultrasonido o microondas), degradación química (hidrólisis alcalina o ácida) vía enzimática (Ogutu & Mu, 2017; Postulkova et al., 2017; Ishimoto et al., 2018; Zheng et al., 2019).

La extracción con ultrasonido se ha usado con éxito para extraer diversos polisacáridos, entre los que se incluyen: glucomanano, goma xantana, carragenano, quitosano, dextrano, almidón y pectina. Este tratamiento tiene varias ventajas ya que es un método simple, rápido, replicable, respetuoso con el medio ambiente y consume poca energía (Czechowska-Biskup et al., 2005; Zhang et al., 2013; Li & Feke, 2015; Li et al., 2017).

Además de las ventajas ya descritas anteriormente se le puede sumar que al llevar a cabo procesos con ultrasonido en polisacáridos puede ayudar a disminuir el tamaño de las partículas, la viscosidad y su peso molecular. Con esto se logra una mejor solubilidad de las moléculas y mejora de las actividades biológicas, como lo son las capacidades inmunológicas, antioxidantes, antiinflamatorias, y antitumorales (Zhu et al., 2014; Yao et al., 2015; Du et al., 2016; Tang et al., 2016; Yan et al., 2016; Yuan et al., 2020a).

Dentro de las técnicas físicas para extraer polisacáridos se encuentra la extracción por microondas que consiste en utilizar la energía del movimiento de las ondas para calentar el medio en el que se encuentren los componentes por lo que se tiene un calentamiento más uniforme y efectivo (Li et al., 2013).

Por otro lado, se encuentra el tratamiento enzimático, que como su nombre lo indica, se utilizan de enzimas para romper y degradar los enlaces de las distintas fuentes de carbohidratos y de esta manera poder obtener los productos de interés (Karimi et al., 2019). En comparación con los procesos químicos, los beneficios que tienen las técnicas enzimáticas están: una reducción significativa de los gastos energéticos y un menor impacto ambiental, este considerado un método más suave y efectivo para la extracción de polisacáridos, debido a la especificidad que tiene

cada enzima (Zheng et al., 2019). Sin embargo, a pesar de sus ventajas, se requiere de pretratamientos adicionales al realizar la hidrólisis enzimática, debido a que podrían existir problemas de accesibilidad, cristalinidad y de tamaño de los poros que podría ocasionar una baja eficiencia en la enzimólisis. Aunado a esto si se complementa el tratamiento con alguna otra técnica de extracción se puede mejorar la digestión de los polisacáridos (Sun et al., 2016).

Para poder aprovechar las actividades biológicas de los β -glucanos que se encuentran en la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se deben realizar las técnicas que obtengan los mejores resultados en cuanto a rendimiento. Adicionalmente, se deben favorecer las metodologías que ofrezcan un tratamiento tal, que no afecte las propiedades del producto extraído. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue: extraer los β -glucanos por vía enzimática asistida por ultrasonido y por microondas, así como comparar los rendimientos de ambos tratamientos para proponer las mejores condiciones de extracción y finalmente evaluar sus capacidades antiinflamatorias, *in vitro*, con el fin de proponer una posible aplicación de dichos productos.

2. Antecedentes

2.1 Cerveza

La cerveza es de las bebidas con más consumo alrededor del mundo y por lo tanto mayor producción. Este producto consiste en cuatro ingredientes principales, los cuales son: malta de cebada, agua, lúpulo y levaduras. En el proceso de producción de dicha bebida se generan una serie de subproductos que son residuos que deben ser eliminados de manera que no causen un problema ecológico (Figura 1). De acuerdo con diversos estudios, estos subproductos podrían tener potenciales aplicaciones en distintas áreas de producción gracias a su composición rica en nutrientes (Marson et al., 2020).

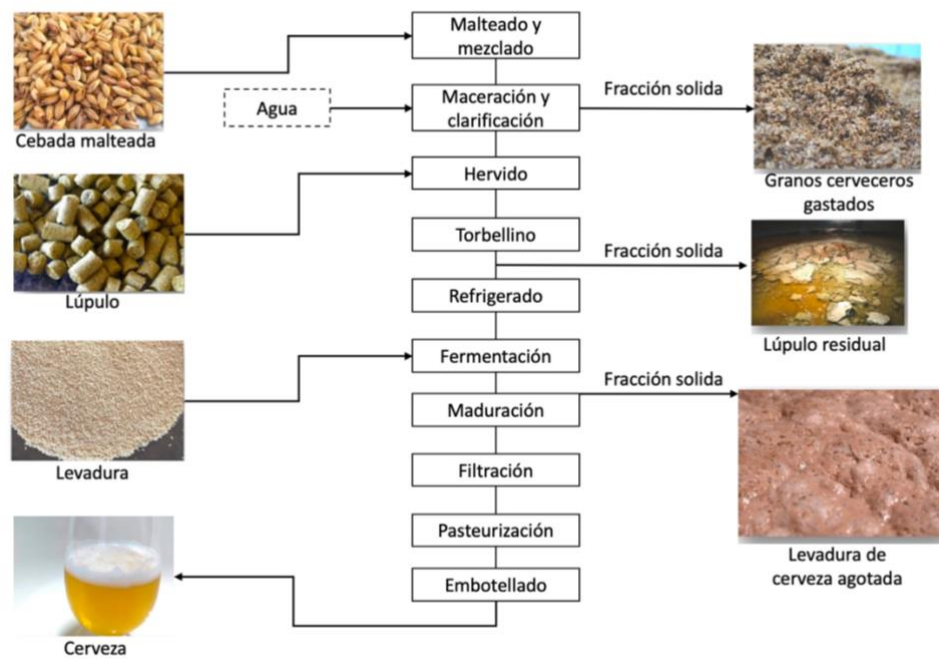


Figura 1. Etapas del procesamiento de cerveza y los principales subproductos que se generan. Adaptado de Marson 2020.

De los subproductos que se obtienen en el proceso uno de los más predominantes es la levadura agotada de cerveza (LAC), también denominada levadura gastada, levadura excedente o levadura residual, la cual representa entre el 1.5 y el 2.5% de la producción total de la cerveza. Otro punto importante que

destacar es que la levadura agotada se considera como seguro (GRAS) para el consumo humano (Puligundla et al., 2020).

La LAC tiene un alto contenido de nutrientes como lo son proteínas (45%-60%), carbohidratos (35%-15%), vitaminas (complejo B), minerales, fibras dietarias y ARN (Chae et al., 2001a; de la Hoz et al., 2014).

Para poder aprovechar este subproducto se lleva a cabo una recuperación la cual se realiza mediante un proceso de sedimentación antes de la etapa de maduración de la cerveza e inmediatamente después de que termine la fermentación (Rachwał et al., 2020).

2.2 Levadura

Para el proceso de fermentación se usan levaduras que se pueden dividir en dos clases; de fermentación superior que producen cervezas tipo *ale* utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras de fermentación inferior se usan para obtener cervezas tipo *lager* con ayuda de las cepas *Saccharomyces pastorianus* o *S. carlsbergensis* (Pinto et al., 2015).

Por su parte la levadura *S. cerevisiae* es la más asociada con la humanidad, debido a que se ha utilizado durante un largo tiempo para procesos de fermentación y producción de alcohol, elaboración de pan y también para extractos que se usan como saborizantes o con fines terapéuticos. Es por lo que se le considera la especie más estudiada y con mejor comprensión en el campo de las levaduras llegando a ser el modelo de investigación básica en la biología (Stewart, 2014).

Este microorganismo pertenece al dominio eucariótico (su material genético se encuentra depositado en un núcleo dentro de la célula). Es un miembro del filo Ascomycete, que dentro del reino de los hongos es el más grande. Por último, *S. cerevisiae* pertenece al grupo *Saccharomyces* (incluye *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. uvarum* y *S. eubayanus*) (Johnston, 2013).

2.3 Estructura celular de la levadura

La estructura de la levadura está conformada por mitocondria, núcleo, vacuola, esqueleto celular, aparato de Golgi, citosol y pared celular (Feldman, 2012). Este último, la pared celular, representa hasta el 25% (dependiendo de las condiciones de crecimiento) del peso total de la célula (Avramia & Amariei, 2021).

La función de la pared celular es proporcionar a la levadura de una integridad osmótica, y mantiene la forma frente a las tensiones ejercidas sobre esta (Wang et al., 2018a). Dicha pared celular está conformada por manoproteínas, quitina y β -glucanos (Figura 2) (Orlean, 2012).

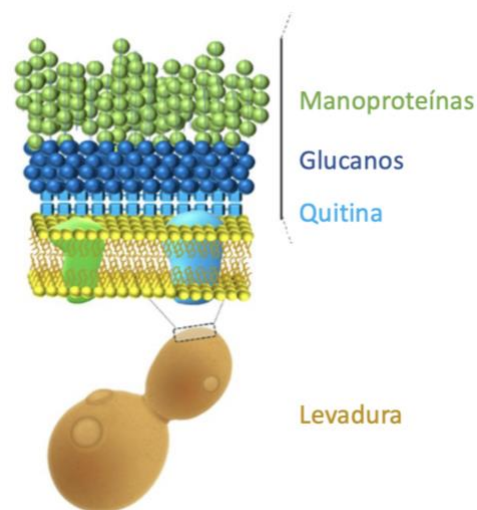


Figura 2. Composición de la pared celular de la levadura. Adaptado de Bastos et al. (2022)

2.4 Glucanos

Estos polisacáridos son los que se encuentran en mayor proporción en la pared celular. Las moléculas de glucosa que los conforman pueden estar unidos a través de enlaces alfa (α) o beta (β) (Figura 3) quienes, a su vez, se encuentran en forma lineal o ramificada. También, se les puede encontrar como espirales o en forma de una red compuesta por distintas configuraciones y estabilizadas por puentes de hidrogeno (Ruiz-Herrera & Ortiz-Castellanos, 2019).

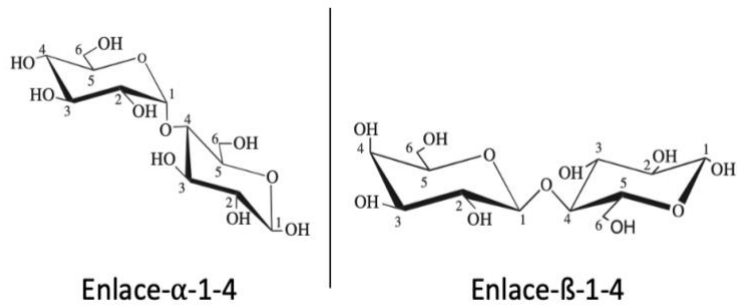


Figura 3. Diferentes conformaciones de enlaces glicosídicos. Adaptado de Nie et al. (2018).

Los glucanos que se encuentran en la pared celular de las levaduras están distribuidos principalmente en β -1,3-glucano (50-55%) y β -1,6-glucano (10-15%) (Figura 4) (Teparić et al., 2020). La localización individual y las cantidades relativas de estos componentes dependerán de factores como lo son el ciclo celular o la etapa de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo, a su vez también de las condiciones nutricionales en las que se haya desarrollado (Orlean, 2012).

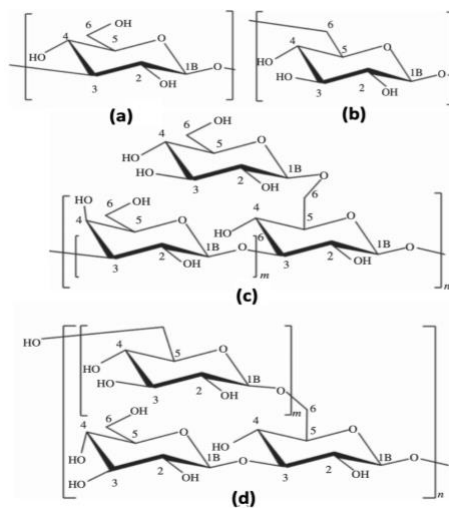


Figura 4. Estructura de los β -glucanos (a): β -1,3-glucano; (b): β -1,6-glucano; (c): β -(1,3-1,6)-glucano; (d): β -(1,6-1,3)-glucano. Adaptado de Rodrigues-Philippini et al. (2020).

Los β -glucanos son de amplio interés debido a sus múltiples aplicaciones en distintas industrias como lo son la alimentaria, cosmética y farmacéutica. Asimismo, de acuerdo con las proyecciones del mercado se espera que las ganancias por el uso de este producto asciendan a los 476.5 millones de dólares para el 2022 (Eom et al., 2021).

2.4.1 β -1,3-glucano

Como se mencionó anteriormente el β -1,3-glucano (Figura 5) es el principal componente de la pared celular y es el principal responsable de la estabilidad osmótica de la célula (Klis et al., 2006). Este polímero está compuesto por moléculas de glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -1,3, generalmente se encuentran ramificados y muestran una estructura de triple hélice. La longitud de este glucano suele ser de 4 μ m de longitud y 20 nm de diámetro (Ruiz-Herrera & Ortiz-Castellanos, 2019; Song et al., 2012).

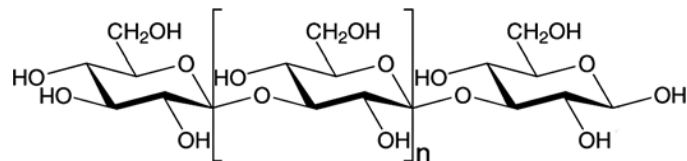


Figura 5. Estructura química del β -1,3-glucano. Adaptado de Stone (2009).

2.4.2 β -1,6-glucano

El β -1,6-glucano (Figura 7), es un segundo glucano unido a la pared celular de la levadura, comprende cerca del 12% de los polisacáridos que conforman dicha pared. Este glucano se encuentra en una forma amorfa ramificada y tiene una longitud media de 350 residuos de glucosa unidos (Nogami & Ohya, 2009).

Se ha demostrado en *S. cerevisiae* que el β -1,6-glucano puede formar enlaces cruzados con β -1,3-glucano, con quitina y con el glicopolisacárido

Glicosilfosfatidilinositol (GPI). A pesar de los estudios la β -1,6-glucano sintasa aún no se ha identificado en ninguna especie. Sin embargo, se han logrado identificar una serie de genes que tienen lugar en la síntesis de este glucano (Free, 2013).

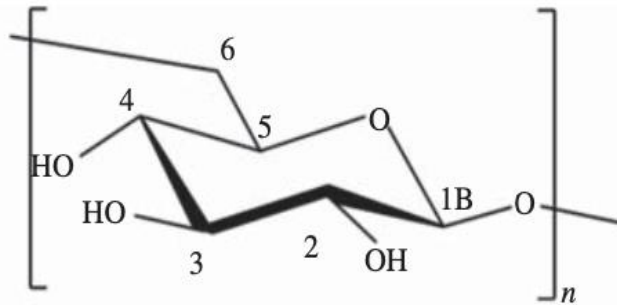


Figura 6. Estructura química del β -1,6-glucano. Adaptado de Rodrigues-Philippini et al. (2020).

