

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI

POSGRADO



MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Optimización de las condiciones de cultivo de la levadura *Wickerhamomyces anomalus* para la producción de β -glucanos y su utilización en el desarrollo de un yogur funcional.

Trabajo de titulación previa la obtención del
Título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Autora: Navarrete Pastás María Augusta

Tutor: MSc. Anchundia Miguel

Tulcán, 2024

CERTIFICADO DEL TUTOR

Certifico que el maestrante Navarrete Pastás María Augusta con el número de cédula 0402102362 ha elaborado el trabajo de titulación: “Optimización de las condiciones de cultivo de la levadura *Wickerhamomyces anomalus* para la producción de β -glucanos y su utilización en el desarrollo de un yogur funcional”.

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en la Codificación del reglamento de Régimen Académico y de estudiantes de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi con RESOLUCIÓN N° 171-CSUP- 2023, por lo tanto, autorizo su presentación para la sustentación respectiva.



.....

MSc. Anchundia Miguel

TUTOR

Tulcán, septiembre del 2024

AUTORÍA DE TRABAJO

El presente trabajo de titulación constituye un requisito previo para la obtención del título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Yo, Navarrete Pastás María Augusta con cédula de identidad número 0402102362 declaro: que la investigación es absolutamente original, auténtica, personal y los resultados y conclusiones a los que he llegado son de mi absoluta responsabilidad.

Ma. Augusta Navarrete.

.....

Navarrete Pastás María Augusta

AUTORA

Tulcán, septiembre del 2024

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Navarrete Pastás María Augusta declaro ser autora de los criterios emitidos en el trabajo de titulación: “Optimización de las condiciones de cultivo de la levadura *Wickerhamomyces anomalus* para la producción de β -glucanos y su utilización en el desarrollo de un yogur funcional” y eximo expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Ma. Augusta Navarrete.

.....

Navarrete Pastás María Augusta

AUTORA

Tulcán, septiembre del 2024

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, en especial al Centro de Posgrado y sus directivos, por acogerme en su casona del saber y cultivar en mí un amor por la ciencia, investigación y desarrollo.

A mi tutor MSc. Miguel Ángel Anchundia, a quién admiro por su excelente trabajo profesional y por su calidad humana. Esta investigación es un ejemplo de trabajo en equipo, y en el camino surgió una admiración y agradecimiento eterno, porque gracias a su invaluable orientación, paciencia y apoyo durante todo el proceso de este proyecto pude culminar con éxito mi trabajo de investigación.

Agradezco a todos los profesores y compañeros de la Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, por sus enseñanzas, experiencias y contribuciones a mi carrera profesional.

Mi gratitud se extiende a mi familia, padres y hermano, por su amor, apoyo y comprensión.

DEDICATORIA

A mis padres, Augusto Saúl y Ximena del Rocío, su amor ha sido incondicional, leal y protector y gracias a ello, nuestros sueños se convierten en realidad.

A mi hermano, David Francisco, por su hermandad, por ser mi refugio y mi inspiración.

A mis tíos y padrinos, Rosa Elvira Navarrete y Armando Pineda Orbe; por ser una fuente de sabiduría, donde mi corazón y alma han encontrado la seguridad en mis decisiones.

| | | |
|--------------------|--|----|
| 2.2.9.1. | Condiciones de Calidad del yogur. | 30 |
| 2.2.10. | Alimentos funcionales con actividad antioxidante. | 30 |
| 2.2.11. | Determinación de la actividad antioxidante por DPHH. | 31 |
| 2.3. | Marco Legal..... | 31 |
| CAPÍTULO III | | 33 |
| METODOLOGÍA..... | | 33 |
| 3.1. | Descripción del área de estudio/Grupo de estudio..... | 33 |
| 3.2. | Enfoque y tipo de investigación..... | 33 |
| 3.2.1. | Enfoque..... | 34 |
| 3.2.2. | Tipo de Investigación | 34 |
| 3.3. | Definición y operacionalización de variables | 34 |
| 3.3.1. | Definición de variables | 34 |
| 3.3.2. | Operacionalización de variables | 36 |
| 3.4. | Procedimientos..... | 38 |
| 3.4.1. | FASE 1. Optimización de producción de β -glucanos | 38 |
| 3.4.1.1. | Diseño del medio de cultivo..... | 38 |
| 3.4.1.2. | Diseño experimental Plackett Burman..... | 39 |
| 3.4.1.3. | Experimento del ascenso más pronunciado | 39 |
| 3.4.1.4. | Diseño Central Compuesto – Optimización de superficie de respuesta. | 40 |
| 3.4.1.5. | Extracción de β glucanos. | 40 |
| 3.4.1.6. | Determinación del % de β -glucanos. | 40 |
| 3.4.2. | FASE 2. Elaboración del yogur funcional..... | 41 |
| 3.4.2.1. | Formulación del yogur. | 41 |
| 3.4.2.2. | Diagrama del proceso..... | 41 |
| 3.4.2.3. | Prueba sensorial de escala hedónica..... | 42 |
| 3.4.2.4. | Análisis microbiológico | 43 |
| 3.4.2.5. | Análisis físicoquímicos. | 43 |

| | | |
|--------------------------------|--|----|
| 3.4.2.6. | Composición Nutricional | 45 |
| 3.4.2.7. | Actividad Antioxidante | 46 |
| 3.4.2.8. | Análisis Estadístico. | 46 |
| CAPÍTULO IV | | 47 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 47 |
| 4.1. | FASE 1. Optimización de producción de β -glucanos..... | 47 |
| 4.1.1. | Diseño experimental Plackett Burman | 47 |
| 4.1.2. | Diseño del ascenso más pronunciado | 50 |
| 4.1.3. | Diseño Central Compuesto – Optimización de superficie de respuesta... 51 | |
| 4.2. | FASE 2. Elaboración del yogur funcional. | 54 |
| 4.2.1. | Prueba sensorial de escala hedónica..... | 54 |
| 4.2.2. | Análisis Microbiológicos..... | 56 |
| 4.2.3. | Análisis físicoquímico..... | 57 |
| 4.2.4. | Análisis nutricionales. | 58 |
| 4.2.5. | Actividad Antioxidante. | 60 |
| CAPÍTULO V | | 62 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | | 62 |
| 5.1. | Conclusiones..... | 62 |
| 5.2. | Recomendaciones. | 63 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 64 |
| ANEXOS | | 74 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Operacionalización de Variables | 36 |
| Tabla 2. <i>Matriz del diseño experimental Plackett Burman.</i> | 39 |
| Tabla 3. <i>Formulación del yogur líquido con β-glucano.</i> | 41 |
| Tabla 4. <i>Valores más alto de producción de β-glucanos obtenidos en los experimentos del diseño Plackett-Burman.</i> | 48 |
| Tabla 5. <i>Análisis de ANOVA para el diseño experimental Plackett-Burman del tratamiento con Cloruro de Amonio.</i> | 49 |
| Tabla 6. <i>Diseño experimental del ascenso más pronunciado y sus valores de producción de β-glucanos correspondientes. Las variables constantes fueron: pH (4,5), temperatura (27,5 °C) y tiempo (6 días).</i> | 50 |
| Tabla 7. <i>Diseño central compuesto y sus valores de producción de β-glucanos correspondientes. Las variables constantes fueron: pH (4,5), temperatura (27,5 °C) y tiempo (6 días).</i> | 52 |
| Tabla 8. <i>Análisis de ANOVA para el Diseño Central Compuesto – Optimización de Superficie de Respuesta.</i> | 52 |
| Tabla 9. <i>Resultado de la Prueba de Kruskal – Wallis del Análisis de Evaluación Sensorial.</i> | 55 |
| Tabla 10. <i>Análisis microbiológico del tratamiento T3 (1,5 de β-glucano).</i> | 56 |
| Tabla 11. <i>Análisis físicos químicos del yogur natural (YN), yogur con fruta (YF) y del tratamiento T3 (1,5 de β-glucano).</i> | 57 |
| Tabla 12. <i>Análisis nutricionales del yogur natural (YN), yogur con fruta (YF) y del tratamiento T3 (1,5 de β-glucano).</i> | 59 |
| Tabla 13. <i>Capacidad antioxidante de los 3 distintos tratamientos, yogur natural (YN), yogur con fruta (YF) y del tratamiento T3 (1,5 de β-glucano).</i> | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Ubicación de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi..... | 33 |
| Figura 2 Instalaciones de los laboratorios de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi. | 33 |
| Figura 3 Imagen del diseño de los medios de cultivo. | 38 |
| Figura 4 Diagrama del proceso para la elaboración del yogur. | 42 |
| Figura 5 Gráficos de superficie de respuesta tridimensional para la influencia de concertación de bagazo y cloruro de amonio en la producción de β -glucanos. | 53 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo A Norma técnica Ecuatoriana 2395 | 74 |
| Anexo B Ficha de Evaluación Sensorial. | 75 |
| Anexo C. Preparación del bagazo residual. | 76 |
| Anexo D Crecimiento de la levadura en los medios de cultivo con bagazo de caña de azúcar..... | 78 |
| Anexo E Beta glucano extraído y listo para añadirlo al yogur. | 79 |
| Anexo F. Yogur Natural base. | 80 |
| Anexo G. Análisis Sensorial de la Muestra. | 81 |
| Anexo H Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para Color por Tratamiento..... | 82 |
| Anexo I Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para Olor por Tratamiento..... | 83 |
| Anexo J Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para Sabor por Tratamiento | 84 |
| Anexo K. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para Viscosidad por Tratamiento. | 85 |
| Anexo L Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para Aceptación Global por Tratamiento..... | 86 |

RESUMEN

La producción de β -glucanos a partir de recursos residuales es una tendencia creciente en temas de sostenibilidad. El β -glucano extraído de levaduras posee propiedades bioactivas que pueden ser usadas en la industria de alimentos, específicamente en el desarrollo de alimentos funcionales. El objetivo de la investigación fue optimizar las condiciones de cultivo de la levadura *Wickerhamomyces anomalus* para la producción de β -glucanos y utilizarlo en el desarrollo de un yogur funcional con actividad antioxidante. Se probaron 3 fuentes de nitrógeno: extracto de levadura, cloruro de amonio y urea en el medio de cultivo. Se optimizaron por superficie de respuesta las condiciones de cultivo para mejorar la producción de β -glucanos. Los β -glucanos extraídos fueron usados en la formulación de un yogur funcional, al cual se le realizaron pruebas sensoriales, análisis microbiológicos, nutricionales, físicoquímicos y actividad antioxidante. La fuente de nitrógeno con mayor producción de β -glucanos (170,02 g/100 g de biomasa) fue el cloruro de amonio y el nivel óptimo para la mayor producción de β -glucanos, fue de 84,05 g/100 g biomasa, usando 12 g/L de bagazo y de 7,41 g/L de cloruro de amonio. De acuerdo a la evaluación sensorial se determinó que el T3 (1,5 β -glucanos) fue el tratamiento con mayor aceptación en los parámetros de sabor y aceptabilidad general. En los análisis microbiológicos, físico químicos y nutricionales, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de yogures YN (Yogur Natural), YF (Yogur con Fruta) y T3 (1,5 de β -glucanos). Finalmente, el T3 (1,5 de β -glucano) presentó la mayor actividad eliminadora de radicales DPPH con un 75,88 %, la cual fue significativamente mayor en los tratamientos YF (64,85%) y YN (49,11%), evidenciando que existe una actividad sinérgica entre los β -glucanos más la fruta en el yogur, por lo que la actividad captadora de radicales DPPH, aumentó al agregar los β -glucanos.

Palabras claves.

β -glucanos, bagazo residual, Optimización por superficie de respuesta, yogur funcional, actividad antioxidante.

ABSTRACT

The production of β -glucans from residual resources is a growing trend in sustainability issues. β -glucan extracted from yeast has bioactive properties that can be used in the food industry, specifically in the development of functional foods. The objective of the research was to optimize the culture conditions of the yeast *Wickerhamomyces anomalus* for the production of β -glucans and use it in the development of a functional yogurt with antioxidant activity. 3 nitrogen sources were tested: yeast extract, ammonium chloride and urea in the culture medium. Response surface culture conditions were optimized to improve β -glucan production. The extracted β -glucans were used in the formulation of a functional yogurt, to which sensory tests, microbiological, nutritional, physicochemical and antioxidant activity analyzes were carried out. The nitrogen source with the highest production of β -glucans (170.02 g/100 g biomass) was ammonium chloride and the optimal level for the highest production of β -glucans was 84.05 g/100 g biomass. , using 12 g/L of bagasse and 7.41 g/L of ammonium chloride. According to the sensory evaluation, it was determined that T3 (1.5 β -glucans) was the treatment with the greatest acceptance in the parameters of flavor and general acceptability. In the microbiological, physical, chemical and nutritional analyses, no significant differences were found between the YN (Natural Yogurt), YF (Yogurt with Fruit) and T3 (1.5 β -glucan) yogurt treatments. Finally, T3 (1.5 β -glucan) presented the highest DPPH radical scavenging activity with 75.88%, which was significantly higher in the YF (64.85%) and YN (49.11%) treatments, showing that there is a synergistic activity between the β -glucans plus the fruit in the yogurt, so the DPPH radical scavenger activity increased when adding the β -glucans.

Keywords.

β -glucans, residual bagasse, response surface optimization, functional yogurt, antioxidant activity.

CAPÍTULO I

PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Actualmente, los residuos agroindustriales son un problema común en la mayoría de las plantas de procesamiento de alimentos, por lo que, es necesario buscar una reutilización viable, para el desarrollo de alimentos nutritivos que no generen un impacto ambiental (Morales, 2023), Genny *et al.* (2021) hacen énfasis en usar los residuos agroindustriales, con el fin de generar una economía circular, es decir, optimizar los procesos y materiales de una procesadora de alimentos para que los residuos de esta puedan convertirse en la materia prima de otra.

En Ecuador, el sector azucarero ha tenido una gran trascendencia en la economía del país. Según el Banco Central del Ecuador hasta el año 2020 el sector de elaboración y refinación de azúcar registró \$124,45 MM de valor agregado bruto, por lo que contribuye con el 0,19% al PIB nacional (Corporacion Financiera Nacional, 2021). Las provincias con mayor número de empresas dedicadas a la manufactura de azúcar son Guayas con el 60%, Tungurahua con el 20% y Cañar e Imbabura con el 10% (Banco Central del Ecuador, 2022). Por lo que, el incremento del sector azucarero es directamente proporcional al incremento de desechos provenientes de dicha industria.

Mostacilla y Sandino (2013) indican que el proceso de producción de azúcar genera residuos que se los agrupa por su estado, tales como, en estado sólido: ceniza, bagazo y cachaza, en estado líquido: melaza, aguas del proceso de azúcar y agua de lavado en el ingenio y finalmente en estado gaseoso, como óxido de nitrógeno y dióxido de azufre. Estos residuos se producen en grandes cantidades provocando graves problemas de contaminación, ya que afectan a las comunidades aledañas a los ingenios azucareros, a los mantos acuíferos e incrementan la contaminación al medio ambiente (García Ramos *et al.*, 2022).

El bagazo es uno de los residuos más generados en el procesamiento de la caña de azúcar ya que se producen 0,14 toneladas (Tn) de bagazo por cada Tn de caña procesada (Melati *et al.*, 2017). En el Ecuador el bagazo de caña de azúcar ha sido investigado como una fuente de carbono renovable de bajo costo que se utiliza principalmente para la generación de bioenergía o es usado como generador de vapor en ingenios azucareros y destilerías (Alvarado, 2021). Sin embargo, no existen investigaciones del uso del bagazo como medio de cultivo para la producción biotecnológica de biomoléculas como el β -glucano.

La producción y uso excesivos de ciertos residuos peligrosos dentro de los sectores químico-industriales han generado una creciente preocupación pública por su notorio impacto en la salud y el bienestar ambiental. Por lo tanto, el mercado de productos naturales sostenibles a través de una ruta más verde ha llamado enormemente la atención de los productores y consumidores en la última década (Newman y Cragg, 2020). Una de estas rutas verdes es la producción biotecnológica de β -glucanos, que como cualquier producto fermentativo, depende del microorganismo utilizado y de las condiciones de cultivo, por lo que es necesario optimizar el crecimiento de la levadura en el medio residual del bagazo para obtener la mayor cantidad de β -glucanos.

Actualmente, entre los consumidores existe una creciente preocupación sobre el impacto de la composición de la dieta en la salud, por lo que se ha fomentado a la industria alimentaria a diseñar alimentos funcionales que aporten los nutrientes esenciales, además de componentes con efectos benéficos sobre las funciones fisiológicas, como los prebióticos, probióticos, péptidos bioactivos, carotenoides, antioxidantes, entre otros (Sushytskyi *et al.*, 2023).

Entre las tendencias de consumo de alimentos funcionales, se encuentran los productos que tienen actividad funcional antioxidante, ya que los consumidores desean proteger las células de su cuerpo del daño causado por los radicales libres. Si los radicales libres saturan la capacidad del cuerpo para regularlos, se produce una condición conocida como estrés oxidativo, donde se alteran negativamente los lípidos, proteínas y el ADN desencadenando una serie de enfermedades humanas (Lobo *et al.*, 2010). Algunos de estos radicales libres se producen durante los procesos normales del cuerpo, como respirar, hacer ejercicio y digerir los alimentos. Además de que existen factores externos como el estrés diario, el humo del cigarrillo y los contaminantes en el aire, el agua y los alimentos. Por lo que una dieta rica en antioxidantes ayuda a mantener un equilibrio entre

los radicales libres y los antioxidantes y así mantener una función fisiológica adecuada (HealthLink BC, 2023).

Por lo antes expuesto, es importante investigar el uso del bagazo residual como fuente de carbono para el crecimiento de levaduras y optimizar las condiciones del cultivo para la mayor producción de β -glucanos; los mismos que serán utilizados en el diseño de un yogur funcional que cumpla con la demanda de los consumidores por alimentos funcionales con actividad antioxidante.

1.2. Preguntas de Investigación.

1. ¿Cuáles son las condiciones óptimas de crecimiento de la levadura *Wickerhamomyces anomalus* para la obtención de mayor cantidad de β -glucanos?
2. ¿Cuál es la formulación del yogur funcional con β -glucanos con mayor aceptabilidad sensorial?
3. ¿Existe capacidad antioxidante en la formulación del yogur funcional con mayor aceptabilidad sensorial?

1.3. Objetivos de investigación

1.3.1. Objetivo General

Optimizar las condiciones de cultivo de la levadura *Wickerhamomyces anomalus* para la producción de β -glucanos y utilizarlo en el desarrollo de un yogur funcional.

1.3.2. Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones óptimas de crecimiento de la levadura *Wickerhamomyces anomalus* para obtener la mayor producción de β -glucanos.
2. Formular un yogur funcional a diferentes concentraciones de β -glucanos extraídos.
3. Analizar los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos, sensoriales y la actividad antioxidante de la mejor formulación.

1.4. Justificación

La reutilización de los residuos de la industria azucarera pretende promover una economía circular por medio de un uso útil e innovador para la industria de alimentos, que a su vez

aproveche y reduzca los desperdicios agroindustriales (Genny *et al.*, 2021). Estos residuos se caracterizan por ser una fuente de alto contenido de carbono, de tal manera que sí se usan como sustrato para el crecimiento de las levaduras, las cuales tengan los suficientes nutrientes para su crecimiento, obteniendo una mayor cantidad de levaduras y por ende una mayor cantidad de producción de β -glucanos (Rizal *et al.*, 2020).

El bagazo de caña de azúcar es una fuente de carbono renovable de bajo costo que puede ser utilizada para la producción de β -glucanos, ya que poseen una gran cantidad de carbohidratos, por lo que representa una fuente de carbono sostenible para la producción microbiana de β -glucanos (Chandel *et al.*, 2020). La producción biotecnológica de β -glucano es una alternativa potencial gracias a que es una ruta sostenible, se obtiene un alto grado de pureza, es una producción eficiente y de rápido crecimiento microbiano (Żbikowska *et al.*, 2020).

Los β -glucanos son polímeros bioactivos que se encuentran ampliamente en plantas como cebada y avena y en microorganismos como en bacterias, hongos y levaduras. Los β -glucanos extraídos de levaduras han presentado actividad antioxidante, antimicrobiano, criopreservantes y fijación de grasa (Morales, 2023). Por lo que los β -glucanos extraídos de levaduras tienen propiedades bioactivas de importancia (Zheng *et al.*, 2022).

Optimizar las condiciones de cultivo de la levadura, es esencial en la producción de cualquier metabolito microbiano. En este caso, se pretende realizar la optimización con el fin de obtener mayor producción del compuesto bioactivo β -glucano y así mejorar el rendimiento del polisacárido, ya que varía enormemente entre la optimización previa y posterior (Mahapatra y Banerjee, 2013).

Las levaduras son consideradas como una fuente de β -glucanos bioactivos que tienen la capacidad de retrasar, impedir o eliminar el daño oxidativo en las células humanas (HealthLink BC, 2023). Los antioxidantes protegen las células del cuerpo del daño causado por los radicales libres ya que inhiben significativamente la acción dañina y lesiones al ADN, así como también, la peroxidación lipídica en liposomas inducida por radicales hidroxilo y eliminan los radicales libres (Mo *et al.*, 2017).

Actualmente, gracias a la excelente bioactividad de los β -glucanos se han utilizado en distintas áreas, como medicina, alimentos, cosméticos y suplementos alimenticios (Zhang *et al.*, 2023). Usar los β -glucanos extraídos de las levaduras en el diseño de un alimento

funcional permite cumplir con la demanda creciente de la población por consumir alimentos de valor nutritivo y promover una economía circular aprovechando los desechos agroindustriales de la industria azucarera.

En el Ecuador, el consumo de productos lácteos aumento después de la emergencia sanitaria del COVID del año 2020. Las principales industrias lácteas del país, apuntan a un incremento del 16% al 17% del consumo de leche líquida y sus derivados (El Universo, 2020). Según Domínguez, (2019); del 100% de la producción de leche, el 25% se destina a la producción de derivados lácticos entre ellos el yogur. En el país, el consumo del yogur se ha incrementado, gracias a que es considerado como un producto de primera necesidad para las familias (Lideres, 2020); con especial enfoque en los niños, ya que les ayuda a tener un crecimiento sano y lleno de nutrientes (Marciel, 2015).

Este tema de investigación contribuye a los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) de la agenda 2030 de la UNESCO, específicamente al objetivo 12 “Producción y consumo responsable”, ya que se promueve la reutilización de recursos en lugar de desecharlos, fomentando una economía circular. Con el fin de promover una producción y consumo sostenibles, es decir, que utilicen eficientemente los recursos, minimicen los residuos, y reduzcan los impactos ambientales negativos a lo largo del ciclo de vida de los productos (UNESCO IESALC, 2023).

De la misma manera, el trabajo de titulación se alinea con la línea de investigación de Agroindustrias y Producción Sostenible de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi (UPEC), ya que se pretende desarrollar un producto innovador (yogur funcional), el cual encaja con el enfoque de la UPEC en agregar valor a los productos alimentarios mediante la innovación en procesos y productos agroindustriales. Por medio de una producción sostenible y tecnologías limpias, ya que el uso de levaduras para la producción de compuestos bioactivos, se considera parte de la investigación de biotecnología aplicada a la agroindustria, la cual busca optimizar las condiciones de cultivo y promover prácticas más limpias y eficientes.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. Antecedentes de la investigación

Los residuos agroindustriales son generados en altas cantidades provocando contaminación al medio ambiente y a las aguas residuales, por lo que supera la capacidad de regeneración natural del medio ambiente. Con el fin de solventar esta problemática, Avramia y Amariei (2021) en su revisión describieron el proceso de obtención de β -glucanos insolubles a partir de residuos de levadura de la industria y proporcionaron una idea de cómo un subproducto de la elaboración de cerveza podía ser usado en la industria alimentaria. Ellos determinaron que los β -glucanos provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* eran usados como sustitutos de grasa en mayonesa, por sus propiedades de pegado sobre harina de trigo y almidón, capacidad gelificante, actividad prebiótica, actividad antioxidante y finalmente como agente espesante y emulsificante. Concluyendo que el subproducto de la elaboración de cerveza, es decir la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tiene una composición química que es utilizada y aprovechada en la industria de alimentos.

Varelas *et al.* (2016), usaron por primera vez la biomasa de levadura para la producción de β -glucanos con el fin de elaborar alimentos con valor añadido como parte de la industria vitivinícola integral y sostenible. Para el aislamiento de β -glucanos a partir de lías de vino, primero se realizó una lisis de las levaduras a 55°C, pH 5,0 y 48 h con ácido acético, después se realizó la extracción alcalina con NaOH. Como resultado se obtuvo que la fracción más pura de β -glucano y con mayor rendimiento de lías de vino fue cuando se usó NaOH a 2 M, 0,5 h y 90°C, muestra 1:5 concentración de NaOH. Concluyendo que las lías de desecho de levaduras constituyen una forma innovadora de producción de β -glucanos, los mismos que pueden tener aplicaciones en la creación de nuevos

nuevos productos de β -glucanos con polifenoles del vino e incorporarlo en alimentos funcionales.