2.5 Beneficios de los glucanos

Los β -glucanos tienen diversas aplicaciones en distintas industrias de piensos/alimentos, farmacéuticas y químicas y han demostrado una gran versatilidad para desarrollar nuevos productos tanto para la salud humana como animal. De igual manera, se ha extendido su uso en industrias de cosméticos y cuidados de la piel (Rodrigues-Philippini et al., 2020; Zhou et al., 2019).

En el campo de la medicina han surgido diversos estudios en los que los β -glucanos derivados de la levadura, ayudan a la defensa del huésped contra patógenos al llevar a cabo una modulación de la actividad inflamatoria y antimicrobiana de neutrófilos y macrófagos (de Marco Castro et al., 2021). Así mismo, se tienen reportes en los que los β -glucanos ayudan a inhibir el crecimiento y la metástasis de las células cancerosas, previenen infecciones bacterianas y reducen el colesterol en la sangre (Figura 8) (Yuan et al., 2020b). Por otro lado, se ha reportado también que el aislado de β -glucano de la levadura puede presentar actividades antioxidantes (Bacha et al., 2017).

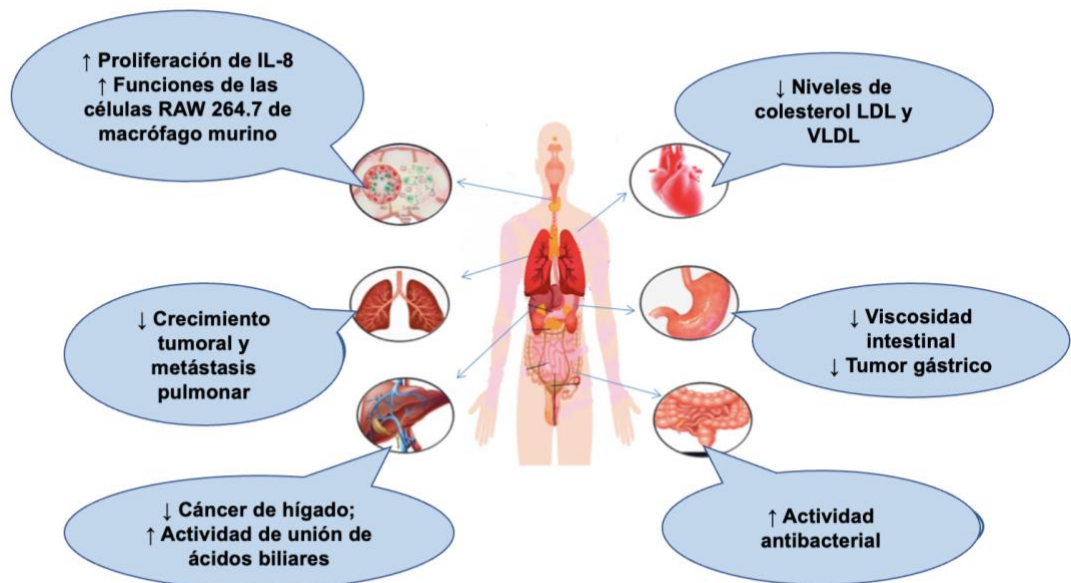


Figura 7. Efectos de los β -glucanos en la fisiología humana. IL-8 interleucina 8; LDL, lipoproteínas de baja densidad; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Adaptado de Kaur et al. (2020)

A su vez, los β -glucanos pueden funcionar como aditivo alimentario ayudando en las propiedades reológicas de los alimentos y favoreciendo su contenido de fibra (Amer et al., 2021).

2.6 Extracción de β glucanos

La extracción de polisacáridos se ha producido convencionalmente con bajos rendimientos esto debido a los procesos ineficientes de extracción y purificación. Lo cual conlleva a tener una producción de alto costo que limita el acceso a los β -glucanos. Por otro lado, la síntesis química sigue siendo difícil debido a que se requiere de reactivos específicos y una mala reacción podría producir un material con poca pureza (Bulmer et al., 2021).

Para poder obtener los β -glucanos primero se debe llevar a cabo una extracción de los componentes de la pared celular después de que se haya llevado a cabo una lisis celular (Eom et al., 2021). Tradicionalmente se ha optado por la

extracción de polisacáridos con agua caliente, sin embargo, su baja eficiencia y el calentamiento lento e impreciso ha restringido su uso (Huang et al., 2021). En años recientes se han propuestos distintos métodos para mejorar la eficiencia de la extracción, también se debe tener en cuenta que al escoger el método adecuado beneficia en la calidad, la estructura y las propiedades reológicas y funcionales del producto extraído (Ahmad et al., 2012).

2.6.1 Tratamiento con ultrasonido

Este método de extracción es comúnmente usado para la extracción de polisacáridos ya que puede acelerar la difusión y liberación de los componentes de interés (Huang et al., 2021).

La técnica consiste en aplicar ondas de sonido en un rango de frecuencias de 18 kHz a 1 GHz. Los transductores piezoeléctricos crean estas ondas ultrasónicas al transformar la energía eléctrica en movimientos mecánicos que dan como resultado cambios en una sustancia (Knorr et al., 2011). Las ondas producidas viajan a través de la mayor parte del material o sobre la superficie dependiendo de la naturaleza de la onda y del material por el cual se propaga. Para usos en la industria alimentaria se pueden aplicar dos rangos de frecuencia de alta frecuencia (100 kHz-1 MHz) o de baja frecuencia (16-100 kHz) (Cacciola et al., 2013).

Se ha reportado que la técnica de ultrasonido es eficiente para disminuir el peso molecular, disminuir células de melanoma, mejorar la solubilidad acuosa, la estructura, morfología y propiedades reológicas de los polisacáridos (Li et al., 2017; Eom et al., 2021; Hu et al., 2021).

2.6.2 Tratamiento enzimático

En los últimos años, los procesos enzimáticos se han convertido en métodos alternativos tanto para modificar las estructuras de los polisacáridos como para extraerlos y purificarlos. Las ventajas que presenta esta técnica son la alta

selectividad y especificidad del sustrato, reacciones libres de ácidos o bases fuertes (los cuales pueden ocasionar problemas de contaminación), o compuestos altamente reactivos (clorometil, metil éter, óxido de etileno o cloruro de acilo). Además, se tiene una menor probabilidad de que se produzcan subproductos no deseados. Del mismo modo, mejora las características fisicoquímicas como solubilidad, reología y actividades funcionales como lo son las antioxidantes, antimicrobianas y de adhesión celular (Karaki et al., 2016).

Se ha demostrado que la hidrólisis mediante enzimas mejora el comportamiento reológico, la solubilidad y las propiedades biológicas de los polisacáridos: quitosano, celulosa, pectina y almidón. Por otra parte, desde el punto de vista de reducción de energía e impacto ambiental, a esta técnica se le considera más suave y eficaz (Sun et al., 2016).

El tratamiento enzimático más conocido fue desarrollado por McCleary y Codd (1991) y toma como base la degradación de los polisacáridos por una enzima llamada β -glucano hidrolasa (Motilva et al., 2014).

Hoy en día se utilizan diferentes enzimas para la extraer los polisacaridos, incluidas: α -amilasa, amilogucosidasa, pululanasa, xilanasas, celulasa, proteasa y esterasa, pepsina y pancreatina, proteasa microbiana, proteasa porcina, tripsina, α -quimotripsina y lipasa (Karimi et al., 2019).

2.6.3 Tratamiento con microondas

El tratamiento con microondas es un método innovador y de los más eficientes para obtener el compuesto bioactivo. Con esta técnica se puede ahorrar el consumo de disolventes y energía, de igual manera, mejora las funcionalidades de los productos alimenticios y ayuda a reducir tiempos al acelerar los procesos de extracción. Además, haciendo uso de esta tecnología se puede obtener una amplia tasa de rendimiento en distintos polisacáridos en comparación con otras extracciones (Mirzadeh et al., 2020, 2021).

La técnica consiste en aplicar ondas electromagnéticas cuya frecuencia se encuentra entre 300 MHz y 300 GHz. El calentamiento en los materiales causado por esta técnica se basa en la capacidad de la materia de absorber la energía de las microondas y convertirlas en calor (Chandrasekaran et al., 2013). Para llevar a cabo esta técnica se debe hacer en condiciones acuosas en donde el agua actúa como disolvente y es la principal fuente de calentamiento. Cuando la pared celular se rompe el disolvente causa el movimiento de los polisacáridos. A su vez, los campos eléctricos que se crean rompen los puentes de hidrógeno afectando la solubilidad de los polisacáridos y aumenta la tasa de extracción (Chen et al., 2022).

Para finalizar, se ha reportado que utilizar fuentes de irradiación (microondas) puede mejorar la hidrólisis enzimática (Taherzadeh & Karimi, 2008). También existen estudios en los que se ha demostrado que como pre-tratamiento favorece la hidrólisis de paramilo (polisacárido de almacenamiento del protista *Euglena gracilis*) lo cual favorece la extracción de unidades de β -1,3-glucano (Gissibl et al., 2018).

2.6.4 Características destacadas de los métodos de extracción

En la Cuadro 1 se presentan las técnicas de extracción de polisacáridos de distintas fuentes, así como las características que obtiene al usar dicha técnica de extracción. Como se puede observar la extracción con ultrasonido presenta un porcentaje de rendimiento alto en comparación de las otras técnicas (Benito-Román et al., 2013; Eom et al., 2021; Hu et al., 2021). Por otra parte, la extracción por vía enzimática proporciona una serie de características fisicoquímicas al producto aunado a tener alto grado de rendimiento de β -glucanos al ser extraídos por esta técnica (Ahmad et al., 2012; Karimi et al., 2019; Marson et al., 2020). Sin embargo, existen estudios en los que los rendimientos de extracción por vía enzimática son bajos es por ello por lo que se quiere estudiar el efecto de combinar ambos tratamientos para mejorar tanto el rendimiento como las propiedades de los β -glucanos. Esto mismo se realiza para la extracción por vía enzimática con asistencia de microondas ya que esta última técnica presenta ventajas en cuanto a mejora de

las propiedades reológicas, sin embargo, presenta un bajo rendimiento en comparación los demás procesos (Xu et al., 2018).

Cuadro 1. Técnicas y características de distintos procesos de extracción de polisacáridos

Proceso de extracción	Fuente	Características destacadas del proceso de extracción	Referencia
Extracción enzimática	Levadura de cerveza <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aumento de la pureza y rendimiento de β -glucanos	Ahmad et al., 2012
Extracción alcalina	Levadura <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Extracción de α y β glucanos	Ahmad et al., 2012
Extracción alcalina con 1.0 N de NaOH	Levadura de cerveza agotada	β -glucano con actividad de fenoloxidasa	Ahmad et al., 2012
Extracción alcalina y alta presión	Levadura de cerveza agotada	78.1% de rendimiento de extracción de β -glucano	Tian et al., 2019
Ultrasonido	<i>Lignosus rhinocerotis</i>	Mejora de solubilidad acuosa y propiedades fisicoquímicas de β -glucanos	Hu et al., 2021
Extracción enzimática y ultrasonido	Levadura de cerveza <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Reducción del tamaño de partícula, aumento del 32.0% de rendimiento de extracción de β -glucanos	Zheng et al., 2019
Extracción enzimática y alcalina	Levadura de cerveza <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aumento del rendimiento de extracción en un 36.2% de β -glucano	Zheng et al., 2019

Extracción ácido-base modificada	Levadura de cerveza <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Actividad antimicrobiana, efecto inmunomodulador, efecto anticancerígeno de β -glucanos	Amer et al., 2021
Extracción con ultrasonido	Grano de cebada	66.1% de rendimiento de extracción de β -glucanos	Benito-Román et al., 2013
Extracción con ultrasonido	Levadura de cerveza <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Efecto de inhibición de células de melanoma, 73.6% de rendimiento de extracción de β -glucanos	Eom et al., 2021
Extracción enzimática	Grano de cebada	Mejora de las propiedades reológicas, 89.0% de rendimiento de extracción de β -glucanos	Karimi et al., 2019
Extracción con metanol y acetona	<i>Boletus edulis, Cantharellus cibarius, Craterellus cornucopioides, Hydnum repandum y Agaricus bisporus</i>	Rendimiento de extracción de 14.5% de β -glucanos	Özcan & Ertan, 2018
Extracción con degradación ácida	<i>Laminaria digitata</i>	β -glucano soluble de bajo peso molecular con actividad inmunológica	Ishimoto et al., 2018
Extracción enzimática	Levadura de cerveza <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10-40% de extracción de β -glucano	Marson et al., 2020
Extracción enzimática	Levadura para hornear <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18-28% de extracción de β -glucano	Marson et al., 2020
Extracción enzimática	Levadura de cerveza agotada	8.0% de extracción de β -glucano	Marson et al., 2020
Tratamiento térmico e hidrólisis enzimática	Levadura de cerveza agotada	20.0% de extracción de β -glucano	Marson et al., 2020

Hidrolisis enzimática	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	12.0% de extracción de β - glucano	Marson et al., 2020
Extracción con microondas	<i>Eucommia ulmoides</i>	12.3% de rendimiento de extracción de polisacáridos	Xu et al., 2018

3. Justificación

La industria cervecera al ser una de las más grandes y extendidas a nivel global es de las que más desechos genera durante la producción de cerveza. De la producción total de cerveza aproximadamente 207 g por cada litro producido son de desechos sólidos (Marson et al., 2020). En México en el año 2019 se produjeron 12450 millones de litros de cerveza (INEGI, 2019) por lo que se puede calcular que se generó un aproximado de 2500 millones de kg de desechos. A nivel mundial en 2020, el volumen de cerveza producida se situó en torno a los 1800 millones de hectolitros (Statista, 2021), por lo tanto, la cantidad de residuos sólidos fue aproximadamente de 37260 millones de kg. Estos desechos pueden ser aprovechados como materia prima para la recuperación de compuestos con propiedades funcionales. La levadura de cerveza agotada es un subproducto y de este se pueden obtener compuestos como los β -glucanos los cuales pueden ser aprovechados para diversas aplicaciones en áreas como nutrición, farmacia, cosmética. El mercado de los β -glucanos se estima en 403.8 millones de dólares en el año 2020; y se espera un crecimiento del 7.6% hasta alcanzar los 628.3 millones de dólares para el 2026. Esto relacionado a la búsqueda de alternativas más saludables y con mayores beneficios a la salud lo que impulsa la demanda del mercado (Market and Markets, 2021).