La optimización es esencial en la producción de cualquier metabolito microbiano, ya que se obtiene mayor cantidad del compuesto y se mejora el rendimiento del producto. Un ejemplo de lo mencionado se observa en la investigación realizada por Mahapatra y Banerjee (2013) quienes investigaron la optimización de la producción de exopolisacáridos a partir de un hongo filamentoso *Fusarium solani* SD5, con el objetivo de mejorar la producción de exopolisacáridos. En cuanto a la optimización se empleó el método de una variable a la vez y la metodología de la superficie de respuesta para encontrar las condiciones óptimas del medio de crecimiento y de fermentación. Como resultado se obtuvo que el organismo produjo el máximo de exopolisacáridos después de 13,68 días de incubación a 28°C en caldo de papa dextrosa suplementado con (% g/l) 9,8 glucosa; 0,69 de extracto de levadura, 0,05 de KCl; 0,05 de KH_2PO_4 y a un pH de 6,46. Cuando se usó 50 ml de medio en un matraz Erlenmeyer de 250 ml se dio la máxima producción de exopolisacáridos. El organismo produjo más del doble de exopolisacáridos en condiciones óptimas ($2,276 \pm 0,032$ g/l) en comparación con las condiciones preoptimizadas ($0,96 \pm 0,021$ g/l). Por lo que se concluye que este tipo de investigaciones son necesarias para la producción de exopolisacáridos en biorreactores a gran escala destinados a su industrialización ya sea para las industrias farmacéuticas o alimentarias.

La investigación realizada por Atta-Allah *et al.* (2023) tuvo como objetivo evaluar un modelo estadístico para mejorar la producción microbiana de β -glucanos a partir de recursos de desechos. Teniendo en cuenta el objetivo, el presente estudio fue llevado a cabo para la mayor obtención de β -glucanos a partir del microorganismo *Kluyveromyces lactis* cultivado sobre residuos de frutas, verduras y suero; un subproducto de la fabricación de queso. También se optimizó el proceso de producción mediante la metodología de superficie de respuesta. Se obtuvo que las concentraciones de minerales y vitaminas influyeron significativamente en el rendimiento de β -glucano para *Kluyveromyces lactis*. El rendimiento máximo de β -glucano recuperado de *K. lactis* fue de 407 mg/100 ml. Por lo que se concluye que enriquecer los medios basados en desechos agroindustriales con ingredientes nutricionales mejora el rendimiento de β -glucanos, cumpliendo con la creciente demanda de β -glucanos utilizados en las industrias alimentaria y farmacéutica.

Abdeshahian *et al.* (2020), tuvieron como objetivo producir β -glucanos a partir de fuentes de carbono económicas como las sustancias lignocelulósicas. Utilizaron el bagazo de caña de azúcar para la producción de β -glucano extracelular a partir de *Lasiodiplodia theobromae* CCT3966. Primeramente, el bagazo de azúcar lo sometieron a un pretratamiento ácido y alcalino y posteriormente a una hidrólisis enzimática usando enzima celulasa. Como resultado obtuvieron que se liberó una cantidad de glucosa de 48,65 g/l después de la hidrólisis enzimática con una conversión de celulosa a glucosa del 69,09%. Para la producción del β -glucano, se cultivó la cepa fúngica en el hidrolizado del bagazo de caña de azúcar más la fuente de nitrógeno: extracto de levadura (1g/l) a 28 °C y un pH del cultivo inicial de 7. El mayor rendimiento y productividad de β -glucano fue de 0,047 gg⁻¹, se obtuvo a las 72 h de fermentación. Concluyendo que la producción de β -glucano a partir de hidrolizado fue consistente con el modelo cinético del proceso, por lo que el bagazo de caña de azúcar podría ser una fuente prometedora de obtención de glucosa.

Ascencio *et al.* (2021), investigaron la producción de Lasiodiplodan, un (1→6)- β -d-glucano, el cual es un exopolisacárido con alto valor comercial y muchas aplicaciones en alimentos, por medio de alternativas sostenibles y respetuosas con el medio ambiente. El objetivo de su investigación fue la producción de lasiodiplodan a partir de bagazo de caña de azúcar, un importante residuo agrícola lignocelulósico, por *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966. Para lo cual, usaron como fuente de carbono el bagazo de caña de azúcar hidrolizado, suplementado con salvado de soja o salvado de arroz (fuente de nitrógeno) fue de 16,2 [6,8 × 10³ Da] y 22,0 [7,6 × 10³Da] g/L, respectivamente. Como resultados obtuvieron que Lasiodiplodan mostró alta pureza, baja solubilidad, comportamiento pseudoplástico y estaba compuesto por unidades de glucosa. Concluyendo que este es el primer informe sobre la producción más alta de lasiodiplodan basado en bagazo de caña de azúcar y que *L. theobromae*, es una excelente fábrica de células microbianas ya que demostró el potencial comercial para la producción sostenible de lasiodiplodan a partir de materia prima de biomasa renovable.

Existen investigaciones sobre el uso del β -glucanos como un ingrediente tecnológico, usándolo en la elaboración de alimentos funcionales. Un ejemplo lo contribuye el trabajo de Mah *et al.* (2020), quienes en Estados Unidos investigaron el efecto de β -glucanos extraídos de levaduras en la incorporación en una bebida dietética procesada UHT sobre la aparición y gravedad de las infecciones urinarias y su impacto en el régimen de

entrenamiento de personas sometidas a un ejercicio intenso. El estudio fue aleatorizado y controlado con placebo, los participantes recibieron 250 mL/d de bebida láctea que contenían 25 mg de β -glucanos de levadura dispersable y 0 mg de β -glucanos de levadura (control) durante 91 días. Las personas que completaron el estudio con la bebida de β -glucanos declararon significativamente menos días sintomáticos de infecciones urinarias, ($3,43 \pm 6,44$ días, máximo 27 días) en comparación con los que tomaron la bebida control ($3,84 \pm 6,84$ días, máximo 27 días). Concluyendo que el consumo de bebidas lácteas con β -glucanos de levadura reduce los días con síntomas de infecciones urinarias, la gravedad de los síntomas. De tal manera que los β -glucanos extraídos de levaduras sí tienen actividad funcional en alimentos.

Mejri *et al.* (2014) en Tunisia, investigaron la valorización de la levadura gastada para la extracción de β -glucanos que son usados en la industria alimentaria y farmacéutica. Para lo cual ellos extrajeron los β -glucano y los incorporaron en distintas concentraciones 0, 0,5, 1, 1,5 y 2%, como un sustituto de grasa en yogur sin grasa. Se analizaron las siguientes propiedades fisicoquímicas cinética de acidificación, color, estabilidad física y reológicas de las muestras durante el almacenamiento en refrigeración (28 días). En la extracción se obtuvo el β -glucano con un rendimiento del 13,79% y una pureza en glucosa del 96,50%. Mientras que en la adición del β -glucano en el yogur indicó que tenía una capacidad de unión al agua (117 g/100 g de β -glucano), una capacidad de unión al aceite (54 g/100 g de β -glucano) y capacidad para estabilizar emulsiones (39 % en base húmeda). La aplicación de β -glucano en yogur de leche desnatada mejoró las propiedades reológicas y la estabilidad física del producto en comparación con el yogur control.

La adición del 1,5% fue la mejor proporción con atributos deseables a la de un yogur con toda la grasa. Tenía una cinética de acidificación similar, acidez similar (138 0 D), una capacidad de retención de agua similar (12,48 %), una luminosidad menor ($L^* = 81,93$ frente a 84,41) y valor amarillo ($b^* = 5.03$ versus 6.56), valor rojo similar ($a^* = -4.82$), valores similares de viscosidad y consistencia ($\eta = 1.30$ Pa.s, $k = 10.48$ Pa.sn) y un menor índice de flujo ($n = 0,39$) que el del yogur con toda la grasa. De tal manera que es evidente que la incorporación de β glucano en el yogur sería un sustituto de grasa ideal y, al mismo tiempo, beneficiaría al consumidor con una serie de beneficios para la salud. Es necesario realizar más estudios para su aplicación en otros productos lácteos.

Chirsanova *et al.* (2021), investigaron la aplicación de los β -glucanos obtenidos del sedimento de levadura resultante de la elaboración del vino local Viorica. Determinaron la cantidad de β -glucanos en el sedimento de levadura por medio de dos métodos: el método de cálculo y el método de laboratorio y obtuvieron cantidades similares, $29,92 \pm 0,47$ y $28,17 \pm 0,32$ respectivamente. Después, los β -glucanos obtenidos los incorporaron en varias concentraciones 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4% y 0,5% en el yogur de leche desnatada. Analizaron el efecto de la adición de β -glucanos sobre las propiedades fisicoquímicas de los yogures recién preparados. La adición de β -glucanos influyó positivamente en la formación del gel, lo que resultó en una disminución del tiempo de fermentación del yogur. El punto de pH final de 4.5 se alcanzó una hora antes (en 4 horas) en comparación con la muestra de control (en 5 horas). Los resultados mostraron que no hay cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas (acidez titulable, pH, viscosidad y sinéresis). Concluyendo que los β -glucanos se pueden utilizar como agente espesante para yogures bajos en grasa al acortar el período de fermentación y no cambiar esencialmente las características sensoriales.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Residuos agroindustriales de la industria azucarera.

Vargas y Pérez (2018) mencionan que las agroindustrias generan grandes cantidades de residuos en distintas etapas del proceso productivo lo que ocasiona un problema a nivel local y mundial, ya que la mayoría de estos residuos no cuentan con un tratamiento o disposición adecuada, por lo que esta condición agrava el proceso de contaminación ambiental.

La industria azucarera tiene como fuente de materia prima principal la producción de caña de azúcar, la cual se caracteriza por ser un ingrediente básico en la preparación de alimentos y bebidas (García Ramos *et al.*, 2022). Al igual que los demás procesos agroindustriales, la industria azucarera genera grandes residuos que provocan graves problemas de contaminación, sin embargo dichos residuos pueden ser revalorizados en la producción de biocombustibles y en productos de valor agregado nutricional (Gutiérrez-Antonio *et al.*, 2020).

El impacto ambiental que se genera por los productos residuales, puede ser disminuido al usar los residuos y generar una economía circular. Optimizando los procesos y materiales

de la procesadora de azúcar para que los residuos de esta puedan convertirse en la materia prima de otra industria (Genny *et al.*, 2021). Es decir, los nutrientes de estos residuos pueden ser usados para la producción de nuevos productos (García Ramos *et al.*, 2022).

Uno de los desechos de la industria azucarera es el bagazo, el cual es un residuo fibroso de la molienda de caña (García Ramos *et al.*, 2022). El tallo de la caña de azúcar consta de dos partes, una médula interior que contiene la mayor parte de la sacarosa y una corteza exterior con fibras lignocelulósicas. Durante el procesamiento del azúcar, el tallo de la caña de azúcar se tritura para extraer sacarosa. Este procedimiento produce un gran volumen de residuos (aproximadamente 240 kg de bagazo con 50% de humedad por tonelada de caña de azúcar) que contiene tanto corteza triturada como fibras de médula (Sidana y Farooq, 2014). El bagazo de caña de azúcar contiene material lignocelulósico complejo cuyo componente más abundante es la celulosa (33–36%), la hemicelulosa es la segunda fracción predominante (28–30%) y la lignina es el 22% (García Ramos *et al.*, 2022).

2.2.2. Optimización del medio de cultivo.

La optimización de los medios de cultivo puede tener un alto grado de influencia sobre la velocidad de crecimiento de diferentes microorganismos y en la producción de biomoléculas. La producción de moléculas de interés por parte de los microorganismos depende en gran medida de las cepas y especies presentes, así como de sus condiciones nutricionales y de cultivo (Pylak *et al.*, 2021). Los cambios menores en la composición de los medios pueden afectar sustancialmente la cantidad y calidad de las moléculas de interés. El diseño de un medio apropiado y la determinación de las condiciones de cultivo son de suma importancia para mejorar el rendimiento de la producción de biomoléculas de interés (Yan Yun *et al.*, 2018)

La metodología de superficie de respuesta (RSM) es un diseño experimental útil para optimizar los parámetros de mayor crecimiento y producción de biomoléculas mediante la aplicación de matemática y estadística (Feng *et al.*, 2011). El uso de RSM para consiste en los siguientes experimentos: 1) usar el diseño de Plackett-Burman para identificar factores que impactan significativamente en el proceso de fermentación; 2) ascenso más pronunciado para determinar el rango aproximado de las mejores condiciones de fermentación utilizando los factores clave; y 3) Diseño central compuesto para establecer el modelo de fermentación y determinar las condiciones óptimas de fermentación (Yan

Yun *et al.*, 2018). Los resultados de la optimización permiten conocer los valores específicos de nutrientes que requiere el microorganismo por lo que evito la adición innecesaria de componentes en exceso en el medio de cultivo. En comparación con otros métodos de optimización, RSM requiere menos ensayos para calcular las numerosas variables y sus interacciones (Yan Yun *et al.*, 2018).

2.2.2.1. Diseño de Plackett-Burman

El Diseño de Plackett-Burman fue desarrollado por R.L. Plackett y J.P. Burman en 1946, con el fin de mejorar el proceso de control de calidad. Es un experimento diseñado para identificar los factores más importantes al inicio del proceso experimental. Los diseños de Plackett-Burman pueden ajustar de 2 a 47 factores que tengan cada uno 2 niveles (Vanaja y Rani, 2007).

La aplicación principal de Plackett-Burman es identificar las variables que presentan significancia en el diseño; es decir observar que factores afectan a la variable respuesta para identificar las regiones óptimas (Trocine y Malone, 2000). Un diseño factorial común 2^k , excede los recursos necesarios en la mayoría de etapas que se requiera utilizar; ya que al ser varias variables, la respuesta se ve afectada, ocasionando que la identificación individual de las variables no se logre visualizar. De tal manera que la aplicación del diseño Plackett-Burman, permite obtener los resultados invirtiendo menos recursos, tiempo y experimentos, logrando clasificarse como uno de los diseños más empleados en la industria (Vanaja y Rani, 2007).

2.2.2.2. Experimento del ascenso más pronunciado

El método del ascenso más pronunciado es un método mediante el cual el investigador avanza secuencialmente a lo largo del camino del ascenso más pronunciado, es decir, a lo largo del camino de máximo aumento en la respuesta predicha. Por lo que, permite moverse rápidamente hacia la vecindad general del óptimo mediante la experimentación; deduciendo que el objetivo no es encontrar la configuración de las variables que produzcan una respuesta óptima, sino buscar una nueva región operativa en la que se mejore el proceso o producto (Kleijnen y Angun, 2004).

Una vez que se detecta la región óptima, se debe diseñar y realizar un experimento más elaborado para ajustar un modelo de superficie. A medida que la región experimental se acerca a la región de condiciones operativas óptimas, se espera que la curvatura

prevalezca y el diseño se detiene cuando los resultados dejan de ser coherente (Kowalski *et al.*, 2005).

2.2.2.3. Diseño Central Compuesto – Optimización de superficie de respuesta.

El diseño compuesto central es un diseño de superficie de respuesta que, además de los factores de nivel, tiene un punto axial o de estrella. El punto axial o estrella aumenta el número de niveles brindando flexibilidad al diseño experimental. Sus ventajas sobre Box-Behnken es que permite al diseñador experimental saber qué efecto tuvieron los factores en la respuesta, si el diseñador experimental va más allá o por debajo de los niveles de factores elegidos. También proporciona predicciones de alta calidad de los efectos de interacción lineal y cuadrática de los parámetros que afectan el proceso (Olawoye, 2021).

2.2.3. Condiciones de cultivo para levaduras.

Para el crecimiento y desarrollo de levaduras, estas necesitan una fuente de carbono orgánico, de nitrógeno ya sea orgánico e inorgánico, minerales, una temperatura, pH y tiempo adecuado.

- **Fuente de carbono.** Induce el crecimiento celular en la fase estacionaria, lo que sugiere que la fuente de carbono es el nutriente crítico que estimula el crecimiento. Las levaduras pueden usar fuentes de carbono fermentables como no fermentables. Las fuentes de carbono fermentables son maltosa, galactosa, glucosa, fructosa y sacarosa; mientras que las no fermentables son glicerol, etanol y acetato. La concentración recomendada de fuente de carbono varía desde el 5-15 % (Tomova *et al.*, 2019).
- **Fuente de nitrógeno.** El nitrógeno, afecta al crecimiento de la levadura y al rendimiento de la fermentación, incluida la formación de metabolitos secundarios. Además de que se necesita para la síntesis de proteínas y estructura de la misma. Las levaduras pueden usar fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico. Las fuentes de nitrógeno orgánico son extracto de levadura, extracto de carne y pectona; mientras que las inorgánicas son cloruro de amonio y urea. La concentración recomendada de fuente de nitrógeno varía desde 2-6 % (Raita *et al.*, 2022).
- **Temperatura.** La temperatura afecta el consumo de azúcar por parte de las levaduras, por lo que a temperaturas elevadas permiten un crecimiento más rápido

y extenso de la levadura. Se determinó que el rango óptimo de la temperatura de las levaduras es de 25°C a 30°C (Yilmaztekin *et al.*, 2013)

- **Tiempo.** La mayoría de las levaduras presentan un crecimiento entre los 4 a 7 días (Mendoza¹, 2005).
- **pH.** El pH óptimo en el cual se desarrollan mejor las levaduras, está entre 3 y 6. Las levaduras soportan medios más ácidos, en comparación a otros microorganismos, lo que es aprovechado en los procesos industriales para mantener el medio controlado de bacterias que puedan competir por el sustrato (Suárez, Machín; Garrido, 2016).

2.2.4. Fuentes de β -glucanos.

El β -glucano es un polisacárido no amiláceo que consiste en unidades de glucosa unidas a través de enlaces glucosídicos. El β -glucano es un polisacárido formado principalmente a través de enlaces glucosídicos β -1,3. Las paredes celulares de los microorganismos están compuestas de β -glucanos. Por lo tanto, los seres humanos consumen sin querer β -glucanos a través de su dieta habitual. Las fuentes primarias de β -glucanos en la dieta para humanos son los granos de cereales, hongos y levaduras (Nakashima *et al.*, 2018).

2.2.5. β -glucanos extraídos de levaduras.

Los β -glucanos extraídos de levaduras se caracterizan por ser los más bioactivos ya que presentan actividades funcionales (Mykhalevych *et al.*, 2022). Entre estas actividades funcionales se encuentra la actividad antioxidante, es decir tienen la capacidad de eliminar los radicales libres, en la industria de alimentos se han usado para brindar a los consumidores alimentos funcionales que tengan actividad antioxidante (Nakashima *et al.*, 2018).

2.2.6. Funciones de los β -glucanos en la dieta.

Se evaluó los efectos biológicos de los β -glucanos en la dieta después de su purificación, con el fin de comprender la relación entre la estructura y función de los β -glucanos, y se informó que tiene varios efectos en el cuerpo humano después del consumo como una reducción en el nivel de colesterol, prevención de la diabetes, regulación de la microflora intestinal, actividades antioxidantes, efectos antitumorales e inmunoestimulación (Nakashima *et al.*, 2018).

2.2.7. Actividad Antioxidante de los β -glucanos.

El mecanismo de los β -glucanos como agentes antioxidantes aún no se comprende bien, a pesar de lo mencionado, los estudios previos indicaron que la actividad antioxidante está relacionadas con la actividad del hidrógeno anomérico de moléculas que pueden actuar como inhibidores de radicales libres (Tsiapali *et al.*, 2001). Mientras tanto, cuantos más grupos hidroxilo estén expuestos en la cadena molecular de los β -glucanos, mejor se realizará la eliminación de radicales (Ahmad *et al.*, 2016).

La actividad eliminadora de radicales libres de los alimentos con β -glucanos se ve afectada por la cantidad de β -glucano, de tal manera que su abundancia es importante para esta acción. Los efectos antioxidantes de los β -glucanos ingeridos en alimentos posiblemente previenen el daño causado al intestino por los radicales libres. Además, varios estudios en ratas como organismo modelo han revelado que la actividad antioxidante del β -glucano administrado por vía oral también está dirigido contra el estrés oxidativo inducido, incluso en los órganos internos como los riñones y el hígado (Carvajal Carvajal, 2019). Estos informes implican que el β -glucano ejerce el efecto antioxidante mediante cualquiera de los siguientes mecanismos: el β -glucano incorporado al sistema circulatorio elimina los radicales libres que se encuentran allí, o el β -glucano estimula el sistema antioxidante innato a través de receptores específicos en el sistema inmunológico de la mucosa y la posterior liberación de citoquinas (Nakashima *et al.*, 2018)

2.2.8. Alimentos funcionales.

Actualmente, los consumidores tienen interés por el papel que desempeñan los alimentos específicos o componentes alimentarios fisiológicamente activos, llamados alimentos funcionales, con el fin de mejorar y mantener una buena salud (Pang *et al.*, 2012). De manera general todos los alimentos son funcionales por su valor nutricional por ende indispensable para la supervivencia. Sin embargo, el término ‘alimento funcional’ tiene una connotación diferente, ya que además de proporcionar los nutrientes necesarios proporciona un beneficio fisiológico adicional. Para los consumidores actuales, los alimentos son considerados, no sólo esenciales para la supervivencia, sino también como un medio para garantizar la salud. Una de las razones del interés de los consumidores por alimentos funcionales, es el aumento de la incidencia de desequilibrios metabólicos graves como: obesidad, la diabetes tipo 2, la hipertensión, las alergias e intolerancias alimentarias y los trastornos gastrointestinales e inflamatorios. Por lo que, una buena

nutrición es vital para la salud, el crecimiento, desarrollo óptimo y la prevención de enfermedades (Go *et al.*, 2005).

2.2.9. Yogur uncial.

El yogur es conocido por sus efectos beneficiosos para la salud y la nutrición humana. La producción y el consumo de yogur aumentan cada año en Ecuador. El yogur es un alimento probiótico, ya que contiene una mezcla de cultivos lácteos que se incorporan a la leche con el objetivo de obtener un producto con características específicas. Aportando grandes beneficios a la salud de todas las personas de cualquier edad y condición (A. Espinoza y Zapata, 2010). Sin embargo, carece de β -glucanos, que son reconocidos por su importancia nutricional como ingredientes bioactivos funcionales (Singh *et al.*, 2012).

2.2.9.1. Condiciones de Calidad del yogur.

- **Grasa.** La grasa está compuesta por lípidos que influyen en la consistencia y textura del producto. El aporte de grasa del yogur debe ser mayor o igual a 1. Si el aporte de grasa en nuestra dieta este dentro del valor establecido, beneficia a la salud, ya que es una fuente energética además de estar presentes en las membranas celulares y ejercen función de protección a nuestros órganos internos (A. Espinoza y Zapata, 2010).
- **Proteína.** La proteína que se encuentra en el yogur mantiene y renueva los tejidos del cuerpo humano. La concentración proteína es este lácteo es mayor al de la leche y dese ser mayor o igual a 2,8. Se conoce que al consumir yogur no debe haber molestias estomacales ya que la proteína del yogur es altamente digestible por que se encuentran coaguladas antes del consumo (A. Espinoza y Zapata, 2010).
- **pH.** El valor de pH debe estar entre 4,2 – 4,5 siendo el deseable 4,6 para obtener el aroma y características deseables (J. Espinoza, 2007).
- **Acidez titulable.** Según la INEN (2011), el valor de la acidez titulable debe estar entre 0,85 – 0,95 % de ácido láctico.

2.2.10. Alimentos funcionales con actividad antioxidante.

Se ha demostrado que la nutrición juega un papel crucial en la prevención de enfermedades crónicas, ya que la mayoría de ellas pueden estar relacionadas con la

dieta. Los alimentos funcionales no solo son necesarios para vivir, sino también son una fuente de bienestar mental y físico, contribuyendo a la prevención y reducción de factores de riesgo para varias enfermedades o potenciando ciertas funciones fisiológicas. Un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta de manera beneficiosa una o más funciones específicas del cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de una manera que sea relevante para el estado de bienestar y la salud o para la reducción del riesgo de una enfermedad (Roberfroid, 1999).

Uno de los ejemplos son los alimentos funcionales con actividad antioxidante los cuales actúan como eliminador de radicales, donador de hidrógeno, donador de electrones, descomponedor de peróxido, inhibidor de oxígeno, inhibidor de enzimas y agente quelante de metales (Lobo *et al.*, 2010).

2.2.11. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH.

En la actualidad una de las técnicas más usadas es la espectroscopia, por la cual se puede medir la actividad antioxidante, midiendo la colorimetría de las sustancias (Kuskoski *et al.*, 2005). El método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), consiste en la captación de radicales libres, por medio de la aceptación de un electrón o átomo de hidrógeno por la molécula DPPH, la cual en metanol es de color violeta intenso. La solución DPPH al reaccionar con una sustancia antioxidante dona un átomo de hidrógeno, cambiando el color inicial violeta a amarillento, siendo el color amarillento un indicador de que la sustancia tiene actividad antioxidante. El cambio de colorimetría se lo determina en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. Este método se observa directamente en comparación a otros ya que los demás requieren el uso de una reacción química, enzimática o electroquímica (Kuskoski *et al.*, 2005).