Los tratamientos enzimáticos, ultrasonido y microondas se usan comúnmente para extraer polisacáridos de manera individual debido a que poseen ventajas de especificidad y de ahorro de energía, además de ser ecológicamente más amigables y favorecen las propiedades funcionales de los polisacáridos que se extraigan, sin embargo, el uso combinado de estos tratamientos puede favorecer los rendimientos de extracción, así como las propiedades de los compuestos extraídos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Extraer β -glucanos de la pared celular de levadura agotada de cerveza (LAC) *Saccharomyces cerevisiae* mediante tratamiento por microondas, microondas-proteólisis y proteólisis asistida por ultrasonido, así como caracterizar las propiedades antiinflamatorias de los extractos.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Evaluar el rendimiento de extracción de β -glucanos de la LAC, utilizando un tratamiento por microondas.

4.2.2 Determinar el efecto del tratamiento enzimático usando una proteasa de *Aspergillus oryzae* en la extracción del β -glucano y la remoción de proteína de LAC.

4.2.3 Evaluar un tratamiento combinado con proteasa de *Aspergillus oryzae* asistida por ultrasonido, sobre el rendimiento de la extracción de β -glucanos de la LAC.

4.2.4 Evaluar la capacidad antiinflamatoria mediante ensayos *in vitro* de los β -glucanos extraídos con los diferentes tratamientos.

5. Metodología

5.1 Materiales

Levadura agotada de cerveza (LAC) Plasset, REX-1115 donada por RICAP (Celaya, Guanajuato, México); proteasa de lisis de *Aspergillus oryzae* (Novozymes, Bagsværd, Dinamarca); β -glucanasa de *Aspergillus niger* (Merck, Darmstadt, Alemania); anticoagulante (tubo vacutainer BD Plus de 2.7 mL con tapón color azul) (Medical center, Querétaro, México). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico y obtenidos de Merck.

5.2 Métodos

5.2.1 Cuantificación de proteína y carbohidratos totales en levadura agotada de cerveza (LAC)

La cuantificación de la proteína presente en la LAC se llevó a cabo mediante la determinación de nitrógeno total por el método de Kjdaahl descrito por Chang, (2010). Y la proteína soluble en LAC se midió con la técnica de Bradford (1976). La cuantificación de carbohidratos en la LAC se llevó a cabo utilizando la técnica de carbohidratos totales por fenol-sulfúrico descrita por Dubois et al. (1956).

5.2.2 Recuperación de la LAC del subproducto agroindustrial

Se pesaron 500 mg de levadura y se lavó con agua destilada (10% p/v), manteniéndose en agitación por 5 min, seguido de una centrifugación a 2100 x g en una centrífuga Eppendorf, Mod. 5810R (Hamburgo, Alemania) a 25 °C por 15 min; al finalizar se desechó el sobrenadante. Este proceso se realizó tres veces, y la LAC se recuperó en el precipitado. Esta muestra de LAC fue sometida a los diferentes tratamientos.

A la muestra de LAC sin tratar se le cuantificó el contenido de proteína y carbohidratos con las técnicas citadas en las secciones 5.2.1 (Kjdaahl) y 5.2.2, respectivamente.

5.2.3 Evaluación del rendimiento de extracción de β -glucanos de LAC, utilizando un tratamiento por microondas.

La muestra de LAC se sometió a un tratamiento con microondas en un horno Panasonic Mod. NN-SD982S (Osaka, Japón) 1050W de potencia. Las variables fueron el tiempo de exposición (2 y 5 min, con punto al centro de 3.5 min), HCl 0.1 M (0 y 100% p/v, con punto al centro de 50%), así como la potencia del equipo (20 y 60% de la potencia máxima de 1050 W con punto central al 40%).

Terminando el tratamiento con microondas, la LAC se centrifugó a 2100 x g por 15 min a 25 °C. Se cuantificó en el sobrenadante la proteína soluble (sección 5.2.1, Bradford), y los carbohidratos totales solubles (5.2.2).

5.2.4 Determinación del efecto del tratamiento enzimático usando una proteasa de *Aspergillus oryzae* en la extracción del β -glucano y la extracción de proteína de LAC previamente tratada con microondas

La pasta de levadura obtenida después del tratamiento con microondas se disolvió en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7. Posteriormente, se agregó 10% p/p de la proteasa para llevar a cabo la proteólisis de la proteína de la pared celular para hidrolizar al complejo proteína-glucano. La suspensión fue incubada por 6 h en agitador orbital Thermo-Fisher (Modelo 4353, Waltham, MA, EUA) a 300 rpm a una temperatura de 50 °C. Al finalizar se detuvo la actividad de la enzima mediante ebullición por 5 min.

Al terminar el tratamiento enzimático se centrifugó la muestra a 2100 x g por 15 min a 25 °C. Finalmente, se cuantificó en el sobrenadante la proteína soluble (sección 5.2.1, Bradford), y los carbohidratos totales solubles (sección 5.2.2).

5.2.5 Evaluación del efecto del tratamiento con proteasa de *Aspergillus oryzae* asistida por ultrasonido sobre el rendimiento de la extracción de β -glucanos de la pared celular de la levadura.

A la LAC se le adicionó la enzima proteasa al 10% p/v suspendida en solución amortiguadora de fosfatos a pH .5, y se llevó a sonicación controlando la temperatura en un rango de 40-50°C, usando un procesador ultrasónico Vibracell (Sonics, modelo vcx500, Newtown, CT, EUA). Este procesador puede alcanzar una potencia de hasta 500 W. Las variables de este proceso fueron: amplitud (40 y 60%, con punto al centro en 50%), tiempo (60 y 120 min, con punto al centro en 90 min) aplicando pulsos intermitentes (10% y 30% con punto central en 20%).

Finalmente se centrifugó la muestra tratada a 2100 x g por 15 min a 25°C y se evaluó la proteína soluble (sección 5.2.1, Bradford), y carbohidratos totales solubles en sobrenadante (sección 5.2.2).

5.2.6 Evaluación de la capacidad antiinflamatoria mediante ensayos *in vitro* de los β -glucanos extraídos con los diferentes tratamientos

5.2.6.1 Preparación de glóbulos rojos

Se tomó una muestra sanguínea procedente de 10 personas sanas (se consideró este número de participantes para tener una muestra representativa y aleatoria. Aunado a esto con este número de participantes se generó la cantidad suficiente de sangre [mL] para la realización correcta de los estudios así como para las réplicas necesarias), la edad necesaria para la toma de muestra sanguínea fue entre 20 y 30 años [con consentimiento firmado (Anexo 1)]. El reclutamiento de estos sujetos se realizó mediante un aviso (Anexo 2) que fue distribuido en redes sociales e instalaciones de la Universidad Autónoma de Querétaro y fue completamente voluntario. Dentro de los criterios de inclusión se consideró a sujetos que no habían consumido ningún medicamento antiinflamatorio durante las dos semanas anteriores al estudio. La muestra fue colocada en un tubo vacutainer con anticoagulante (BD Plus con tapón color azul).

La toma de muestra sanguínea tiene una duración aproximada de 5 a 10 min la cual fue realizada por personal capacitado de la unidad de análisis clínicos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

El manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos se hizo con base en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, en donde indica que los objetos punzocortantes como agujas hipodérmicas se deben envasar en recipientes rígidos de polipropileno color rojo y los residuos no anatómicos. Los tubos contenedores de sangre y torundas con sangre se envasaron en bolsas de polietileno color rojo ambos tipos de envases fueron marcados con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda de Residuos Peligrosos Biológico infecciosos (RPBI). Para el almacenamiento temporal se designó un área especial a temperatura menor a 4°C dentro del laboratorio, los envases permanecieron cerrados y no se abrieron o vaciarán durante este tiempo. El almacenamiento no fue mayor a los 30 días. Para la recolección y eliminación de los residuos se realizó con un prestador de servicios externo (Wess corporate, QUE, MX).

Las valoraciones médicas fueron tomadas por personal médico de “Su salud” UAQ y de ser necesario se realizaron por médicos particulares.

La toma de muestra es un procedimiento rutinario que no representa riesgo para la salud, sin embargo, pueden presentarse molestias tales como: mareos, moretones, desmayos, disminución de presión arterial, por lo cual si se requiere atención medica esta pudo ser proporcionada por personal del módulo de atención médica “Su salud” de la UAQ.

La sangre recolectada fue centrifugada a 1,100 x g por 5 min a temperatura de 37 °C y se decantó el sobrenadante. El paquete de glóbulos rojos humanos (por sus siglas en inglés HRBC) se re-suspendió en una solución salina isotónica (cloruro de sodio 0.9% p/v) y se centrifugó nuevamente (este proceso fue repetido hasta obtener un sobrenadante claro). A continuación, se preparó una suspensión del 10% de HRBC con una solución salina isotónica (cloruro de sodio 0.9% p/v).

5.2.6.2 Ensayo de estabilidad de membrana reactiva

La mezcla del ensayo consistió de una solución hiposalina (0.25% p/v de NaCl, 2 mL), tampón de fosfato de sodio pH 7.4 (1 mL), 1 mL de extracto, 0.5 mL de suspensión de eritrocitos (2% v/v) e isosalina [0.85% (p/v) NaCl] para tener un volumen total de 4.5 mL. De igual manera, se preparó un control de sangre (4.5 mL) con 1.0 mL de solución salina isotónica en lugar de extracto y para el control positivo se mezclaron 4.5 mL de diclofenaco (200 µg/mL) con 0.5 mL de solución isotónica en lugar de glóbulos rojos. Las muestras se incubaron a 56 °C durante 30 min. Finalmente, se enfriaron las muestras y se llevó a centrifugación a 1,000 x g rpm durante 20 min. El sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro a 560 nm en conjunto con el blanco (Yesmin et al., 2020).

Los cálculos para el porcentaje de estabilidad de la membrana se estimaron a partir de Ecuación 1.

$$\% \text{ estabilidad de membrana} = 100 - \frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs del control} \times 100}{\text{Abs sangre control}} \quad (1)$$

El material de desecho biológico fue consignado al RPBI correspondiente.

5.2.7 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) de los extractos de los tratamientos de microondas, microondas-proteasa, microondas-proteasa-glucanasa y ultrasonido-proteasa.

Se llevó a cabo una espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier para conocer los enlaces que se encontraban presentes en los extractos. Este análisis fue realizado por el laboratorio de análisis químicos analíticos de la Facultad de Química de la UAQ.

5.2.8 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) para la levadura agotada de cerveza antes y después de los tratamientos.

Se llevó a cabo un análisis SEM tanto de la levadura agotada de cerveza como los tratamientos con mejor rendimiento de extracción. Este análisis fue llevado a cabo por parte del equipo de la Facultad de Ciencias biológicas de la UAQ.

5.3 Diseño experimental

Para el tratamiento enzimático asistido por microondas se usó un diseño factorial 2^3 con dos puntos al centro, siendo la variable de respuesta la proteína y carbohidratos solubles, así como el contenido total de glucanos.

Cuadro 2. Diseño del tratamiento enzimático asistido por microondas.

Factores	Códigos de niveles		
	-1	0	1
Tiempo de exposición (min)	2	3.5	5
Ácido clorhídrico (M)	0	0.5	1
Potencia del equipo (%)	20	40	60

Para el tratamiento enzimático asistido por ultrasonido se usó el diseño 2^3 (Cuadro 2 y Cuadro 3). La variable de respuesta fue la proteína y carbohidratos solubles, así como el contenido total de glucanos al finalizar los tratamientos.

Cuadro 3. Tratamientos para la extracción utilizando un tratamiento enzimático asistido con microondas

No. Tratamiento	HCl (M)	Tiempo (min)	Potencia (%)
1	0	2	20
2	0.1	2	20
3	0	5	20

4	0.1	5	20
5	0	2	60
6	0.1	2	60
7	0	5	60
8	0.1	5	60
9	0.05	3.5	40
10	0.05	3.5	40

Cuadro 4. Diseño 2³ del tratamiento enzimático asistido por ultrasonido

Factores	Códigos de niveles		
	-1	0	1
Tiempo de sonicación (min)	60	90	120
Pulsos intermitentes (%)	10	20	30
Amplitud (%)	40	50	60

Cuadro 5. Tratamientos para la extracción utilizando un tratamiento enzimático asistido por ultrasonido

No. Tratamiento	Tiempo (min)	Amplitud (%)	Pulsos intermitentes (%)
1	60	40	10
2	60	40	30
3	60	60	10

4	60	60	30
5	120	40	10
6	120	40	30
7	120	60	10
8	120	60	30
9	90	30	20

5.4 Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se reportan la media \pm desviación estándar. Para el análisis estadístico se usó el Software Minitab (State College, PA, EUA) y Graph pad Prism (San Diego, CA, EUA). Para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey con $\alpha \leq 0.05$.

6 Resultados y discusión

6.1 Determinación del contenido de proteínas y carbohidratos en la LAC sin tratar

Previo a los tratamientos se realizaron lavados del subproducto agroindustrial, el cual incluía la LAC. Esto se llevó a cabo con la finalidad de eliminar impurezas (materia soluble en agua). La LAC por su propia naturaleza es insoluble en agua y ésta fue recuperada en el precipitado. Dicha fracción se utilizó para someter la LAC a los diferentes tratamientos.

De los 500 mg del subproducto agroindustrial, con los que se inicia el proceso de lavado, se perdió el $55.0 \pm 0.3\%$ del peso, debido al triple lavado, recuperando solo 225.0 mg de LAC. Esto se evaluó midiendo la pérdida de peso que se obtenía tras cada proceso de lavado.

Para conocer la cantidad de proteína presente en la levadura, ésta se evaluó mediante la metodología propuesta por Kjeldahl ($N \times 6.25$) (Chang, 2010). Los resultados indicaron que de 225 mg de LAC el $47 \pm 2.7\%$ del peso total corresponde a proteína. Este resultado es comparable a lo reportado por Jaeger et al., (2020), cuyo porcentaje de proteína de la LAC se encontró entre 45 y 60% del peso total de la misma dependiendo de las condiciones de crecimiento de la levadura.

Por lo tanto, de los 225 mg que se sometieron a los tratamientos, aproximadamente 105.7 ± 6.0 mg corresponden a proteína. Este peso sería el máximo rendimiento teórico que se podría extraer, representando el 100% de remoción de proteína.

6.2 Evaluación del efecto de microondas sobre la remoción de proteína soluble de la levadura agotada de cerveza (LAC)

La levadura agotada de cerveza se sometió a un tratamiento con microondas en donde se evaluó la proteína soluble en sobrenadante por el método de Bradford (1976). Los factores que se evaluaron fueron: el tiempo de exposición a microondas

(min), la potencia del equipo (W) y presencia o ausencia de ácido clorhídrico mediante un diseño experimental 2^3 con dos puntos centrales (Cuadro 2).

Los resultados obtenidos muestran que se logra una ruptura parcial de la LAC liberando macromoléculas al medio y esta liberación es dependiente de la potencia, tiempo y HCl al que se someta la LAC (Figura 8). Influyendo así directamente sobre la concentración de proteína soluble de la LAC. Con respecto a los tratamientos (ver Cuadro 3) se puede observar que el de más alto rendimiento fue el tratamiento 8 ($23.3 \pm 1.3\%$) que es 22 veces mayor que el tratamiento 1 ($1.0 \pm 0.8 \%$) este último generó el menor rendimiento de remoción de proteína obtuvo. La diferencia entre estos dos rendimientos radica en la concentración de HCl.