2.3. Marco Legal

Las opciones legales para el uso de β -glucanos derivados de levadura como un nuevo ingrediente alimentario se encuentran bajo el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo (UE) 2015/2283 de 25 de noviembre de 2015 relativo a nuevos alimentos (Caruso *et al.*, 2022).

La presente investigación se fundamenta en los siguientes artículos de la constitución:

Art. 3. Son deberes primordiales: Numeral 3. “Fortalecer la unidad nacional en la diversidad”; Numeral 5. “Planificar el desarrollo nacional, erradicar la pobreza, promover el desarrollo sustentable y la redistribución equitativa de los recursos y la riqueza, para acceder al buen vivir” (Asamblea Nacional del Ecuador, 2008).

El Art. 281 de la constitución determina que: “La Soberanía Alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del Estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos y culturalmente apropiado de forma permanente”; además de ser una base fundamental de información para la estrategia nacional de cambio de matriz productiva. Además: El mantenimiento de la salud de los vegetales mediante medidas preventivas, como la elección de especies y variedades apropiadas que resistan a los parásitos y a las enfermedades, las rotaciones apropiadas de cultivos, abonos orgánicos, abonos verdes, leguminosas, los métodos mecánicos y físicos y la protección de los enemigos naturales de las plagas. La fertilidad y la actividad biológica del suelo deberán ser mantenidas o incrementadas mediante la rotación plurianual de cultivos o asociación de cultivos para el caso de los perennes que comprenda las leguminosas y/u otros cultivos de abonos verdes y la aplicación de estiércol animal o materia orgánica, ambos de preferencia compostados. Un plan de manejo de suelos en la producción de alimentos y pastos, que detalle las rotaciones, siembra de abonos verdes y otros métodos de enmienda para enriquecer el suelo en la producción de forrajes (Asamblea Nacional del Ecuador, 2008).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Descripción del área de estudio/Grupo de estudio

La investigación se la llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi (UPEC), ubicados en las instalaciones de la Universidad, en la ciudad de Tulcán. Para lo cual, se usaron los laboratorios de microbiología y biotecnología, análisis de calidad y evaluación sensorial, tal y como se observa en la Figura 1 y 2.

Figura 1

Ubicación de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi.



Figura 2

Instalaciones de los laboratorios de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi.



3.2. Enfoque y tipo de investigación

3.2.1. Enfoque

La investigación tiene un enfoque en la optimización de las condiciones de cultivo de la levadura *Wickerhamomyces anomalus* para la mayor producción de β -glucanos en la elaboración de un alimento funcional con actividad antioxidante.

De tal manera que el enfoque de la investigación fue cuantitativo ya que se recolectaron datos en base a mediciones numéricas, que fueron analizados estadísticamente para establecer patrones de comportamiento en la optimización y en la elaboración del producto (Sampieri Hernández *et al.*, 2002).

3.2.2. Tipo de Investigación

La investigación fue de tipo experimental ya que se obtuvieron datos a través de la experimentación, a partir de metodologías recopiladas en fuentes bibliográficas. Los datos fueron evaluados con respecto a las variables definidas y se dio respuesta a las preguntas de la investigación (Sampieri Hernández *et al.*, 2002).

En la investigación se planteó como variable independiente el porcentaje de fuente de carbono - bagazo y condiciones del medio óptimo, y se evaluó la mayor producción de β -glucanos, de tal manera que se evidenciaron cambios en la variable dependiente. En cuanto a la elaboración del yogur funcional la variable independiente fue el porcentaje de β -glucano, y se observó la calidad del producto y actividad antioxidante. Por lo que los datos que se recolectaron permitieron analizar la causa y efecto de la investigación de manera experimental y lograr que la investigación sea reproducible con el fin de verificar o comprobar los resultados obtenidos.

3.3. Definición y operacionalización de variables

3.3.1. Definición de variables

Primera fase. Optimización de producción de β -glucanos extraídos de la levadura *Wickerhamomyces anomalus*.

Variables Independientes:

- % Fuente de carbono bagazo residual de caña de azúcar.
- Condiciones del medio óptimo: tiempo de incubación, pH, temperatura, fuente de nitrógeno.

Variables Dependientes:

- % de β -glucano con mayor rendimiento.

Segunda fase. Elaboración de un yogur funcional.

Variables Independientes

- % de β -glucano adicionado.

Variables Dependientes:

- Parámetros de calidad: evaluación sensorial, análisis fisicoquímicos, microbiológicos y nutricionales del yogur funcional.
- Actividad antioxidante del yogur.

3.3.2. Operacionalización de variables

Tabla 1

Operacionalización de Variables

| Variables | Dimensiones | Indicadores | Técnicas | Ítems |
|--|---|---|---------------------|---------------------------------------|
| Fase 1. Optimización de producción de β-glucanos | | | | |
| VI | | | | |
| % Fuente de carbono bagazo | Porcentaje | 5g/1000ml 15g/1000ml | Gravimétrica | (Sidana y Farooq, 2014) |
| Condiciones del medio de cultivo | Tiempo de incubación | 4 días 7 días | Incubadora | (Feng <i>et al.</i> , 2011) |
| | pH | 3 6 | Potenciométrica | (Feng <i>et al.</i> , 2011) |
| | Temperatura | 25 °C 30 °C | | (Feng <i>et al.</i> , 2011) |
| | Nitrógeno: Extracto de levadura Cloruro de amonio Urea | 2g/1000ml – 6g/1000ml 2g/1000ml – 6g/1000ml 2g/1000ml – 6g/1000ml | Gravimétrica | (Feng <i>et al.</i> , 2011) |
| VD | | | | |
| % de β -glucano con mayor rendimiento. | Porcentaje de β -glucano producido. | g/100 g de biomasa | Espectrofotométrica | (López-Legarda <i>et al.</i> , 2017)l |
| Fase 2. Elaboración del yogur funcional. | | | | |
| VI | | | | |
| % de β -glucano extraído. | Porcentaje | 0,5g/1000 ml 1g/1000 ml 1,5g/1000 ml | Gravimétrica | (Villalva <i>et al.</i> , 2018) |

| VD | | | | | | |
|----------------------------------|--|--------------------------|---|--|--|--|
| Parámetros de Calidad | | Sensorial | Color Olor Sabor Viscosidad Aceptación Global | Análisis sensorial de aceptación mediante una escala hedónica. | Hoja de evaluación sensorial | |
| | | Análisis fisicoquímicos | pH Acidez titulable Sólidos totales Cenizas | Potenciometría Volumétrica Humedad Humedad | (Reyes J. y Ludeña F, 2015) (Reyes J. y Ludeña F, 2015) (AOAC 990.20, 2023) (AOAC 942.05, 2023) | |
| | | Composición Nutricional | Grasas Proteínas | Gerber Kjeldahl | (AOAC 991.20, 2023) (García Martínez y Fernandez Segovia, 2013) | |
| | | Análisis microbiológicos | <i>E. coli</i> y coliformes UFC Aerobios mesófilos UFC Hongos y levaduras UFC | Siembra de profundidad | (Reyes J. y Ludeña F, 2015) | |
| Actividad antioxidante del yogur | | Actividad antioxidante | Absorbancia a 517 nm | Espectrofotometría | (Salem <i>et al.</i> , 2016) | |

3.4. Procedimientos

3.4.1. FASE 1. Optimización de producción de β -glucanos

3.4.1.1. Diseño del medio de cultivo

Se obtuvo el bagazo de caña de azúcar en el ingenio azucarero del Norte ubicado en la provincia de Imbabura – Ecuador. La metodología se basó en el trabajo realizado por (Sidana y Farooq, 2014), con ligeras modificaciones. El bagazo se deshidrato en un horno de secado (Estufas de secado Serie SLW Convección Forzada) durante 5 días a 65°C. Después del secado completo, la médula del bagazo se extrajo manualmente y la corteza exterior se descartó. La médula se molió hasta obtener un polvo fino en un molino industrial (Macro Molino Tipo Croton, modelo R-TE-625). Se prepararon los medios como se muestra en la Figura 3, se colocó la fuente de carbono y nitrógeno en matraces de 500 ml y agitaron a 150 rpm y temperatura ambiente durante 24 horas. Después de las 24 horas de agitación los matraces se esterilizaron a 121°C y 15 psi durante 15 min. Una vez esterilizados los medios fueron filtrados en una tela muselina y se colocó 50 ml del medio filtrado en los matraces de 500 ml. Finalmente se inoculó 1 ml la levadura *Wickerhamomyces anomalus* que fue asilada e identificada en el laboratorio de microbiología de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi.

Figura 3

Imagen del diseño de los medios de cultivo.



3.4.1.2. *Diseño experimental Plackett Burman*

Se usó el diseño Plackett Burman para seleccionar los factores claves antes de la optimización. Cada variable independiente se probó en dos niveles alto (+) y bajo (-), como se indica en el diseño experimental mostrado en la Tabla 2. En la Tabla 2 se observan los detalles de la matriz del diseño. Se eligieron 5 factores, como fuente de carbono el bagazo en dos concentraciones 5 g/1000ml y 15 g/1000ml, como fuente de nitrógeno se probaron 3 distintas fuentes: Extracto de levadura, cloruro de amonio y urea en dos distintas concentraciones 2 g/1000ml y 6 g/1000ml, mientras que para las condiciones de cultivo el pH se evaluó a 3 y 6, la temperatura a 25°C y 30°C y tiempo a 4 y 6 días. Se incorporaron 6 factores dummy en 12 experimentos para calcular el error estándar de acuerdo a lo requerido por el diseño.

Tabla 2

Matriz del diseño experimental Plackett Burman.

| Factores | Unidades | Valores experimentales | |
|----------------------------|----------|------------------------|----------------|
| | | Nivel Bajo (-) | Nivel alto (+) |
| Fuente de carbono | g/L | -1 (5) | 1 (15) |
| Fuente de nitrógeno | g/L | -1 (2) | 1 (6) |
| Temperatura | °C | -1 (25) | 1 (30) |
| pH | | -1 (3) | 1 (6) |
| Tiempo | Días | -1 (4) | 1 (6) |
| Dummy1-6 | | -1 | 1 |

3.4.1.3. *Experimento del ascenso más pronunciado*

El método del ascenso más pronunciado es un procedimiento simple y eficiente para mover la región experimental de una respuesta en la dirección del cambio máximo hacia el óptimo. Se eligieron 2 factores significativos, la fuente de carbono: bagazo desde 10 g/1000ml hasta 15 g/1000ml, y la fuente de nitrógeno: cloruro de amonio desde 4 g/1000ml y 9 g/1000ml, mientras que las condiciones de cultivo el pH 4,5, temperatura a 27,5°C y tiempo de 4 días fueron constantes.

3.4.1.4. Diseño Central Compuesto – Optimización de superficie de respuesta.

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para determinar la concentración óptima de las variables para la elevación de la producción β -glucanos. El diseño experimental fue central compuesto con 2 factores clave seleccionados anteriormente; concentraciones de carbono y nitrógeno, bagazo y cloruro de amonio respectivamente, además de 5 puntos centrales y 4 puntos axiales.

3.4.1.5. Extracción de β glucanos.

Se basó en la metodología descrita por (Liu *et al.*, 2008) con ligeras modificaciones.

- **Purificación preliminar.**

Las levaduras obtenidas se centrifugaron a 4500 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se suspendieron los sedimentos en 1 ml de agua destilada. Se colocó los sedimentos en crisoles y fueron llevadas a la estufa a 65°C durante 8 horas. Al cabo de 24 horas se pesaron las cantidades de sedimentos. Se procedió a retirar la grasa a cada tratamiento en el equipo SX-6 Extractor Soxhlet y Randall.

- **Autólisis inducida.**

Una vez que a las muestras se les retiró la grasa se les añadió 1 ml de cloruro sódico al 3% como promotor de autólisis, se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h con agitación a 120 rpm. Después, el autolisado se calentó a 80°C durante 15 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 4500 g durante 10 min. Las células de levadura autolizadas se almacenaron a 4°C para el siguiente paso.

- **Tratamiento de agua caliente.**

La suspensión se llevó a la autoclave a 125°C durante 3 horas y se enfrió a temperatura ambiente. Los residuos insolubles se separaron y lavaron dos veces con agua destilada y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

3.4.1.6. Determinación del % de β -glucanos.

Se realizaron diluciones a las suspensiones en volúmenes de 5, 10, 25 y 50 ml en agua destilada de acuerdo a las concentraciones de levadura. Se colocó en tubos de ensayo 2

ml de la dilución más 2 ml de fenol al 5% y se agitó en vortex. En oscuridad y agua fría se colocó 5 ml de ácido sulfúrico y se agitó en vortex, se dejaron reposar las muestras durante 15 min en oscuridad. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda 490 nm. Se preparó el blanco colocando agua destilada en vez de dilución de tratamiento (López-Legarda *et al.*, 2017).