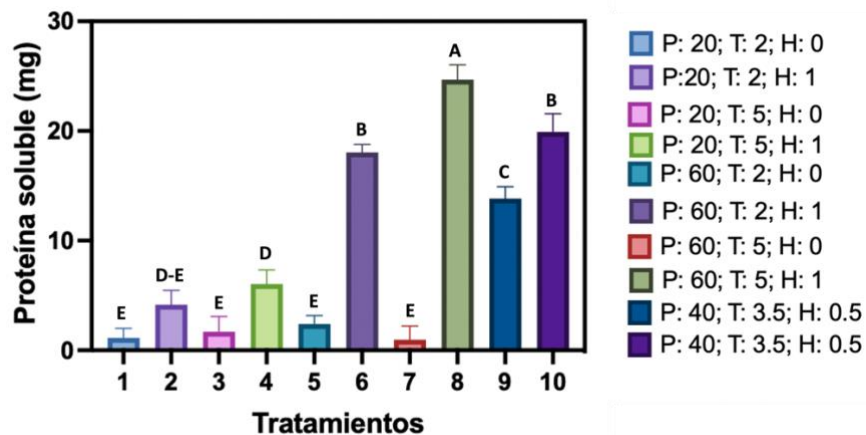


Figura 8. Contenido de proteína soluble (mg) en el sobrenadante después del tratamiento con microondas. (P: potencia (%); T: tiempo (min); H (concentración de ácido clorhídrico 0, 0.5, 1 M). Las barras con diferentes letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Como se mencionó anteriormente con el tratamiento número 8 (Cuadro 3) se extrajo un total de 24.7 ± 1.4 mg, lo cual representa el $23.3 \pm 1.3\%$ de la remoción total de proteína de la pared celular de la levadura.

Esta remoción parcial de la proteína se puede explicar ya que la pared celular se encuentra dividida en secciones y cada una de estas secciones contienen distintas macromoléculas (Figura 9). Una de estas secciones está constituida por la

proteína que se pretende remover, sin embargo, las mismas proteínas se encuentran unidas a través de distintos enlaces (puentes de hidrogeno y enlaces covalentes) a otras macromoléculas, formando así la estructura de la pared celular lo que dificulta la remoción total de la proteína (Orlean, 2012; Grbavac et al., 2017).

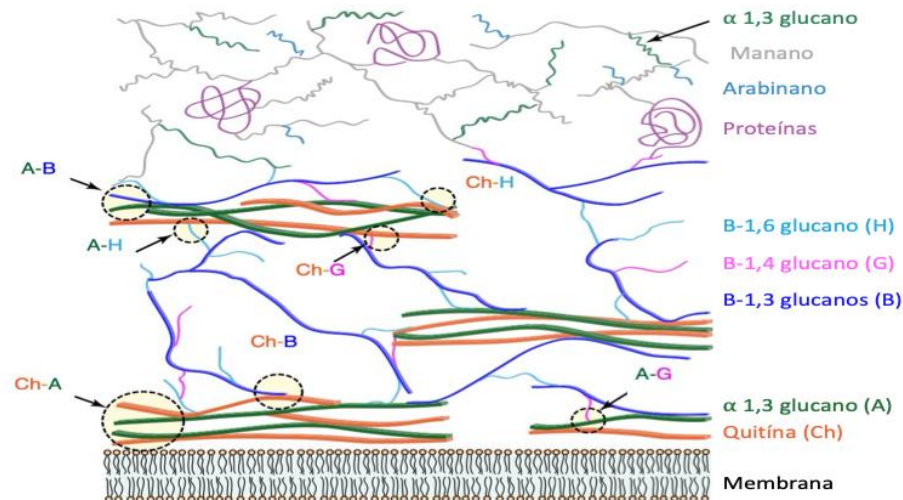


Figura 9. Estructura de la pared celular de la levadura. Adaptado de Kang et al. (2018)

Con la remoción del $23.3 \pm 1.3\%$ de la proteína mediante el calentamiento con microondas/HCl se logra una menor recuperación en comparación con lo obtenido por Li & Karboune (2018). Estos autores, usaron una extracción por calentamiento tradicional alcanzaron una tasa de rendimiento del $38.99 \pm 0.90\%$. Sin embargo, para lograr este rendimiento se sometió a tratamientos de $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h, lo cual representa un mayor gasto energético en comparación con el presente estudio en el cual se usaron microondas por un máximo de 5 min.

Esta diferencia en los rendimientos de extracción se debe a que con el calentamiento tradicional se pueden extraer solo aquellas proteínas no unidas covalentemente. Es decir, por este método solo se extraen proteínas unidas por

puentes de hidrogeno con las demás macromoléculas presentes en la pared celular (Li & Karboune, 2018).

Por otro lado, se han usado microondas para extraer metabolitos bioactivos de *Arthrospira platensis* entre los que se incluye la proteína ficocianina (complejo pigmento-proteína) la cual obtuvo un rendimiento de 0.2% bajo las condiciones de 60°C por 15 min (Esquivel-Hernández et al., 2017). Los cuales son similares a los obtenidos por los tratamientos 1, 3, 5 y 7 (Cuadro 3, Figura 8) (entre los cuales no hay diferencia significativa $p < 0.05$). Estos tratamientos comparten la similitud de que no tienen ningún catalizador en el tratamiento.

La importancia de usar un catalizador adecuado radica en que las microondas rompen los enlaces de hidrogeno y con ello se inicia un intercambio de iones disueltos, lo que conlleva a una mejor penetración del catalizador que se use. Si este último no es efectivo, no se llevará a cabo una extracción eficiente (en comparación con los otros métodos de extracción usados) (Kadam et al., 2013).

Con ello se puede explicar por qué los tratamientos que no usaron HCl (1, 3, 5 y 7; Cuadro 3, Fig. 8) tienen un bajo rendimiento de extracción de proteína soluble, mientras que aquellos que contaron con HCl (2, 4, 6, 8, 9, 10; Cuadro 3, Fig. 8) muestran rendimientos de extracción mayores.

6.3 Evaluación del efecto de microondas sobre la remoción de carbohidratos solubles de la levadura agotada de cerveza (LAC)

Después del tratamiento con microondas también se evaluaron los carbohidratos totales solubles en el sobrenadante por el método descrito por Dubois (1956). El diseño experimental fue 2^3 y los factores evaluados fueron: el tiempo de acción de las microondas, la potencia y la concentración de HCl.

Para conocer el porcentaje de carbohidratos en la muestra de levadura de cerveza agotada (LAC) se realizó la determinación de carbohidratos totales (Dubois et al., 1956). Los resultados mostraron que el $32.3 \pm 2.0\%$ del peso seco total de la

levadura son carbohidratos. Este dato es similar con lo presentado por Jaeger et al., (2020) en el que indican que el porcentaje de carbohidratos de la LAC es desde el 25 al 50% del peso de la levadura dependiendo de las condiciones de crecimiento de está. Por lo tanto, el máximo de rendimiento para la extracción de carbohidratos solubles a partir de 225 mg de levadura será de 72 mg.

Los carbohidratos que se obtuvieron después del tratamiento con microondas fueron carbohidratos solubles que se midieron en el sobrenadante después de ser sometidos a dicho tratamiento. La Figura 10 muestra la cantidad (mg) de los carbohidratos que se extrajeron al medio, se puede observar que el tratamiento 8 (Cuadro 3, Figura 10) es el que mayor cantidad de carbohidratos solubles libera (49.2 ± 1.3 mg) los cuales representan el $68.3 \pm 1.9\%$ del total de carbohidratos presentes en la LAC. Este tratamiento es 20 veces mayor que aquel que tuvo el menor rendimiento de extracción de carbohidratos, que fue el tratamiento 1 (2.42 ± 0.17 mg).

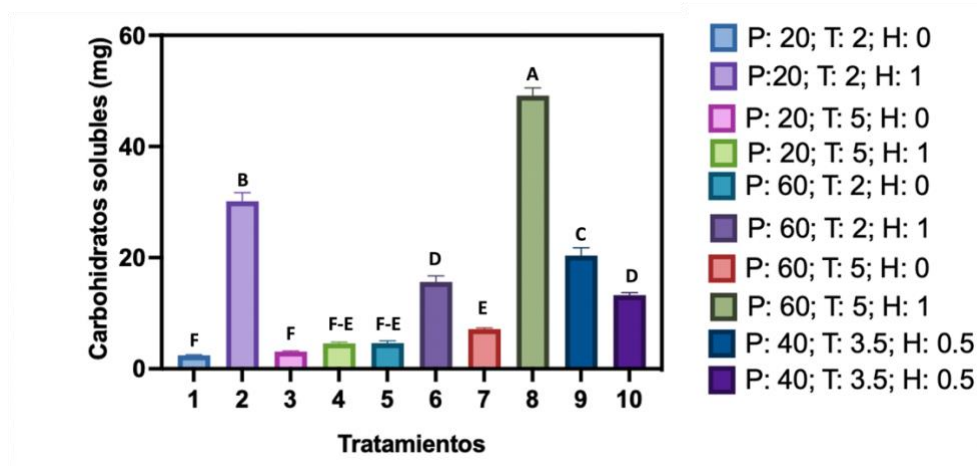


Figura 10. Contenido de carbohidratos solubles (mg) en el sobrenadante después del tratamiento con microondas. Se muestra el promedio (n=3) y la desviación estándar. P: potencia (%); T: tiempo (min); H (ácido clorhídrico 0, 0.5, 1 M). Las barras con diferentes letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los tratamientos 1, 3, 4, 5 (Cuadro 3, Figura 10) no muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) en la extracción de carbohidratos solubles, estos tratamientos

comparten la característica de no tener HCl (exceptuando el 4) en el tratamiento y tener rendimientos de extracción menores al 10%.

Los datos que se mencionan arriba son comparables con los obtenidos por Xu et al., (2018) en el que extrajeron 12.3% de polisacáridos de *Eucommia ulmoides* usando microondas alcanzando 74 °C por 15 min. Sin embargo, el rendimiento de $3.4 \pm 0.1\%$ que fue el más bajo obtenido en la extracción de LAC de este estudio se alcanzó usando un tiempo de 2 min, lo cual representaría un gasto energético menor comparado con los 15 min usados por el estudio sobre *Eucommia ulmoides*.

En otro estudio se ha presentado el efecto de la potencia y el tiempo de exposición a las microondas sobre la extracción de polisacáridos de *Panax notoginseng*. Este estudio indica que con tratamientos de 4 min a potencia de 540 W de microondas extrajeron $11.03 \pm 0.16\%$ de los polisacáridos (Shen et al., 2022). Este resultado es 6 veces menor que los alcanzados por el mejor tratamiento (tratamiento 8, Cuadro 3, Figura 10) que alcanzó rendimientos de $68.3 \pm 1.9\%$. La diferencia entre estos estudios es la presencia de HCl, ya que como se explicó anteriormente, el uso de catalizadores en el tratamiento con microondas puede ayudar a mejorar la tasa de extracción de las macromoléculas. Esto debido a que se rompen no solo los puentes de hidrogeno sino también aquellos enlaces covalentes que unen a estas macromoléculas, aumentando así los rendimientos.

6.4 Evaluación del efecto de la enzima Flavourzyme (proteasa de *Aspergillus oryzae*) sobre la remoción de proteína y carbohidratos solubles de la levadura agotada de cerveza (LAC) tratada con microondas.

Después de que la LAC fuera sometida al tratamiento con microondas se procedió a tratarla con la enzima proteolítica Flavourzyme, la cual es una endoproteasa, con objetivo de romper los enlaces de proteína-carbohidratos, para una mayor liberación de carbohidratos solubles al medio.

Para verificar el efecto que tuvo el tratamiento enzimático se midió la proteína soluble por el método de Bradford (1976) y los carbohidratos totales solubles se midieron por el método de Dubois (1956).

Los resultados (Figura 11) muestran que la extracción de proteína soluble por parte de la proteasa fue de un máximo de 3.0 ± 0.1 mg con para el tratamiento 6 (Cuadro 3, Fig. 11) que consistía en 60% de potencia y 2 min de exposición a las microondas, este resultado es similar a los tratamientos 4, 8 y 10 (Cuadro 3, Figura 11). Esta extracción representa del 2.5 al 3.0% de la remoción total de proteína presente en la LAC.

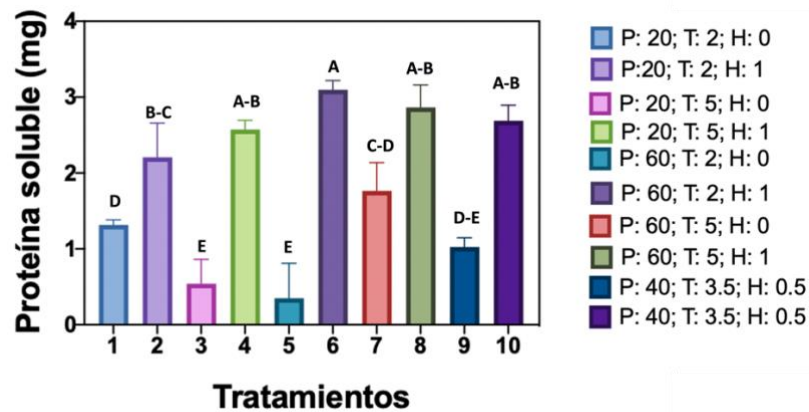


Figura 11. Contenido de proteína soluble (mg) en el sobrenadante después del tratamiento con proteasa. Se muestra el promedio ($n=3$) y la desviación estándar. P: potencia (%); T: tiempo (min); H (ácido clorhídrico 0, 0.5, 1 M). Las barras con diferentes letras indican que son significativamente diferentes ($p<0.05$).

Los tratamientos con el menor rendimiento de extracción fueron el 3 y 5 (Cuadro 3) con los cuales se extrajeron 0.54 ± 0.03 mg y 0.44 ± 0.02 mg respectivamente (Figura 11), que es 5 veces menor en comparación con el que liberó más proteína al sobrenadante que fue el tratamiento 6 (Cuadro 3, Figura 11).

De acuerdo con el estudio llevado a cabo por Merz et al., (2015), en el cual encontraron que la enzima Flavourzyme de *Aspergillus oryzae*, contiene 8 enzimas

diferentes (leucina aminopeptidasa A, leucina aminopeptidasa, dipeptidil peptidasa, dipeptidil peptidasa, proteasa neutra, proteasa neutra, proteasa alcalina y α -amilasa A tipo 3). A las cuales se les puede atribuir su alto rendimiento de hidrólisis de esas proteínas y posiblemente de los enlaces entre proteínas y carbohidratos.