3.4.2. FASE 2. Elaboración del yogur funcional.

3.4.2.1. Formulación del yogur.

Se formularon los yogures como se indica en la Tabla 3. Para lo cual se utilizó leche comercial, bacterias lácticas, azúcar, jalea de mora y β -glucano en tres concentraciones distintas (0,5, 1 y 1,5).

Tabla 3

Formulación del yogur líquido con β -glucano.

| Ingredientes | Control | T1 | T2 | T3 |
|-----------------------|---------|-------|-------|-------|
| Leche (ml) | 83,26 | 83,23 | 83,19 | 83,16 |
| Azúcar (g) | 1,75 | 1,75 | 1,75 | 1,75 |
| Cultivo lácticas (mg) | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,003 |
| Jalea de mora (g) | 14,99 | 14,98 | 14,97 | 14,97 |
| β glucano (mg) | 0,000 | 0,042 | 0,083 | 0,125 |

Se utilizó el cultivo láctico comercial el cuál fue adicionado a las formulaciones de acuerdo con las cantidades establecidas por el fabricante.

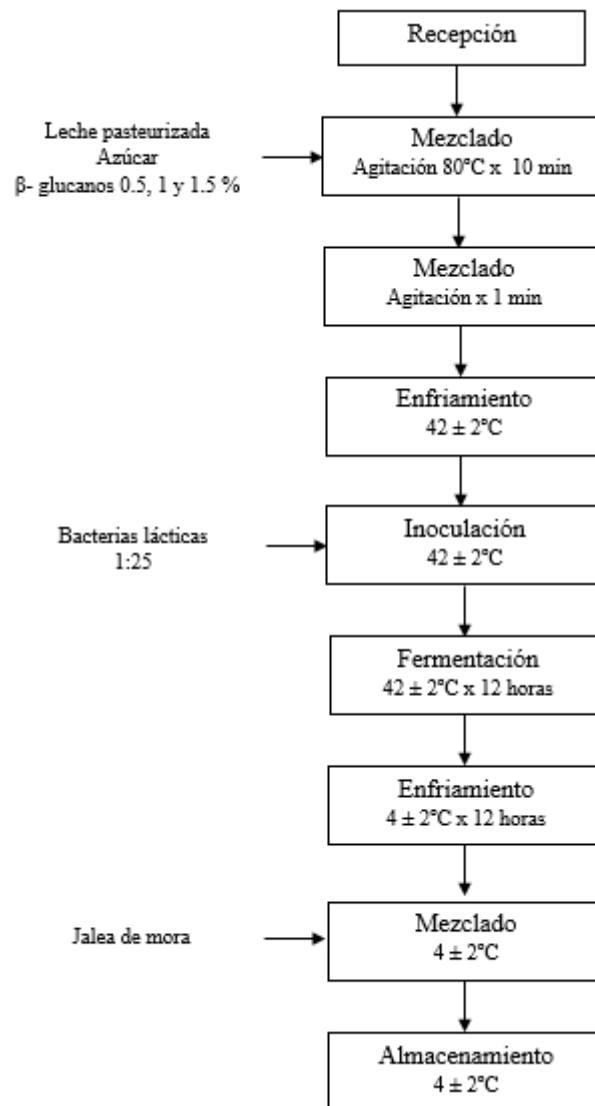
$$\frac{8 \text{ g}}{200 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{?} = 0.04 \text{ g para un litro de leche}$$

3.4.2.2. Diagrama del proceso.

Como se describe en la Figura 4, se añadió el azúcar y el β -glucano a la leche y se calentó a 80°C con agitación continua durante 10 min. Luego, se agitó con un procesador de alimentos durante 1 min y se dejó enfriar a $42 \pm 2^\circ\text{C}$ para la inoculación del fermento. La fermentación se realizó en una incubadora a $42 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 horas o hasta alcanzar un pH de 4,3 – 4,6. Los yogures se enfriaron a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ y se añadió la jalea de mora según la concentración indicada. Finalmente, los yogures se almacenaron a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Figura 4

Diagrama del proceso para la elaboración del yogur.



3.4.2.3. Prueba sensorial de escala hedónica.

En la evaluación sensorial afectiva con escala hedónica se aplicó una escala de 5 puntos con el fin de determinar la diferencia entre las 3 formulaciones distintas de yogur, se evaluaron los siguientes parámetros: color, olor, sabor, viscosidad y aceptación global. Se utilizó a un panel de 50 jueces consumidores habituales de yogur. Cada juez evaluó las 3 muestras de yogur con las diferentes formulaciones y codificaciones: 750 (T1 0,5% de β-glucano), 966 (T2 1% de β-glucano) y 192 (T3 1,5% de β-glucano). A las tres muestras se las presentó en vasos homogéneos a una temperatura de refrigeración $4 \pm 2^\circ\text{C}$

más galleta sin sabor, agua mineral y la ficha de evaluación sensorial. Mediante la escala hedónica el juez dio a conocer su preferencia sobre la muestra que más le agradó con respecto a los cinco atributos evaluados, no se aplicaron repeticiones del producto a los catadores. Para esta prueba se obtuvo los datos estadísticos mediante la prueba de Kruskal – Wallis mediante el uso del programa STATGRAPHICS Centurión.

3.4.2.4. Análisis microbiológico

Se realizó los análisis microbiológicos, físico químicos, nutricionales y actividad antioxidante a los yogures controles y al tratamiento con mayor aceptación sensorial.

Se preparó la muestra tomando 10 ml de yogur más 90 ml de agua peptona en una funda ziploc que fue llevada al stomacher por 30 s a 2000 rpm. Se prepararon diluciones de acuerdo a la norma (INEN, 2011); para lo cual se colocó en un tubo de ensayo 9 ml de agua peptona más 1ml de muestra madre. Este proceso se repitió en cada dilución hasta la dilución 10^{-3} , a continuación, se inoculó 1 ml de solución por siembra a profundidad y por triplicado para cada tratamiento. Se incubó a 25°C durante 5 días para hongos y levaduras en medio PDA, a 35°C durante 24 horas para Aerobios mesófilos en medio PCA y a 35°C durante 48 horas, para *E. coli* / coliformes totales en medio cromogénico. Se reportó el resultado en unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g). Finalmente, se evaluó la calidad microbiológica comparando los resultados con los requisitos establecidos en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395 para Leches Fermentadas (Reyes J. y Ludeña F, 2015).

3.4.2.5. Análisis físicoquímicos.

- **Acidez titulable**

Se realizó por titulación con una solución valorada de hidróxido de sodio al 0.1 N. En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se transfirió 10 ml de yogur más 10 ml de agua hervida fría y se adicionó 3 gotas de solución de fenolftaleína. Posteriormente se tituló la muestra hasta que el pH fuese de 9,15; la toma de lecturas se realizó por triplicado. El porcentaje de acidez fue expresada en % de ácido láctico y se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times meq \text{ muestra} \times 100}{V} \quad (1)$$

Donde:

V_{NaOH} = volumen de solución de NaOH usada para titular (ml)

N_{NaOH} = normalidad de la solución de sosa usada para titular

V = volumen de la muestra (ml)

meq = miliequivalente del ácido cítrico (Reyes J. y Ludeña F, 2015).

- **pH**

Para la medición del pH se usó el potenciómetro digital con previa calibración, se lavó con agua destilada el electrodo, posteriormente el electrodo se introdujo a la muestra de yogur y se tomó las lecturas por triplicado (Reyes J. y Ludeña F, 2015).

- **Ceniza**

Los crisoles se tararon en la estufa a 105°C durante 3 horas y se enfriaron en el desecador. Se tomó sus pesos en la balanza analítica. Posterior, se colocó 5 ml de yogur y se incinero en la cabina de extracción. Los crisoles se introdujeron en la mufla a 550°C por 4 horas. Finalmente se pesaron los crisoles en una balanza analítica, los ensayos fueron realizados por triplicado. Se determinó el contenido de ceniza por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ceniza} = (W_1 - W_2) * W_M \times 100 \quad (2)$$

Donde:

W_1 = crisol con la muestra (peso)

W_2 = crisol (peso)

W_M = peso de la muestra (AOAC 942.05, 2023).

- **Sólidos totales**

Los crisoles se tararon en la estufa a 105°C durante 3 horas y se enfriaron en el desecador. Se tomó sus pesos en la balanza analítica. Posterior se colocó 5 ml de yogur y se los introdujo en la estufa a 65°C por 12 horas (AOAC 990.20, 2023). Finalmente se pesaron los crisoles en una balanza analítica, los ensayos fueron realizados por triplicado. Se determinó el contenido de sólidos totales por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sólidos totales} = \frac{\text{Peso muestra seca}}{\text{Peso muestra}} \times 100 \quad (3)$$

3.4.2.6. Composición Nutricional

- **Determinación de proteínas totales.**

En la primera etapa: digestión, se colocó 1 ml de yogur, una pastilla Kjeldahl, 15 ml de ácido sulfúrico al 96% y 5 gotas de antiespumante en los tubos de digestión y se encendió el equipo a una temperatura de 420°C durante 1 hora. Una vez digerido se agregó 80 ml de agua destilada. El tubo de digestión fue llevado al equipo de destilación y se adicionó 70 ml de NaOH. Por otro lado, en un Erlenmeyer se tomó 25 ml de solución de ácido bórico al 4%, al cual se le añadió 3 gotas de indicador shiro tashiro. Se destiló la muestra hasta que dio el cambio de color de rojo a verde. Finalmente, para la etapa de titulación, se tituló con ácido clorhídrico al 0,1 N. Se obtuvo los datos utilizando las siguientes dos ecuaciones (4 y 5):

$$\%NT = \frac{Va \times 1,4007 \times M}{m} (100) \quad (4)$$

$$\%P = \%NT \times F \quad (5)$$

Donde:

NT= Porcentaje de nitrógeno

P= Proteína bruta

Va= Volumen en ml de HCl 0,1 N gastado en la titulación

M= Molaridad del HCl

m= Peso de la muestra en gramos

F= Factor de conversión de proteína para leche y derivados (6,38) (García Martínez y Fernandez Segovia, 2013).

- **Determinación de grasas totales.**

Se realizó por medio del método Gerber, para lo cual, se colocó en el butirómetro 5 ml de yogur, 5 ml de agua destilada, 10 ml de HCl concentrado y 1 ml de alcohol isoamílico.

Se agitó el butirómetro hasta que el yogur se disolvió por completo, después se centrifugó a 60°C por 5 min. Se colocó el butirómetro con el tapón hacia abajo en el baño maría a 65°C por 5 min, finalmente manteniendo el butirómetro en posición vertical y sin agitación, se retiró del baño. Se leyó el contenido de grasa, ajustando a columna de grasa en la marca principal del butirómetro (AOAC 991.20, 2023).

3.4.2.7. Actividad Antioxidante

El ensayo se basó en la metodología descrita por Ye *et al.*, (2013), con algunas modificaciones. La capacidad del yogur para eliminar los radicales libres se determinó mediante el Método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo DPPH. Para ello, se tomó 10 ml de yogur más 10 ml de metanol, se agitó por vórtex durante 2 minutos y se refrigeró la muestra a 4°C durante 3 horas. Después se centrifugó 1180 g por 30 min a 4°C y se filtró las muestras en un papel filtro de 72 µm. Se tomó 2 ml de muestra más 2,5 ml de DPPH 100 µM. Se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad. Finalmente, los radicales libres se determinaron mediante la medición de la absorbancia a 517 nm frente al blanco de metanol. El efecto de barrido porcentual se calculó a partir de la reducción de la absorbancia frente al control (solución radical DPPH en metanol sin muestra) según la siguiente ecuación de Blois.

$$\% \text{ Actividad barrido} = \left[\frac{(\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia de la muestra})}{\text{Absorbancia del control}} \right] \times 100 \quad (6)$$

3.4.2.8. Análisis Estadístico.

Se utilizó el programa Design-expert 7.0 para los diseños experimentales en la optimización. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (n=3) con el fin de garantizar la reproducibilidad. Los resultados se presentaron como la media ± desviación estándar de las tres determinaciones. Una vez comprobados los supuestos para datos paramétricos los datos del análisis de sensorial fueron analizados con la prueba Kruskal–Wallis, los demás tratamientos fueron analizados utilizando análisis de varianza (ANOVA) en un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan los resultados que se obtuvieron en la investigación, en la fase 1, se muestran las condiciones óptimas para la mayor producción de β -glucanos. Mientras que, en la fase 2, se presentan los resultados de la formulación con mayor aceptación sensorial, por medio de una comparación estadística entre ellos, utilizando la prueba de Kruskal Wallis a través del software Statgraphics centurión XVII. Finalmente, al tratamiento con mayor aceptación, se le realizó análisis de calidad nutricional y fisicoquímica, además de actividad antioxidante y los resultados fueron analizados por medio de un ANOVA.