En la Figura 12 se presenta la concentración de carbohidratos que se lograron extraer tras el tratamiento enzimático que se le dio a la LAC después de tratarla con microondas. Los resultados muestran que la cantidad máxima de carbohidratos extraídos fue de 14.5 ± 0.4 mg con el tratamiento 1 (Cuadro 3, Figura 13). Esta cantidad de carbohidratos solubles representa el $20.0 \pm 0.6\%$ del total de carbohidratos presentes en la LAC, los cuales son 72 mg en promedio.

Los tratamientos 1, 3, 4, 6 y 10 (Cuadro 3) no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) por lo que con cada uno de ellos se puede extraer el 20% de los carbohidratos totales presentes en la levadura (Figura 13).

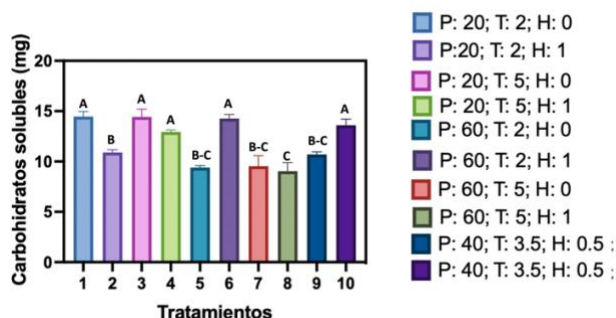


Figura 12. Carbohidratos solubles (mg) en sobrenadante después del tratamiento con proteasa. Se muestra el promedio ($n=3$) y la desviación estándar. P: potencia (%); T: tiempo (min); H (ácido clorhídrico 0, 0.5, 1 M). Las barras con diferentes letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Estos resultados son contrastantes con los presentados en la Figura 11 ya que a pesar de que no se logra un mejor rendimiento de remoción de proteína soluble (3.0 mg en el mejor resultado), si se logra un rendimiento de remoción de carbohidratos totales solubles (14.47 ± 0.45 mg en el resultado mejor resultado) con la acción de la proteasa de *Aspergillus oryzae*.

Las enzimas de lisis se han empleado para ayudar a hidrolizar los enlaces químicos entre los carbohidratos, las proteínas y otras moléculas que se encuentran unidas, de esta forma ayudan en la liberación de polisacáridos que conducen a un aumento del rendimiento de extracción (Chen et al., 2013).

Un estudio en el que se evaluó la extracción de proteína de soya por la enzima Flavourzyme llevado a cabo por Anh et al., (2020) mostró que el porcentaje de proteína soluble recuperada fue de 58.79 ± 0.21 mg. Ésta concentración es mayor al obtenido en este estudio (3.0 mg). Sin embargo, la soya contiene mayor porcentaje de proteína en su estructura, aunado a un empaquetamiento distinto de carbohidratos-proteínas y que estos enlaces se encontrarán en menor proporción y con menor energía de enlace. De igual manera para alcanzar este resultado se llevó a cabo un pre-tratamiento con agua caliente, lo cual significa un gasto energético mayor, en comparación con el tratamiento con microondas que se llevó a cabo en esta investigación.

Por otra parte, se llevó un estudio que evaluó la extracción de proteína de extracto de levadura en el cual obtuvieron hasta 55% de recuperación de proteína soluble. Sin embargo, en este estudio se usó la combinación de dos enzimas (Protamex y Flavourzyme) lo cual eleva los costos de producción. Además Protamex es una mezcla de endo-proteasas microbianas que ha sido optimizada para la producción de hidrolizados de proteínas lácteas (Chae et al., 2001b). En comparación con el presente estudio en el que se usó solo la enzima Flavourzyme en conjunción con el tratamiento con microondas para la extracción de polisacáridos.

6.5 Evaluación del efecto de la proteasa Flavourzyme (proteasa de *Aspergillus oryzae*) asistido por un tratamiento de ultrasonido sobre la extracción de proteína y carbohidratos de la pared celular de la levadura agotada de cerveza (LAC).

A la LAC obtenida después de los procesos de lavado se le adicionó el 10% (v/v) de la enzima Flavourzyme (proteasa de *Aspergillus oryzae*) en la solución y se llevó a sonicación usando un procesador ultrasónico Vibracell (Sonics, modelo vcx500, Newtown, CT, EUA).

Las condiciones de la sonicación (tiempo, amplitud y pulsos intermitentes) varían dependiendo el tratamiento, sin embargo, debido al uso de la enzima se consideró que la temperatura debería permanecer en un rango de 40 a 50°C. Esto debido a que es la óptima para la enzima utilizada en este tratamiento, para lo cual el recipiente se colocó en un frasco con hielo, y se monitoreo la temperatura durante el proceso con un termómetro para mantener la temperatura al valor especificado.

Al finalizar el tratamiento enzimático asistido por ultrasonido se evaluó tanto el contenido de proteína como el de carbohidratos solubles en sobrenadante, esto mediante el método de Bradford (1976) y Dubois (1956) respectivamente.

En primer lugar, se evaluó la proteína soluble (Figura 13) y el mejor tratamiento fue el T8 (Cuadro 5) donde se extrajeron 21.3 ± 1.3 mg de proteína representado el $16.5 \pm 1.0\%$ del total de proteína presente en la levadura agotada de cerveza que sería de 105.7 ± 6.0 mg (100% de extracción rendimiento teórico). Los niveles de los factores para este tratamiento fueron 90 min en el procesador ultrasónico a una amplitud del 40% con un porcentaje de pulsos intermitentes del 30%. Este factor se llevó a cabo mediante la opción del equipo de prender el sonificado por una fracción de tiempo y apagarla por el restante del tiempo para con esto calcular un porcentaje de prendido y apagado.

Por otra parte, los tratamientos con menor rendimiento de extracción de proteína soluble fueron los tratamientos 1, 3, 5 y 7 (Cuadro 5, Fig. 13) con un

promedio de extracción de 5.23 ± 1.5 mg, lo que representa un $4.05 \pm 0.9\%$ del total de la proteína presente en la levadura al iniciar los tratamientos. Se puede inferir que el T8 (Cuadro 5, Figura 13) es 4 veces mejor que los tratamientos de menor rendimiento de extracción de proteína.

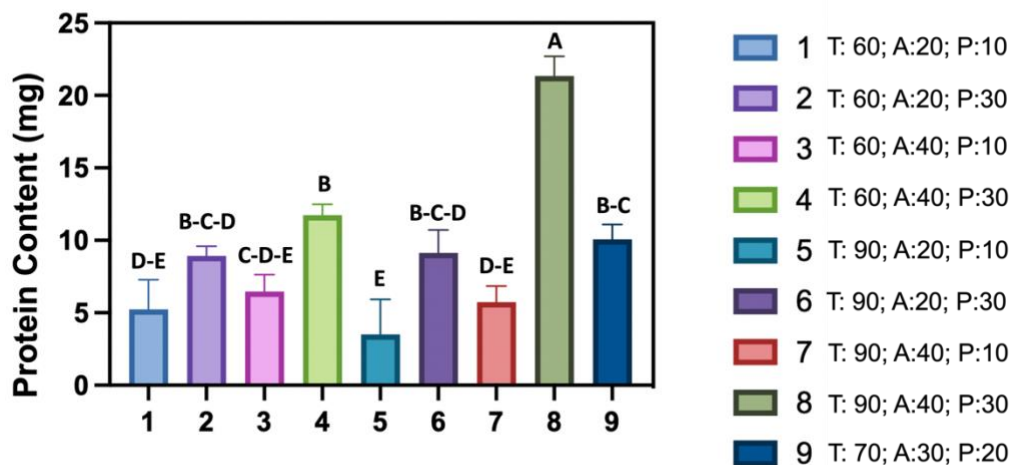


Figura 13. Proteína soluble (mg) en el sobrenadante después del tratamiento con proteasa/ultrasonido. Se muestra el promedio ($n=3$) y la desviación estándar. T: tiempo (min); A: amplitud (%); Pulsos intermitentes (%). Las barras con diferentes letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Rahman & Lamsal, (2021) llevaron a cabo una revisión de trabajos en los que recopila el uso de ultrasonido como técnica de extracción de proteínas de distintas fuentes. En este trabajo se encuentran investigaciones como la de Preece et al., (2017) en la que reportaron un rendimiento del 7% de extracción de proteína de pulpa de soja usando un tratamiento de sonicación con una potencia de 400 W; el medio en el que se llevó esta extracción fue en agua. Con nuestro mejor tratamiento (T8, Cuadro 5, Figura 13) usando 40% de la potencia del equipo (200 W) se logra una extracción del $16.5 \pm 1.0\%$ de extracción de proteína presente en la levadura, siendo 2.3 veces mayor que los resultados de su estudio.

Por otra parte, Byanju et al. (2020), reportaron que alcanzaron un rendimiento de extracción de proteína de hasta del 22% siendo la materia prima harina de garbanzo. Este rendimiento es 1.3 veces mayor que el que obtuvimos en el presente estudio, sin embargo, estos investigadores usaron un procesador ultrasónico de 750 W lo que representa un gasto energético mayor. De igual manera, el medio sobre el cual fue suspendida la matriz alimentaria fue agua alcalina pH 8.5 lo que se considera un catalizador para la reacción. Sin embargo, esto generaría un residuo al terminar el proceso y aumentaría los pasos del proceso al incluir un lavado para eliminar el medio alcalino. Considerando de igual manera que al ser una matriz alimentaria distinta, el empaquetamiento de macromoléculas es distinta a la de la LAC.

Se han encontrado a la fecha pocos estudios en donde se use la técnica de ultrasonido para la extracción de proteínas de levadura, uno de ellos fue el llevado a cabo por Zhang et al., (2014). Estos autores, usando un procesador ultrasónico de 750 W lograron extraer hasta el 12% de proteína de la levadura lo que indica que usando el T8 (ultrasonido/enzima, Cuadro 5, Figura 13) puede aumentar 30% el rendimiento de extracción en la levadura. En este estudio la máxima potencia del equipo de ultrasonido fue de 500 W.

Por otra parte, se midió la cantidad de carbohidratos solubles que se obtuvieron tras el tratamiento con ultrasonido/proteasa. Los resultados (Figura 14) muestran que el mejor tratamiento para la extracción de carbohidratos solubles fue el T8 (Cuadro 5, Fig. 14), extrayendo un total de 32.6 ± 0.5 mg lo que representa un $45.3 \pm 0.7\%$ del total de carbohidratos (72.0 ± 0.7 mg) presentes en la LAC antes del tratamiento (Cuadro 5, Figura 14).

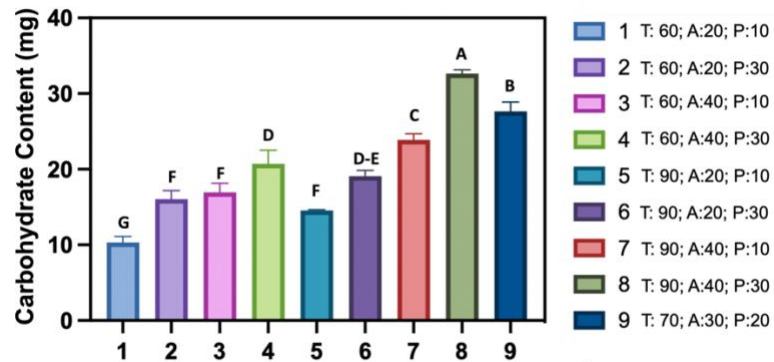


Figura 14. Carbohidratos solubles (mg) en sobrenadante después del tratamiento con proteasa/ultrasonido. Se muestra el promedio (n=3) y la desviación estándar. (T: tiempo (min); A: amplitud (%); Pulsos intermitentes (%)). Las barras con diferentes letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El tratamiento con menor tasa de extracción fue el T1 (Cuadro 5, Figura 14) alcanzando una remoción de 10.0 ± 0.8 mg de carbohidratos, lo que representa un $14.3 \pm 1.1\%$ de rendimiento de extracción. El T8 alcanza representa una extracción de carbohidratos 2.97 veces mejor que el T1.

Estudios previos han reportado que usando ultrasonido como técnica de extracción de polisacáridos usando como matriz la levadura han logrado extraer hasta $6.2 \pm 0.3\%$ en un medio acuoso a pH 7.5 (Zhang et al., 2014). Este valor representa una menor tasa de extracción que el tratamiento 1 (el cual fue el que menores resultados obtuvo) y en comparación con el T8 es 7 veces mejor para extraer los carbohidratos de la pared celular de la levadura. Shen et al., (2022) llevaron a cabo una extracción de polisacáridos de *Panax notoginseng* usando sonicación, los resultados demuestran que en el mejor de sus tratamientos extrajo 7.61% de los polisacáridos. Al igual que el anterior estudio este dato muestra que nuestro tratamiento es 5.7 veces mejor (T8). Los resultados y las comparaciones indican que, usando tanto ultrasonido como enzimas, se logra una mejor extracción

de carbohidratos y proteínas de la pared celular de la levadura, esto gracias a los mecanismos de sinergia entre enzima y ultrasonido.

Rahman & Lamsal, (2021) describen estos mecanismos al utilizar el ultrasonido cómo una técnica para la extracción de compuestos de distintas matrices. El principal mecanismo es el del fenómeno de cavitación el cual consiste en transmitir ondas en el medio líquido que se van propagando, creando ciclos (Figura 15). Estos ciclos generan una presión baja en el medio, lo cual causa la ruptura del líquido y la creación de espacios vacíos que posteriormente se transforman en diminutas burbujas o cavidades.

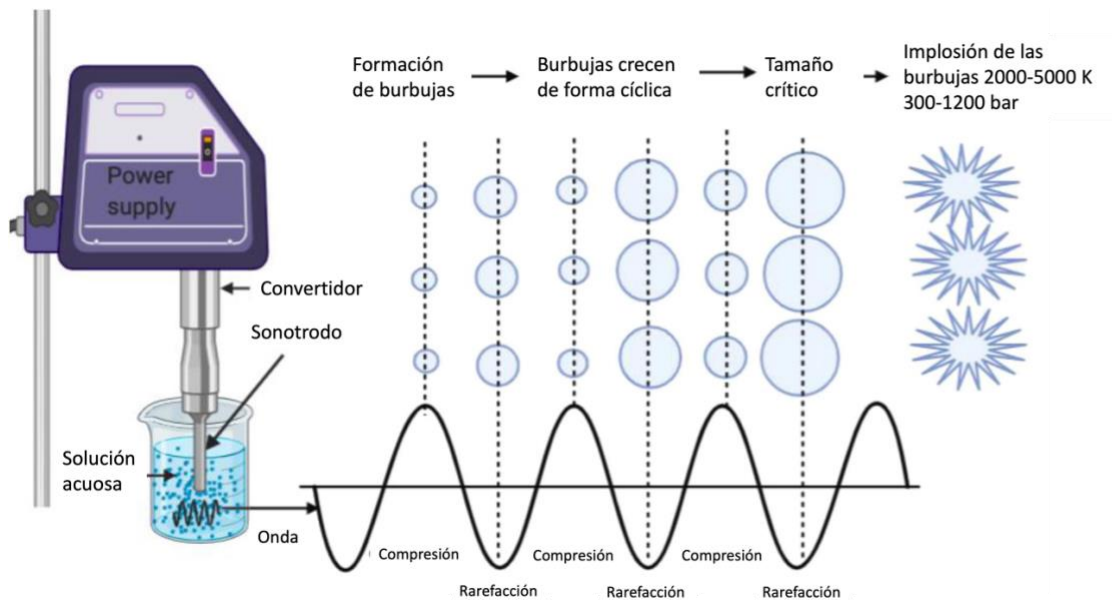


Figura 15. La formación de burbujas de cavitación mediante ciclos alternos de compresión y expansión de la onda de sonido. Adaptado de Rahman & Lamsal (2021).

Los ciclos posteriores de compresión y rarefacción provocan que las burbujas se reduzcan y expandan hasta llegar a un tamaño crítico en el que colapsan, alcanzando temperaturas de 2,000 a 5,000 K y presiones de 300 a 1,200 bares.

En otro estudio se evaluaron los mecanismos del uso de ultrasonido como técnica de apoyo en conjunto con enzimólisis (Zheng et al., 2019). Estos autores encontraron que el uso previo de ultrasonido descompone los agregados de

glucanos para revelar la estructura interna mediante un proceso de cavitación acústica, lo que aumenta la eficiencia de la enzimólisis (Fig. 16).

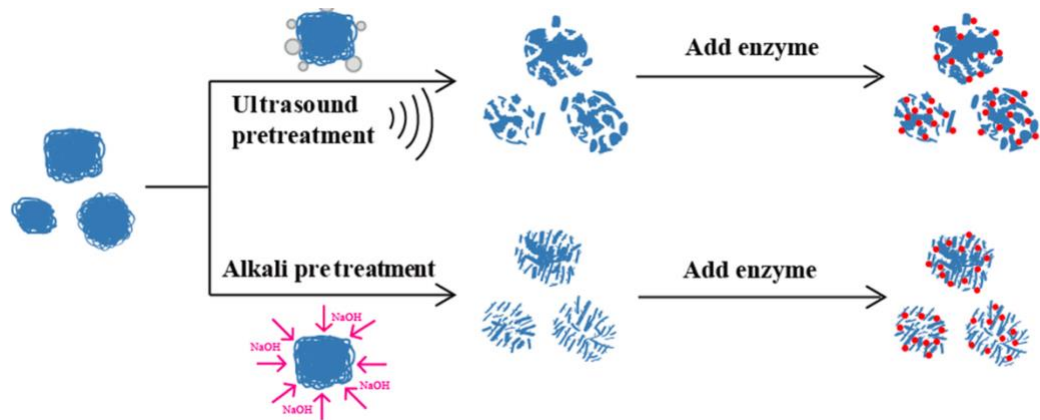


Figura 16. Mecanismo de acción de la enzima al ser asistida por tratamiento de ultrasonido. Adaptado de Zheng et al. (2019).

Por otro lado, Wang, et al. (2018), explicaron que el ultrasonido promueve las reacciones enzimáticas mediante el fenómeno de cavitación y sus efectos son dependientes de las condiciones de la operación. Mientras que un tratamiento ultrasónico de baja intensidad promueve la acción de las enzimas un tratamiento a altas intensidades puede causar efectos negativos en está. La sonicación afecta tanto a la enzima como al sustrato y al complejo enzima sustrato.

6.6 Evaluación del efecto de los extractos de los tratamientos de microondas, microondas/proteasa y ultrasonido/proteasa sobre la estabilidad de membrana de los glóbulos rojos para caracterizar la actividad antiinflamatoria de los mismos.

Los extractos de los tratamientos con mayor rendimiento de microondas, microondas-proteasa, microondas-proteasa-glucanasa y ultrasonido-proteasa fueron secados en horno (Felisa, Zapopan, Jal. México) a 40 °C por 24 horas para obtener un polvo fino, del cual se pesó y se disolvió en 1 mL de agua para cada tratamiento.

Se llevó a cabo el ensayo de estabilidad de membrana de glóbulos rojos para todas las muestras. Los resultados del ensayo muestran que el extracto de microondas el cual contiene 1 mg de carbohidratos y 0.4 mg de proteína es capaz de mantener una estabilidad de la membrana de los glóbulos rojos frente a la acción de la temperatura (54°C), el porcentaje de estabilidad de éste fue de 88.9 ± 0.3 %, que en comparación con el diclofenaco que obtuvo un porcentaje 92.4 ± 3.0 % de estabilidad (Figura 17), nos indica que al extraer carbohidratos enriquecidos con proteína de la pared celular de la levadura agotada de cerveza (LAC) tuvo una capacidad antiinflamatoria igual ($p > 0.05$) que un fármaco de venta al público.

Por otra parte, los carbohidratos extraídos después del tratamiento con proteasa (1 mg de carbohidratos con 0.05 mg de proteína) logró un porcentaje de estabilidad de 52.2 ± 5 % de la membrana de los glóbulos rojos. El extracto después de tratar la LAC con glucanasa obtuvo un porcentaje de 58.6 ± 5.0 % de estabilidad de membrana y, por último, la extracción de carbohidratos usando ultrasonido-proteasa tuvo un porcentaje de 66.7 ± 5.0 %. Se observó que todas las extracciones obtienen más del 50% de actividad antiinflamatoria (medida con el porcentaje de estabilidad de membrana de glóbulos rojos).

La actividad antiinflamatoria se asocia a la estabilidad de los glóbulos rojos debido a que la membrana de los glóbulos rojos comparte similitudes con la membrana de los lisosomas. Esto es importante ya que, durante el proceso de inflamación, los lisosomas juegan un papel importante en el daño tisular ya que oxidan los lípidos de la membrana celular (Ge et al., 2015).

Un estudio realizado en 1979 demostró que los lisosomas son capaces de inhibir el receptor Hsp 90, que es un receptor antiinflamatorio esteroideo. Al modificarlo a una forma más pequeña, evita que se una a los medicamentos antiinflamatorios esteroides, lo que, a su vez, aumenta el estado inflamatorio.

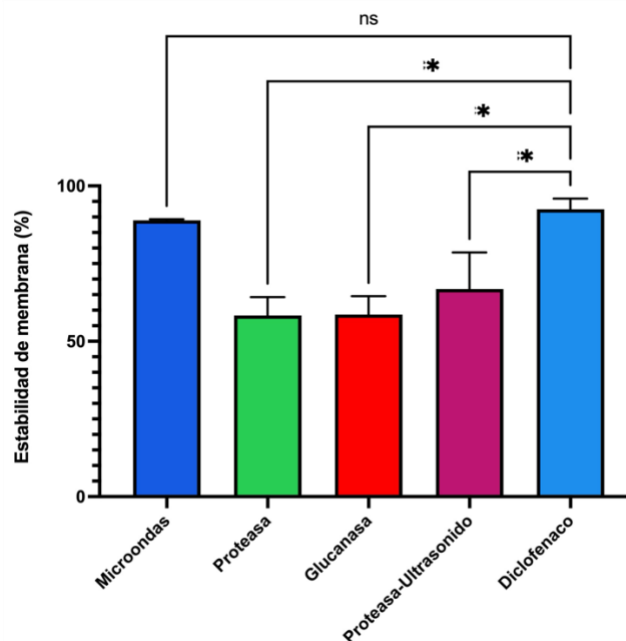


Figura 17. Porcentaje de estabilidad de membrana de los glóbulos rojos ante tratamiento térmico a 54°C usando los extractos de LAC como estabilizantes de la membrana, diclofenaco como control positivo. ns= no diferencia significativa; *diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$)

Por lo tanto, la estabilización de la membrana de los lisosomas puede desempeñar un papel fundamental en prevenir la liberación de proteasas y reducir las reacciones inflamatorias (Ge et al., 2015).

La capacidad de los extractos para mantener la integridad de la membrana de los glóbulos rojos sugiere que también son efectivos para preservar la integridad de la membrana de los lisosomas. Por lo tanto, el efecto que los extractos tienen en la prevención de la hemólisis puede ser tomado como un indicio de su eficacia en la reducción de la inflamación (Karrat et al., 2022).

La actividad antiinflamatoria de 88.9 ± 0.3 %, del extracto de LAC obtenido mediante tratamiento con microondas se atribuye a los carbohidratos presentes en el, más específicamente a los β -glucanos que en un principio se encuentran en la pared celular de la levadura y que al someterse a las microondas esta se rompe liberando en el proceso los β -glucanos al medio (Bastos et al., 2022).

Se le atribuye la actividad antiinflamatoria a los β -glucanos debido a que se han reportado diversos estudios que estos polímeros presentan esta actividad antiinflamatoria. Cerletti et al. (2021), reportaron el impacto que tiene los β -glucanos en la salud humana, indican que los efectos antiinflamatorios de estos polisacáridos ya se han reportado en modelos celulares y experimentales, por ejemplo, Murphy et al., (2020) mostraron que los β -glucanos reducen la producción de citocinas proinflamatorias.

6.7 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) de los extractos de los tratamientos de microondas, microondas-proteasa, microondas-proteasa-glucanasa y ultrasonido-proteasa.

Para conocer los compuestos presentes en la levadura agotada de cerveza (LAC) antes de los tratamientos y después de los distintos tratamientos se llevó a cabo un análisis FTIR. Esta técnica determina el tipo de enlaces que contiene la muestra, mismos que son representativos de moléculas o interacciones de las moléculas. Los resultados se muestran en la Figura 18.

La levadura agotada de cerveza antes de ser sometida a los tratamientos presenta picos en 849 cm^{-1} mismos que son representativos del enlace glucosídico en configuración β . Así mismo se observa un pico en 1036 cm^{-1} , 1242 cm^{-1} , 1310 cm^{-1} y 1405 cm^{-1} que, de acuerdo con la literatura, las bandas que se encuentran entre 1000 y 1400 cm^{-1} son indicativos de enlaces O-H y C-H, por lo que se consideran como carbohidratos. También se presenta una banda nítida a 1627 cm^{-1} , que se puede atribuir a la vibración asimétrica de estiramiento C-O (Figura 18 A), esta banda se le considera propia de las proteínas (Faustino et al., 2022; Yuan et al., 2022).

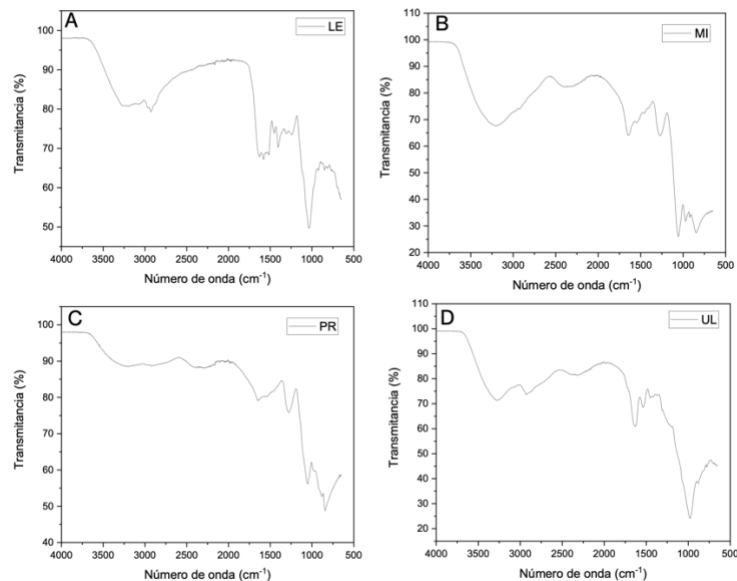


Figura 18. Análisis FTIR A) levadura agotada de cerveza; B) extracto obtenido con microondas de la LAC; C) extracto de la LAC obtenido después del tratamiento con microondas y proteasa; D) extracto de la LAC obtenido después del tratamiento con proteasa asistida por ultrasonido.

Después de que se lleva a cabo el tratamiento con microondas (Figura 18 B) y se obtiene el extracto, se sigue observando la banda característica del enlace β glucosídico. Por lo cual se logra extraer β -glucanos de la pared celular de la levadura. De igual manera se observan las bandas en 969, 1056, 1273, propias de los carbohidratos, más específicamente de los enlaces COC y CC y 1646 cm^{-1} (banda asociada a enlace amida) que también indican la extracción de proteínas por lo que se le puede considerar un extracto de β -glucanos enriquecido con proteínas (Fazio et al., 2020).

Ahora bien, después de que la LAC fue procesada por microondas y en el siguiente paso fue sometida a un tratamiento enzimático con proteasa. Se obtuvo un extracto cuya grafica de FTIR (Figura 18 C) sigue mostrando las bandas características de los carbohidratos, en 843 cm^{-1} (β -glucosídicos), Las bandas a 1051 y 1275 cm^{-1} pertenecen a enlaces de carbohidratos y 1645 cm^{-1} , que es propia

de las proteínas. Gracias a esto se comprueba que con la proteasa se aumenta la eficiencia de extracción de los β -glucanos enriquecidos con proteína.

Por último, el espectro de la extracción con proteasa asistida por ultrasonido logra una extracción de carbohidratos que se ven expresados en las bandas de 977 y 1453 cm^{-1} . También se observa una banda en 1629 cm^{-1} , que es indicativo de las proteínas (Figura 18 D). Por lo anterior, se obtuvo de esta manera el extracto de β -glucanos unido a proteínas.

6.8 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) para la levadura agotada de cerveza antes y después de los tratamientos.

El objetivo de este análisis fue observar la estructura de la levadura agotada de cerveza (LAC) antes de ser sometida a los tratamientos de microondas, microondas-proteasa, microondas-proteasa-glucanasa y ultrasonido-proteasa, y estos tratamientos afectan la morfología de esta (Figura 19).

Se llevaron muestras secadas en horno a 40 °C por 24 horas y posteriormente suspendidas en etanol (70% v/v) por 24 horas a analizar por la técnica de microscopía electrónica de barrido (Figura 20).

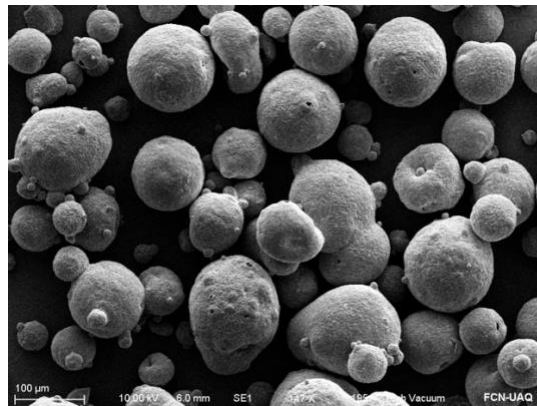


Figura 19. Análisis SEM de LAC anterior a los tratamientos

La función de la pared celular es actuar como un revestimiento rígido para las células, es crucial para el crecimiento, la reproducción y la interacción de estas células con su entorno. Además, la pared celular controla la forma de la célula y su velocidad de crecimiento, brindando protección contra factores mecánicos externos y la presión osmótica interna. Esta estructura está compuesta en su mayoría por polisacáridos, que proporcionan el soporte para las glicoproteínas de la superficie celular. De esta forma contribuyen a las propiedades adhesivas de la pared y reducen su permeabilidad a moléculas grandes, en especial, a las enzimas que podrían digerir la pared celular (Molon et al., 2018).