4.1. FASE 1. Optimización de producción de β -glucanos.

4.1.1. Diseño experimental Plackett Burman

En la Tabla 4, se muestran los valores promedio obtenidos para los experimentos del diseño Plackett-Burman con los mejores resultados de producción de β -glucanos para cada tratamiento.

Se observa que el tratamiento con mayor producción de β -glucanos fue con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, la producción máxima fue de 170,02 g/100 g de biomasa, mientras que el valor mínimo fue de 21,9 g/100 g de biomasa, además el valor de R^2 (0,9906) indicó que el modelo explica el 99% de la variabilidad en la respuesta y señaló la precisión del modelo. Mientras que para urea se obtuvo una producción máxima de 116,5 g/100 g de biomasa y el valor mínimo fue de 20,9 g/100 g de biomasa, el valor de R^2 (0,9617) indicó que el modelo explica el 96% de la variabilidad en la respuesta. Finalmente, la fuente de nitrógeno con menos producción de β -glucanos fue el extracto de levadura con una producción máxima de 91,50 g/100 g de biomasa y el valor mínimo fue de 10,55 g/100 g de biomasa, el valor de R^2 (0,9676) indicó que el modelo explica el 96% de la variabilidad en la respuesta. La producción de β -glucanos con cloruro de amonio aumento en 1,5 veces la producción con urea, mientras que para extracto de

levadura aumentó 2 veces la producción de β -glucanos. Los tres tratamientos mostraron diferencia significativa ($p < 0,05$) al 95% de confianza.

Tabla 4

Valores más alto de producción de β -glucanos obtenidos en los experimentos del diseño Plackett-Burman.

| Tratamientos | Producción de β-glucanos (g/100 g biomasa) |
|--------------------------------|--|
| 1. Extracto de Levadura | 91,50 \pm 1,20 _a |
| 2. Cloruro de Amonio | 170,2 \pm 0,45 _b |
| 3. Urea | 116,5 \pm 0,68 _c |

Nota. Los resultados se expresan como valores medios \pm la desviación estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadística al 95% de confianza.

Los resultados concuerdan con el estudio realizado por Rojo *et al.* (2023) quienes investigaron el impacto de diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento y el rendimiento fermentativo de cepas de levadura seleccionadas localmente. Suplementaron al medio sintético y jugo de uva natural con sulfato de amonio (NH), extracto de levadura (YE), Fermaid K (FERM) y urea (U) en concentraciones variables. Obtuvieron que para los dos medios las fuente de nitrógeno que promovieron el crecimiento fue sulfato de amonio (NH) y urea combinada con amonio (U + NH 300 + 75 mg/L), mejorando los parámetros de crecimiento como el rendimiento de etanol. El uso combinado de urea y amonio mostró un efecto sinérgico, lo que lo convierte en un suplemento de nitrógeno rentable para las fermentaciones de levaduras.

De igual manera la investigación realizada por Arous *et al.* (2016), demuestra que la fuente de nitrógeno preferida para el cultivo *S. etchellsii* y *C. pararugosa* fueron las sales de amonio como cloruro de amonio y sulfato de amonio, en comparación con el extracto de levadura y proteína de soja, obteniendo un rendimiento de biomasa entre 3 y 8 veces menor.

El consumo de nitrógeno se explica ya que los microorganismos necesitan de nitrógeno para la síntesis de proteínas y la estructura de las mismas (Jach *et al.*, 2022). Existen distintas fuentes de nitrógeno, ya sean orgánicos como el extracto de levadura o

inorgánicos como el cloruro de amonio y urea; donde las levaduras son capaces de utilizar el nitrógeno para incorporarlo en los componentes nitrogenados estructurales como en los aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas (Raita *et al.*, 2022).

A pesar de que las levaduras puedan usar distintas fuentes de nitrógeno, ellas muestran preferencia por el nitrógeno inorgánico, como la glutamina o las sales de amonio (Broach, 2012); concordando con los resultados mostrados en la Tabla 4, la fuente con mayor producción de β -glucanos fue el cloruro de amonio con 170,2 g/100 g biomasa. Las levaduras prefirieron metabolizar el cloruro de amonio como fuente de nitrógeno. Esto se debe al metabolismo de las levaduras ya que poseen enzimas para la biosíntesis de todos los aminoácidos, permitiéndoles usar los iones de amonio como única fuente de nitrógeno (Amata, 2013).

De las 5 variables estudiadas: concentración de bagazo y cloruro de amonio, pH, temperatura y tiempo; se eligieron las más significativas mediante el diseño de Plackett-Burman, se analizó por medio de un ANOVA (Tabla 5). La buena calidad del modelo se comprobó con el coeficiente R^2 (0,9906), que explicó el 99,06% de la variabilidad de la respuesta. El valor F del modelo fue 23,53 explicando que el modelo fue significativo. Un valor de P menor a 0,05, indicó un efecto significativo. De tal manera que para una mayor optimización se seleccionaron dos variables significativas; tal y como se muestra en la Tabla 5, las variables significativas en este diseño fueron la concentración de bagazo ($p = 0,0388$) y de cloruro de amonio ($p = 0,0211$).

Tabla 5

Análisis de ANOVA para el diseño experimental Plackett-Burman del tratamiento con Cloruro de Amonio.

| Fuentes | Suma de cuadrados | df | Cuadrado medio | Valores-F | Valores-p | |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|------------------|------------------|--------------|
| Modelo | 43757,75 | 9 | 4861,97 | 23,53 | 0,0414 | significante |
| A. Bagazo | 5013,11 | 1 | 5013,11 | 24,26 | 0,0388 | |
| B. Cloruro de Amonio | 9473,63 | 1 | 9473,63 | 45,85 | 0,0211 | |
| C. Temperatura | 3235,07 | 1 | 3235,07 | 15,66 | 0,0583 | |
| E. Tiempo | 3818,83 | 1 | 3818,83 | 18,48 | 0,0503 | |
| F. pH | 3815,65 | 1 | 3815,65 | 16,63 | 0,0609 | |
| Residual | 413,22 | 2 | 206,61 | | | |
| Cor Total | 44170,96 | 11 | | | | |

4.1.2. Diseño del ascenso más pronunciado

Mediante el diseño de ascenso más pronunciado se evaluaron las variables más significativas: concentración de bagazo y concentración de cloruro de amonio; con el fin de predecir los niveles óptimos de las variables y dar como resultado la mayor producción de β -glucanos. Para este diseño, se inició desde el punto central de los parámetros del diseño Plackett-Burman. El punto de inicio para la optimización de superficie de respuesta fue 12 g/L de bagazo y 6 g/L de cloruro de amonio con la mayor producción de β -glucanos. En la Tabla 6 se observa que alcanzó su punto máximo (52,3 g/100 g biomasa) en el tercer paso y no se logró ninguna mejora adicional en la respuesta a pesar de aumentar las concentraciones de nutrientes.

Tabla 6

Diseño experimental del ascenso más pronunciado y sus valores de producción de β -glucanos correspondientes. Las variables constantes fueron: pH (4,5), temperatura (27,5 °C) y tiempo (6 días).

| Experimento | Bagazo (g/L) | Cloruro de amonio (g/L) | Producción de β -glucanos (g/100 g biomasa) |
|--------------|--------------|-------------------------|---|
| 0 | 10 | 4 | 33,1 \pm 1,18 |
| 0+1 Δ | 11 | 5 | 42,7 \pm 0,74 |
| 0+2 Δ | 12 | 6 | 52,3 \pm 0,18 |
| 0+3 Δ | 13 | 7 | 43,4 \pm 1,24 |
| 0+4 Δ | 14 | 8 | 43,9 \pm 0,94 |
| 0+5 Δ | 15 | 9 | 43,0 \pm 1,56 |

Nota. Los resultados se expresan como valores medios \pm la desviación estándar.

Esta explicación va en concordancia con lo mencionado por Gonzalez y Aranda (2023), el crecimiento microbiano está representado por una curva sigmoidea compuesta por fases de crecimiento diferenciadas y características. La fase de latencia (inicio de la maquinaria metabólica para el crecimiento), la fase exponencial de crecimiento (aumento exponencial en la abundancia de células y tasa máxima de crecimiento), la fase estacionaria de crecimiento (las células se adaptan a las condiciones cambiantes debido a la escasez de nutrientes) y la fase de disminución (o muerte) (disminución del número de células). En la fase estacionaria, existe una acumulación de desechos que inhiben el

crecimiento de los microorganismos, provocando que su crecimiento sea limitado a pesar de que se agregue mayor concentración de nutrientes.

4.1.3. Diseño Central Compuesto – Optimización de superficie de respuesta.

Se determinó el nivel óptimo de los parámetros significativos con el fin de mejorar el rendimiento de producción de β -glucanos por medio del Diseño Central Compuesto. Se evaluó la interacción de las concentraciones de bagazo y cloruro de amonio, mostraron un efecto significativo que se visualiza en la Tabla 5. Se generaron 12 combinaciones experimentales diferentes para los dos parámetros positivos y los resultados se muestran en la Tabla 7, en el punto seis se observa la mayor producción de β -glucanos (84,05 g/100 g biomasa), cuando la concentración de bagazo es 12 g/L y de cloruro de amonio es 7,41 g/L. El análisis de varianza (ANOVA) mostró un modelo bastante adecuado para optimizar la producción de β -glucanos, el valor F del modelo fue de 36,44 y el valor P $<0,0001$ sugieren que el modelo es apropiado y aceptable para representar el sistema (Tabla 8). También indica que solo la concentración de cloruro de amonio fue significativa con un valor de ($p=0,0002$).

En la investigación realizada por Bhardwaj *et al.*, (2021), el resultado de ANOVA del diseño central compuesto mostró que el valor F del modelo es de 44,24 y el valor P de $<0,0001$, lo que implica que el modelo fue significativo y adecuado para representar el sistema, las variables significativas fueron, tamaño del inóculo (1,0%, v/v), pH (8,0), concentración de peptona (1,5%, p/v) y concentración de aceite de semilla de algodón (4,0%, v/v)), obteniendo que la máxima producción de esterasa fue de 9,77 U/ml. El valor del coeficiente de determinación R^2 (0,9102) indicó que el modelo explica el 91% de la variabilidad en la respuesta y señaló la precisión del modelo.

Tabla 7

Diseño central compuesto y sus valores de producción de β -glucanos correspondientes.

Las variables constantes fueron: pH (4,5), temperatura (27,5 °C) y tiempo (6 días).

| | Bagazo (g/L) | Cloruro de amonio (g/L) | Producción de β-glucanos (g/100 g biomasa) |
|-----------|-------------------------|------------------------------------|--|
| 1 | 12 | 6 | 24,60 \pm 0,43 |
| 2 | 12 | 6 | 15,92 \pm 0,01 |
| 3 | 12 | 6 | 18,13 \pm 1,06 |
| 4 | 12 | 6 | 27,85 \pm 1,75 |
| 5 | 12 | 4,59 | 67,19 \pm 1,39 |
| 6 | 12 | 7,41 | 84,05 \pm 1,87 |
| 7 | 13 | 7 | 74,71 \pm 1,26 |
| 8 | 10,59 | 6 | 58,75 \pm 1,08 |
| 9 | 13,41 | 6 | 44,78 \pm 0,48 |
| 10 | 11 | 5 | 64,98 \pm 1,99 |
| 11 | 11 | 7 | 49,35 \pm 1,34 |
| 12 | 13 | 5 | 36,23 \pm 0,59 |

Nota. Los resultados se expresan como valores medios \pm la desviación estándar.

Tabla 8

Análisis de ANOVA para el Diseño Central Compuesto – Optimización de Superficie de Respuesta.