En la Figura 19 se puede observar la estructura de la LAC y como es que después del proceso de fermentación de la cerveza esta sigue intacta por lo que los componentes de interés como los polisacáridos y las proteínas siguen dentro de la célula. Para poder obtenerlos, es necesario utilizar procesos ya sea térmicos, físicos, mecánicos o químicos que rompan la pared celular.

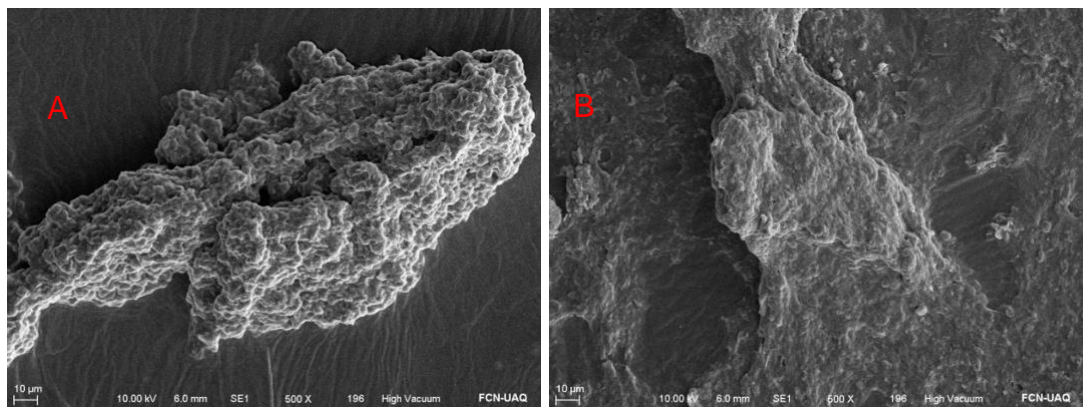


Figura 20. A) Análisis SEM de LAC después de un tratamiento con microondas, 5 min, 630 W con HCl. B) Análisis SEM de LAC después del tratamiento con microondas-proteasa 5 min, 630 W, con HCl.

En la Figura 20 A se puede observar como la levadura agotada de cerveza se ve afectada morfológicamente tras ser sometida al tratamiento de microondas. Ya no se observan las esferas propias de una célula, sino que se ve una masa compactada de varias células que han sido destruidas. Esto resulta relevante,

porque demuestra que al someterlas a microondas se puede romper la estructura de la pared celular lo que favorecerá la extracción de los polisacáridos y las proteínas. Sin embargo, aún después de este proceso se ve que la agrupación de células pudiera contener aún macromoléculas que se encuentren en estas aglomeraciones.

Tras el segundo tratamiento (enzima proteasa de *A. niger*) ya no se ven las aglomeraciones (Figura 20 B), se observa una figura lisa amorfa de los restos de la levadura, en este punto ya fueron extraídos aquellos compuestos que formaban parte de la levadura y daban la estabilidad a la misma.

En la Figura 21 se puede observar como la estructura de la levadura queda reducida a una masa uniforme tras ser sometida al tratamiento con ultrasonido-proteasa. La propia célula ya no es capaz de mantener la estructura de la pared lo cual beneficia la extracción de carbohidratos unidos a proteína porque de esta manera se aprovechan mejor todos los residuos de LAC, favoreciendo la economía circular y disminuyendo el desecho de residuos.

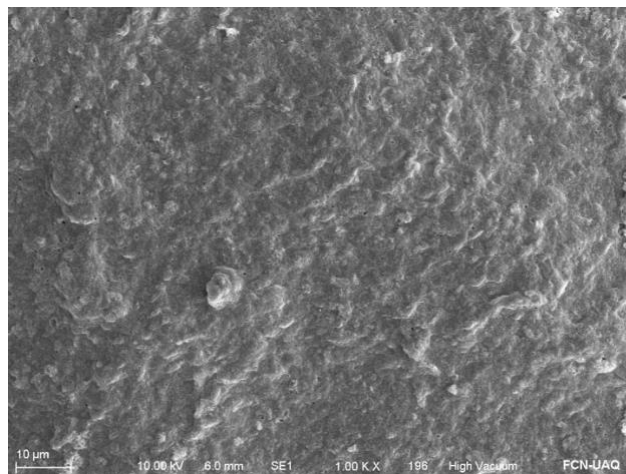


Figura 21. Análisis SEM de LAC tras el paso de extracción con ultrasonido 220 W, 90 min asistido por la enzima proteasa.

En contraste, Soro et al. (2021), mostraron un análisis SEM de la levadura. Se observa que, tanto en el control como en las células tratadas con ultrasonido, la

estructura celular de la levadura sigue intacta en su mayoría tras el tratamiento sónico, indicando que no hay ruptura celular suficiente para extraer los compuestos internos. Esta falta de ruptura se puede atribuir a la baja intensidad del tratamiento aunado al tiempo (30 min) que no fue suficiente para romper la estructura de la levadura, lo que se considera poco eficiente.

7. Conclusiones

Mediante la técnica de microondas en conjunto con el catalizador de HCl se extrajeron carbohidratos correspondientes a β -glucanos propios de la pared celular de la levadura agotada de cerveza que se ven fortificados con la agregación de proteínas que se encuentran de igual manera en la pared celular de la levadura, obteniendo así β -glucanos fortificados proteicamente.

Con la acción de la proteasa se aumenta 12% la eficiencia de extracción de la técnica de microondas, mejorando también la solubilización de los carbohidratos y las proteínas extraídas con estos tratamientos, aumentando así los posibles usos de los β -glucanos extraídos, como en la industria panadera, cosmetológica, y de aditivos

El uso de ultrasonido disminuyó el tiempo requerido para la proteólisis de la levadura agotada de cerveza mejorando la producción de carbohidratos y proteína soluble.

Los extractos de β -glucanos con proteínas presentaron actividad antiinflamatoria, similar a la de un fármaco antiinflamatorio de uso farmacéutico.

En general, al implementarse técnicas de extracción combinadas, se puede reducir el tiempo necesario para la hidrólisis de la pared de la levadura agotada de cerveza, mejorando la producción de carbohidratos y proteínas solubles. Los extractos resultantes, que contenían β -glucanos fortificados con proteínas, demostraron tener actividad antiinflamatoria.

Estos hallazgos sugieren aplicaciones prometedoras en el campo de los alimentos funcionales. En conjunto, el estudio ofrece una contribución significativa al desarrollo de técnicas de extracción mejoradas y a la exploración de nuevas aplicaciones para los β -glucanos en diversas industrias.

8. Bibliografía

- Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., & Dilshad, S. M. R. (2012). Beta glucan: A valuable functional ingredient in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(3), 201–212. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499806>
- Amer, E. M., Saber, S. H., Markeb, A. A., Elkhawaga, A. A., Mekhemer, I. M. A., Zohri, A. N. A., Abujamel, T. S., Harakeh, S., & Abd-Allah, E. A. (2021). Enhancement of β -glucan biological activity using a modified acid-base extraction method from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules*, *26*(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules26082113>
- Anh, T. L. Q., Hoa, N. T. Q., Nguyen, P. D. T., Thanh, H. van, Nguyen, P. B., Anh, L. T. H., & Dao, D. T. A. (2020). Soybean protein extraction by alcalase and Flavourzyme, combining thermal pretreatment for enteral feeding product. *Catalysts*, *10*(8), 829. <https://doi.org/10.3390/catal10080829>
- Avramia, I., & Amariei, S. (2021). Spent Brewer's yeast as a source of insoluble β -glucans. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms22020825>
- Bacha, U., Nasir, M., Iqbal, S., & Anjum, A. A. (2017). Nutraceutical, anti-inflammatory, and immune modulatory effects of β -glucan isolated from yeast. *BioMed Research International*, *2017*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/8972678>
- Bastos, R., Oliveira, P. G., Gaspar, V. M., Mano, J. F., Coimbra, M. A., & Coelho, E. (2022). Brewer's yeast polysaccharides — A review of their exquisite structural features and biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, *277*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118826>
- Benito-Román, Ó., Alonso, E., & Cocero, M. J. (2013). Ultrasound-assisted extraction of β -glucans from barley. *LWT - Food Science and Technology*, *50*(1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.006>

- Bulmer, G. S., de Andrade, P., Field, R. A., & van Munster, J. M. (2021). Recent advances in enzymatic synthesis of β -glucan and cellulose. In *Carbohydrate Research* (Vol. 508). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108411>
- Byanju, B., Rahman, M. M., Hojilla-Evangelista, M. P., & Lamsal, B. P. (2020). Effect of high-power sonication pretreatment on extraction and some physicochemical properties of proteins from chickpea, kidney bean, and soybean. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 712–721. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.118>
- Cacciola, V., Batllò, I. F., Ferraretto, P., Vincenzi, S., & Celotti, E. (2013). Study of the ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *European Food Research and Technology*, 236(2), 311–317. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1893-6>
- Caruso, M. A., Piermaria, J. A., Abraham, A. G., & Medrano, M. (2022). β -glucans obtained from beer spent yeasts as functional food grade additive: Focus on biological activity. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 133). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107963>
- Cerletti, C., Esposito, S., & Iacoviello, L. (2021). Edible mushrooms and beta-glucans: impact on human health. *nutrients*, 13(7), 2195. <https://doi.org/10.3390/nu13072195>
- Chae, H. J., Joo, H., & In, M.-J. (2001a). Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource Technology*, 76(3), 253–258. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00102-4)
- Chae, H. J., Joo, H., & In, M.-J. (2001b). Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource Technology*, 76(3), 253–258. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00102-4)

- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., & Basak, T. (2013). Microwave food processing-A review. *Food Research International*, 52(1), 243–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.033>
- Chang, S. (2010). *Food analysis* (S. S. Nielsen, Ed.). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1>
- Chen, J., Lai, P., Shen, H., Zhen, H., & Fang, R. (2013). Effect of extraction methods on polysaccharide of *Clitocybe maxima* Stipe. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(3), 370–373. <https://doi.org/10.19026/ajfst.5.3273>
- Chen, X., Yang, J., Shen, M., Chen, Y., Yu, Q., & Xie, J. (2022). Journal Pre-proof Structure, function and advance application of microwave-treated polysaccharide: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 1–55. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.03.016>
- Czechowska-Biskup, R., Rokita, B., Lotfy, S., Ulanski, P., & Rosiak, J. M. (2005). Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. *Carbohydrate Polymers*, 60(2), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.12.001>
- de la Hoz, L., Ponezi, A. N., Milani, R. F., Nunes da Silva, V. S., Sonia de Souza, A., & Bertoldo-Pacheco, M. T. (2014). Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides. *Food Chemistry*, 142, 166–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.133>
- de Marco Castro, E., Calder, P. C., & Roche, H. M. (2021). β -1,3/1,6-Glucans and immunity: atate of the art and future directions. *Molecular Nutrition and Food Research*, 65(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201901071>
- Du, B., Zeng, H., Yang, Y., Bian, Z., & Xu, B. (2016). Anti-inflammatory activity of polysaccharide from *Schizophyllum commune* as affected by ultrasonication. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.052>

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Eom, S. J., Lim, T. G., Jhun, H., Lee, N. H., Kang, M. C., & Song, K. M. (2021). Inhibitory effect of *Saccharomyces cerevisiae* extract obtained through ultrasound-assisted extraction on melanoma cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105620>
- Esquivel-Hernández, D. A., Rodríguez-Rodríguez, J., Rostro-Alanis, M., Cuéllar-Bermúdez, S. P., Mancera-Andrade, E. I., Núñez-Echevarría, J. E., García-Pérez, J. S., Chandra, R., & Parra-Saldívar, R. (2017). Advancement of green process through microwave-assisted extraction of bioactive metabolites from *Arthrospira Platensis* and bioactivity evaluation. *Bioresource Technology*, 224, 618–629. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.061>
- Faustino, M., Durão, J., Pereira, C. F., Oliveira, A. S., Pereira, J. O., Pereira, A. M., Ferreira, C., Pintado, M. E., & Carvalho, A. P. (2022). Comparative analysis of mannans extraction processes from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/foods11233753>
- Fazio, A., Torre, C. La, Caroleo, M. C., Caputo, P., Plastina, P., & Cione, E. (2020). Isolation and purification of glucans from an Italian cultivar of *Ziziphus jujuba* Mill. And in vitro effect on skin repair. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040968>
- Feldman, H. (2012). Yeast cell architecture and functions. *Molecular and Cell Biology*, 5–23. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1002/9783527659180.ch2>
- Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in Genetics*, 81, 33–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>
- Ge, W., Li, D., Gao, Y., & Cao, X. (2015). The Roles of Lysosomes in Inflammation and Autoimmune Diseases. *International Reviews of Immunology*, 34(5), 415–431. <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.936587>

- Gissibl, A., Care, A., Parker, L. M., Iqbal, S., Hobba, G., Nevalainen, H., & Sunna, A. (2018). Microwave pretreatment of paramylon enhances the enzymatic production of soluble β -1,3-glucans with immunostimulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 196, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.038>
- Grbavac, A., Čanak, I., Stuparević, I., Teparić, R., & Mrša, V. (2017). Proteolytic processing of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein Scw4 regulates its activity and influences its covalent binding to glucan. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(3), 507–515. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.12.009>
- Hu, T., Cai, W., Cai, W., Zheng, Z., Xiao, Y., & Huang, Q. (2021). Structure, size and aggregated morphology of a β -D-glucan from *Lignosus rhinocerotis* as affected by ultrasound. *Carbohydrate Polymers*, 269, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118344>
- Huang, G., Chen, F., Yang, W., & Huang, H. (2021). Preparation, deproteinization and comparison of bioactive polysaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 564–568. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.038>
- Ishimoto, Y., Ishibashi, K. ichi, Yamanaka, D., Adachi, Y., Kanzaki, K., Iwakura, Y., & Ohno, N. (2018). Production of low-molecular weight soluble yeast β -glucan by an acid degradation method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2269–2278. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.094>
- Jaeger, A., Arendt, E. K., Zannini, E., & Sahin, A. W. (2020). Brewer's spent yeast (BSY), an underutilized brewing by-product. In *Fermentation* (Vol. 6, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040123>
- Johnston, M. (2013). Bakers' and brewers' yeast: *Saccharomyces cerevisiae*. *Brenner's Encyclopedia of Genetics 2nd Edition*, 284–286. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00176-5>

- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2013). Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(20), 4667–4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>
- Kang, S. H., Kim, H. R., Kim, J. H., Ahn, B. H., Kim, T. W., & Lee, J. E. (2014). Identification of wild yeast strains and analysis of their β -glucan and glutathione levels for use in *Makgeolli* brewing. *Mycobiology*, *42*(4), 361–367. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.4.361>
- Karaki, N., Aljawish, A., Humeau, C., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (2016). Enzymatic modification of polysaccharides: mechanisms, properties, and potential applications: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, *90*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.004>
- Karimi, R., Azizi, M. H., & Xu, Q. (2019). Effect of different enzymatic extractions on molecular weight distribution, rheological and microstructural properties of barley bran β -glucan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *126*, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.165>
- Karrat, L., Abajy, M. Y., & Nayal, R. (2022). Investigating the anti-inflammatory and analgesic properties of leaves ethanolic extracts of *Cedrus libani* and *Pinus brutia*. *Heliyon*, *8*(4), e09254. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09254>
- Kaur, R., Sharma, M., Ji, D., Xu, M., & Agyei, D. (2020). Structural features, modification, and functionalities of beta-glucan. *Fibers*, *8*, 1–29. <https://doi.org/10.3390/fib8010001>
- Klis, F. M., Boorsma, A., & de Groot, P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *23*(3), 185–202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>
- Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., & Schoessler, K. (2011). Emerging technologies in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, *2*(1), 203–235. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124129>

- Li, J., & Karboune, S. (2018). A comparative study for the isolation and characterization of mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 654–661. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.102>
- Li, J., Li, B., Geng, P., Song, A. X., & Wu, J. Y. (2017). Ultrasonic degradation kinetics and rheological profiles of a food polysaccharide (*konjac glucomannan*) in water. *Food Hydrocolloids*, 70, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.022>
- Li, R., & Feke, D. L. (2015). Rheological and kinetic study of the ultrasonic degradation of xanthan gum in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 172, 808–813. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.133>
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., & Chemat, F. (2013). Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 47, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.02.007>
- Marson, G. V., de Castro, R. J. S., Belleville, M. P., & Hubinger, M. D. (2020). Spent brewer's yeast as a source of high added value molecules: a systematic review on its characteristics, processing and potential applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02866-7>
- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., Stressler, T., & Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682–5693. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01665>
- Min, J.-H., Kim, Y.-H., Kim, J.-H., Choi, S.-Y., Lee, J.-S., & Kim, H.-K. (2012). Comparison of microbial diversity of Korean commercial *Makgeolli* showing high

- β -glucan content and high antihypertensive activity, respectively. *Mycobiology*, 40(2), 138–141. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.2.138>
- Mirzadeh, M., Arianejad, M. R., & Khedmat, L. (2020). Antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of polysaccharides obtained by microwave-assisted extraction method: A review. *Carbohydrate Polymers*, 229, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115421>
- Mirzadeh, M., Keshavarz Lelekami, A., & Khedmat, L. (2021). Plant/algal polysaccharides extracted by microwave: A review on hypoglycemic, hypolipidemic, prebiotic, and immune-stimulatory effect. *Carbohydrate Polymers*, 266, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118134>
- Molon, M., Woznicka, O., & Zebrowski, J. (2018). Cell wall biosynthesis impairment affects the budding lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Biogerontology*, 19(1), 67–79. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9740-6>
- Motilva, M. J., Serra, A., Borrás, X., Romero, M. P., Domínguez, A., Labrador, A., & Peiró, L. (2014). Adaptation of the standard enzymatic protocol (Megazyme method) to microplaque format for β -(1,3)(1,4)-d-glucan determination in cereal based samples with a wide range of β -glucan content. *Journal of Cereal Science*, 59(2), 224–227. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.01.007>
- Murphy, E. J., Masterson, C., Rezoagli, E., O'Toole, D., Major, I., Stack, G. D., Lynch, M., Laffey, J. G., & Rowan, N. J. (2020). β -Glucan extracts from the same edible shiitake mushroom *Lentinus edodes* produce differential in-vitro immunomodulatory and pulmonary cytoprotective effects — Implications for coronavirus disease (COVID-19) immunotherapies. *Science of The Total Environment*, 732, 139330. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139330>
- Nogami, S., & Ohya, Y. (2009). Biosynthetic enzymes for (1-3)- glucans, (1-3;1-6)- glucans from yeasts: biochemical properties and molecular biology. *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*, 1, 259–282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373971-1.00020-0>

- Ogutu, F. O., & Mu, T. H. (2017). Ultrasonic degradation of sweet potato pectin and its antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.08.014>
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, 192(3), 775–818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Özcan, Ö., & Ertan, F. (2018). Beta-glucan content, antioxidant and antimicrobial activities of some edible mushroom species. *Food Science and Technology*, 6(2), 47–55. <https://doi.org/10.13189/fst.2018.060201>
- Pinto, M., Coelho, E., Nunes, A., Brandão, T., & Coimbra, M. A. (2015). Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. *Carbohydrate Polymers*, 116, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.010>
- Postulkova, H., Chamradova, I., Pavlinak, D., Humpa, O., Jancar, J., & Vojtova, L. (2017). Study of effects and conditions on the solubility of natural polysaccharide gum karaya. *Food Hydrocolloids*, 67, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.011>
- Preece, K. E., Hooshyar, N., Krijgsman, A. J., Fryer, P. J., & Zuidam, N. J. (2017). Pilot-scale ultrasound-assisted extraction of protein from soybean processing materials shows it is not recommended for industrial usage. *Journal of Food Engineering*, 206, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.002>
- Puligundla, P., Mok, C., & Park, S. (2020). Advances in the valorization of spent brewer's yeast. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 62, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102350>
- Rachwał, K., Waśko, A., Gustaw, K., & Polak-Berecka, M. (2020). Utilization of brewery wastes in food industry. *PeerJ*, 8, 1–28. <https://doi.org/10.7717/peerj.9427>

- Rahman, M. M., & Lamsal, B. P. (2021). Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 20, Issue 2, pp. 1457–1480). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12709>
- Rodrigues Philippini, R., Martiniano, S. E., César, J., Santos, D., Silvério Da Silva, S., & Chandel, A. K. (2020). Fermentative production of beta-glucan: properties and potential applications. *Bioprocessing for Biomolecules Production*, 303–320. <https://doi.org/10.1002/9781119434436>
- Ruiz-Herrera, J., & Ortiz-Castellanos, L. (2019). Cell wall glucans of fungi. A review. *Cell Surface*, 5, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100022>
- Shen, S., Zhou, C., Zeng, Y., Zhang, H., Hossen, M. A., Dai, J., Li, S., Qin, W., & Liu, Y. (2022). Structures, physicochemical and bioactive properties of polysaccharides extracted from *Panax notoginseng* using ultrasonic/microwave-assisted extraction. *LWT*, 154, 112446. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112446>
- Song, E. H., Shang, J., & Ratner, D. M. (2012). Polysaccharides. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, 9, 137–155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00246-6>
- Soro, A. B., Oliveira, M., O'Donnell, C. P., & Tiwari, B. K. (2021). Ultrasound assisted modulation of yeast growth and inactivation kinetics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 80, 105819. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105819>
- Stewart, G. G. (2014). *Saccharomyces: Saccharomyces cerevisiae*. *Encyclopedia of Food Microbiology: 2nd Edition*, 309–315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5>
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., & Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, 199, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>

- Taherzadeh, M., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, *9*(9), 1621–1651. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Tang, W., Lin, L., Xie, J., Wang, Z., Wang, H., Dong, Y., Shen, M., & Xie, M. (2016). Effect of ultrasonic treatment on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.078>
- Teparić, R., Lozančić, M., & Mrša, V. (2020). Evolutionary overview of molecular interactions and enzymatic activities in the yeast cell walls. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*, 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21238996>
- Tian, X., Yang, P., & Jiang, W. (2019). Effect of Alkali Treatment Combined with High Pressure on Extraction Efficiency of β -d-Glucan from Spent Brewer's Yeast. *Waste and Biomass Valorization*, *10*(5), 1131–1140. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0130-8>
- Vetvicka, V., Vannucci, L., Sima, P., & Richter, J. (2019). Beta glucan: supplement or drug? from laboratory to clinical trials. *Molecules*, *24*, 2–17. <https://doi.org/10.3390/molecules24071251>
- Wang, D., Yan, L., Ma, X., Wang, W., Zou, M., Zhong, J., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2018). Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, *119*, 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.133>
- Wang, J., Li, M., Zheng, F., Niu, C., Liu, C., Li, Q., & Sun, J. (2018). Cell wall polysaccharides: before and after autolysis of brewer's yeast. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 34, Issue 9, pp. 1–8). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2508-6>
- Wang, J., Mao, J., Yang, G., Zheng, F., Niu, C., Li, Y., Liu, C., & Li, Q. (2018). The FKS family genes cause changes in cell wall morphology resulted in regulation

- of anti-autolytic ability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 249, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.113>
- Xu, J., Hou, H., Hu, J., & Liu, B. (2018). Optimized microwave extraction, characterization and antioxidant capacity of biological polysaccharides from *Eucommia ulmoides* Oliver leaf. *Scientific Reports*, 8(1), 12–35. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24957-0>
- Yan, J. K., Wang, Y. Y., Ma, H. le, & Wang, Z. bin. (2016). Ultrasonic effects on the degradation kinetics, preliminary characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Phellinus linteus* mycelia. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.10.005>
- Yao, Y., Zhu, Y., Gao, Y., & Ren, G. (2015). Effect of ultrasonic treatment on immunological activities of polysaccharides from adlay. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.033>
- Yesmin, S., Paul, A., Naz, T., Rahman, A. B. M. A., Akhter, S. F., Wahed, M. I. I., Emran, T. Bin, & Siddiqui, S. A. (2020). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (*Piper chaba*). *Clinical Phytoscience*, 6(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00207-7>
- Yuan, D., Li, C., Huang, Q., & Fu, X. (2020). Ultrasonic degradation effects on the physicochemical, rheological and antioxidant properties of polysaccharide from *Sargassum pallidum*. *Carbohydrate Polymers*, 239, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116230>
- Yuan, H., He, Y., Zhang, H., & Ma, X. (2022). Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of yeast β -glucan catalyzed by β -glucanase: Chemical and microstructural analysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 86, 106012. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106012>
- Yuan, H., Lan, P., He, Y., Li, C., & Ma, X. (2020). Effect of the modifications on the physicochemical and biological properties of β -glucan—a critical review. In

- Zhang, L., Jin, Y., Xie, Y., Wu, X., & Wu, T. (2014). Releasing polysaccharide and protein from yeast cells by ultrasound: Selectivity and effects of processing parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2), 576–581. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.10.016>
- Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y., & Liu, D. (2013). Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.021>
- Zheng, Z., Huang, Q., Luo, X., Xiao, Y., Cai, W., & Ma, H. (2019). Effects and mechanisms of ultrasound- and alkali-assisted enzymolysis on production of water-soluble yeast beta-glucan. *Bioresource Technology*, 273, 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.035>
- Zhou, X., He, J., Wang, L., Wang, Y., Du, G., & Kang, Z. (2019). Metabolic engineering of *saccharomyces cerevisiae* to improve glucan biosynthesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 758–764. <https://doi.org/10.4014/jmb.1812.12049>
- Zhu, Z. Y., Pang, W., Li, Y. Y., Ge, X. R., Chen, L. J., Liu, X. C., Lv, Q., Dong, G. L., Liu, A. J., & Zhang, Y. (2014). Effect of ultrasonic treatment on structure and antitumor activity of mycelial polysaccharides from *Cordyceps gunnii*. *Carbohydrate Polymers*, 114, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.068>

ANEXO 1

Ensayo de estabilidad de membrana reactiva.

Fecha de aplicación:

Folio:

Iniciales (Nombre sujeto):

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química
“Carta consentimiento para participar en un proyecto de investigación”

Título del protocolo:

“Extracción de β -glucanos a partir de levadura agotada de cerveza por vía enzimática asistida por ultrasonido y microondas y evaluación de sus propiedades funcionales”

Investigador principal: Dr. Carlos Regalado González

Sede donde se realizará el estudio: Posgrado de alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

INVITACIÓN

Se le está invitando a usted a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como **consentimiento informado**. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los β -glucanos pueden presentar actividades biológicas como lo es la actividad antiinflamatoria dada su naturaleza química. El ensayo de estabilidad de membrana reactiva comprueba si existe actividad antiinflamatoria de la muestra comparándola contra un fármaco existente en el mercado.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Evaluar la capacidad antiinflamatoria de los β -glucanos extraídos por tratamiento enzimático asistido por ultrasonido y tratamiento enzimático asistido por microondas.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Este estudio permitirá tener evidencia científica que sustente el uso de los β -glucanos como ingrediente funcional para ayudar en los procesos antiinflamatorios.

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio usted seguirá el siguiente procedimiento:

El estudio consta de una toma de muestra sanguínea realizada por personal capacitado.

El tiempo aproximado de duración es de 5 a 10 min para la toma de muestra.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

La toma de muestra es un procedimiento rutinario que no representa riesgo para la salud, sin embargo, pueden presentarse molestias tales como: mareos, moretones, desmayos, disminución de presión arterial, por lo cual si se requiere

atención médica esta podrá ser proporcionada por personal del módulo de atención médica “Su salud” de la UAQ.

6. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador corresponsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada participante, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores. Esta información es de carácter confidencial. La UAQ solo proporcionará información que no lo identificará personalmente.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. INFORMACIÓN DE CONTACTO

Si tiene alguna pregunta acerca de su participación o desea la opinión de otra persona fuera del estudio, usted puede consultar al médico de su confianza.

8. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante

Fecha de la firma

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha

9. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Título del protocolo:

Investigador principal:

Sede donde se realizará el estudio:

Nombre del participante:

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Opcional)

Nombre del participante

Firma del participante o del padre o tutor

Fecha de la firma

INVITACIÓN

A los interesados se les hace una cordial invitación para participar en el estudio de investigación titulado:

“Extracción de β -glucanos a partir de levadura agotada de cerveza por vía enzimática asistida por ultrasonido y microondas y evaluación de sus propiedades funcionales”

Para lo cual se les pide una toma de muestra sanguínea, la cual será tomada por parte del personal de análisis clínicos de la UAQ quienes están capacitados para tal actividad.

Los requisitos serán los siguientes:

Hombre/mujer indiferente

Mayor a 20 años y menor a 30

Estado de ayuno

No haber consumido ningún fármaco antiinflamatorio durante las dos semanas antes de la toma de muestra.

Todos los datos obtenidos serán usados con fines de investigación y se manejarán de manera confidencial.

La toma de muestra es un procedimiento rutinario que no representa riesgo para su salud.