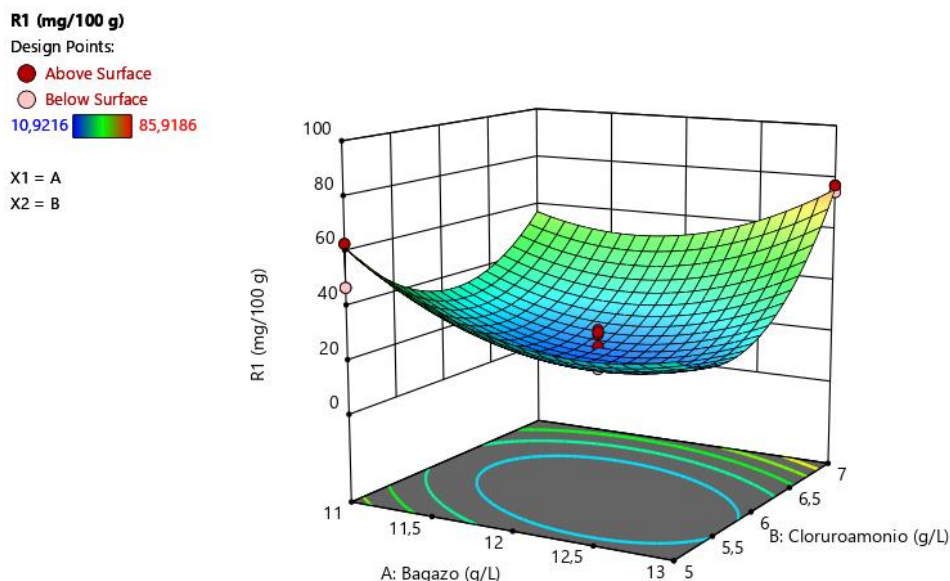
| Fuentes | Suma de cuadrados | df | Cuadrado medio | Valores-F | Valores-p | |
|-------------------------|------------------------------|-----------|---------------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Modelo | 10957,49 | 5 | 2191,5 | 36,47 | < 0,0001 | Significante |
| A. Bagazo | 67,2 | 1 | 67,2 | 1,12 | 0,3043 | |
| B. Cloruro de Amonio | 1290,46 | 1 | 1290,46 | 21,48 | 0,0002 | |
| AB | 1017,48 | 1 | 1017,48 | 16,93 | 0,0007 | |
| A ² | 2500,37 | 1 | 2500,37 | 41,61 | < 0,0001 | |
| B ² | 7467,05 | 1 | 7467,05 | 124,27 | < 0,0001 | |
| Residual | 1081,59 | 18 | 60,09 | | | |
| Falta de ajuste | 416,3 | 3 | 138,77 | 3,13 | 0,0571 | no significante |
| Error puro | 665,29 | 15 | 44,35 | | | |
| Cor Total | 12039,08 | 23 | | | | |

Se encontró que el modelo es significativo, por lo que se generó el gráfico tridimensional para el análisis del diseño central compuesto, que representa la superficie de respuesta para los efectos de interacción de la concentración de bagazo y de cloruro de amonio. En

la zona amarilla-roja del gráfico tridimensional se observa la producción máxima de β -glucanos (84,05 g/100 g biomasa), cuando la concentración de bagazo es 12 g/L y de cloruro de amonio es 7,41 g/L. (Figura 5).

Figura 5

Gráficos de superficie de respuesta tridimensional para la influencia de concertación de bagazo y cloruro de amonio en la producción de β -glucanos.



En un estudio diferente se evaluó la optimización de los procedimientos de extracción de β -glucanos de hongos coliflor (*Sparassis crispa*) mediante la metodología de superficie de respuesta. Investigaron el efecto de 3 parámetros de extracción (pH, tiempo de extracción y proporción de agua a materia prima) sobre el contenido de β -glucano. Se obtuvo ($R^2=0,95$, $p=0,0074$) para el contenido de β -glucano extraído de hongos coliflor. Las condiciones óptimas para la extracción de β -glucano de los hongos coliflor (*Sparassis crispa*) fueron pH 6,05, un tiempo de extracción de 8 h 55 min y una relación de agua a materia prima de 19,74, lo que muestra un 60,76 % del contenido previsto de β -glucano (Bae *et al.*, 2012).

Atta-Allah *et al.* (2023), lograron enriquecer los medios de bajo costo basados en desechos agroindustriales con ingredientes nutricionales mejorando el rendimiento de β -glucano de levadura. La optimización se realizó por medio de Plackett-Burman y el diseño compuesto central de la metodología de superficie de respuesta. Las concentraciones de minerales y vitaminas influyeron significativamente en el rendimiento de β -glucano para *Kluyveromyces lactis* y las fuentes de nitrógeno y fosfato

para *Meyerozyma guilliermondii*. Los rendimientos máximos previstos de β -glucano recuperado de *K. lactis* y *M. guilliermondii* después de optimizar los ingredientes del medio fueron 407 y 1188 mg/100 ml; respectivamente.

De tal manera que con la optimización se logró enriquecer un medio de bajo costo y por ende aportar a la energía circular, ya que se usó como fuente de carbono el bagazo de la industria azucarera. Se obtuvo un crecimiento óptimo de levadura en este medio ya que el bagazo de caña contiene complejos lignocelulósicos, a diferencia del azúcar convencional, el cual se carboniza después del tratamiento del autoclave (Sidana y Farooq, 2014).

Gracias al Diseño de Plackett-Burman, se determinó que el cloruro de amonio fue la fuente de nitrógeno con mayor producción de β -glucanos (170,02 g/100 g de biomasa) y las variables significativas en este diseño fueron la concentración de bagazo ($p=0,0388$) y de cloruro de amonio ($p=0,0211$). En el diseño de ascenso más pronunciado se alcanzó el punto máximo (52,3 g/100 g biomasa) con las siguientes condiciones 12 g/L de bagazo y 6 g/L de cloruro de amonio. Finalmente, la producción de β -glucano optimizado fue de 84,04 g/100 g biomasa; al mantener las concentraciones de bagazo y cloruro de amonio en los niveles óptimos. Para este diseño tan solo la concentración de cloruro de amonio fue significativa con un valor de ($p=0,0002$). Cualquier cambio en las concentraciones de las variables, ya sea aumentando o disminuyendo por encima de los valores óptimos, afecta negativamente los rendimientos de β -glucano (Figura 5). Los valores óptimos de las concentraciones de bagazo y cloruro de amonio fueron 12 g/L y 7,41 g/L; respectivamente.

4.2. FASE 2. Elaboración del yogur funcional.

4.2.1. Prueba sensorial de escala hedónica.

En la Tabla 9 se observa que, de los 5 atributos, el tratamiento T3 (1,5% de β -glucano), obtuvo la mayor valoración. Como son: color, sabor, viscosidad y aceptación global. A pesar de esto, se obtuvo diferencia significativa en solo dos atributos, sabor ($p=0,00533812$) y aceptación global ($p=0,0135769$).

Tabla 9

Resultado de la Prueba de Kruskal – Wallis del Análisis de Evaluación Sensorial.

| Muestras | Color (50) | Olor (50) | Sabor (50) | Viscosidad (50) | Aceptación Global (50) |
|------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| | Mdn (Rango) | Mdn (Rango) | Mdn (Rango) | Mdn (Rango) | Mdn (Rango) |
| T1 | 4 (3) | 4 (3) | 4 (3) | 3 (4) | 4 (3) |
| T2 | 4 (4) | 4 (3) | 4 (3) | 3 (3) | 3 (3) |
| T3 | 4,5 (3) | 4 (3) | 4,5 (3) | 4 (3) | 4,5 (3) |
| Valor – P | 0,103 | 0,544 | 0,005 | 0,066 | 0,014 |

De los 5 atributos existen diferencias significativas en 2, en el atributo sabor ($p=0,005$) y aceptación global ($p=0,0135769$), se observa que los tratamientos T1 (0,5 de β -glucano) y T2 (1% de β -glucano), tuvieron una menor aceptación en comparación al T3 (1,5 de β -glucano). El T3, tuvo una valoración de 4,5 en los dos atributos, que en la escala hedónica indica “Me gusta moderadamente” y “Me gusta mucho”. Indicando que prefieren el sabor y la aceptación global del yogur con mayor concentración de β -glucanos.

En la investigación realizada por Antontceva *et al.* (2019), fortificaron un yogur con β -glucanos provenientes de hongos ostras, y encontraron que el yogur tuvo mayor aceptación en el atributo de sabor con el tratamiento de mayor concentración de β -glucanos (0,25%) con un valor $p<0,05$. También lograron evidenciar que en los atributos de color y olor no hubo diferencias significativas. Además, en el atributo de consistencia y apariencia, cuando se utilizaron β -glucanos en dosis altas, se detectó heterogeneidad de consistencia, ya que las partículas insolubles de la preparación precipitaron durante el proceso de fermentación, por lo que ellos recomiendan que su posible eliminación puede darse añadiendo un espesante como pectina, agar-agar, tanto en forma pura como en mezclas.

Los investigadores Mejri *et al.* (2014) formularon un yogur sin grasa con β -glucanos de levadura de cerveza gastada. En el ensayo de evolución del color del yogur durante el almacenamiento a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, la luminancia del yogur aumentó significativamente con el aumento de la cantidad de β -glucano del 0,5 al 1,5%. Sin embargo, un análisis sensorial realizado por Brennan y Tudorica, (2008) sobre el yogur con β -glucano, demostró que este no afecta el color ni en el olor en proporciones de 0,5 y 1,5%. Al igual que los panelistas no encontraron diferencias significativas en la viscosidad de las muestras

analizadas. Esto puede indicar que el análisis sensorial realizado no fue lo suficientemente sensible. En términos de aceptación global, las puntuaciones más bajas tuvieron los yogures con menor cantidad de β -glucanos.

De tal manera que los resultados obtenidos van acorde a las investigaciones realizadas, la incorporación de β -glucanos mejora significativamente ($p < 0,05$) el sabor y la aceptación global del producto, ya que mejora las sensaciones del producto en la boca, sintiendo una textura más suave y con mayor viscosidad. Los atributos sensoriales como el color, olor y viscosidad no se vieron afectados por la incorporación de β -glucanos a la formulación. La aceptabilidad general de los productos fue buena, los panelistas mostraron preferencia particular por el tratamiento T3 (1,5 de β -glucanos) con ($p < 0,05$), ya que obtuvo las calificaciones más altas en sabor y aceptabilidad global.

4.2.2. Análisis Microbiológicos.

En la Tabla 10, se observa que los resultados indican valores inferiores a los establecidos en Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395 para Leches Fermentada.

Tabla 10

Análisis microbiológico del tratamiento T3 (1,5 de β -glucano).

| Parámetros Analizados | Unidad | Resultados |
|--|---------------|-------------------|
| Recuento de Coliformes Totales | UFC/g | <10 |
| Recuento de <i>Escherichia coli</i> | UFC/g | 0 |
| Recuento de Aerobios mesófilos | UFC/g | <10 |
| Recuento de Mohos | UFC/g | <10 |
| Recuento de Levaduras | UFC/g | <10 |

Según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395 para Leches Fermentada (INEN, 2011), establece que los productos proveniente de leches fermentadas deben cumplir con los requisitos para que sean aptas al consumo humano. Los resultados de la Tabla 10, indican que el yogur con 1,5 de β -glucano, tuvo en todos los microorganismos una incidencia menor a 10 UFC/g, dando conformidad a la Norma (INEN, 2011) y por ende siendo apto para el consumo humano.

Acorde a lo mencionado, en la investigación realizada por Elsanhoty y Ramadan (2018) se demostró que la adición de β -glucanos mejora la supervivencia de las bacterias

probióticas durante el almacenamiento. Además, de que no hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos en la calidad microbiológica. Indicando que la adición de β -glucano a la leche no tuvo efecto sobre los recuentos microbianos totales.

Al igual que en la investigación realizada por Peña (2021), determinaron que en una bebida no láctea enriquecida con β -glucano a base de salvado de avena y harina de cebada, los recuento UFC/ml de *E. coli*, aerobios mesófilos, mohos y levaduras están por debajo de los máximos permitidos lo que indica que la bebida cumple satisfactoriamente con los parámetros microbiológicos y que puede ser apta para el consumo humano sin generar afectaciones en la salud y bienestar de las personas.

4.2.3. Análisis físicoquímico.

En la Tabla 11, se observa que los resultados indican valores inferiores a los establecidos en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395 para Leches Fermentada.

Tabla 11

Análisis físicos químicos del yogur natural (YN), yogur con fruta (YF) y del tratamiento T3 (1,5 de β -glucano).

| Tratamientos | Cenizas | Sólidos Totales | pH | Acidez |
|--------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| YN | 0,83 \pm 0,02 ^a | 7,56 \pm 0,72 ^a | 4,52 \pm 0,12 ^a | 0,92 \pm 0,03 ^a |
| YF | 0,87 \pm 0,01 ^a | 7,66 \pm 1,22 ^a | 4,51 \pm 0,10 ^a | 0,92 \pm 0,03 ^a |
| T3 | 0,92 \pm 0,02 ^a | 6,99 \pm 0,32 ^a | 4,52 \pm 0,10 ^a | 0,92 \pm 0,03 ^a |

Nota. Los resultados se expresan como valores medios \pm la desviación estándar. Letras iguales en la misma columna no indican diferencia estadística al 95% de confianza.

En la Tabla 11, se observa que no hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) en los valores de pH. Las mediciones del valor de pH se realizaron de manera inmediata después de la elaboración del producto. Los resultados van acorde con lo encontrado en la investigación realizada por Hamid y Doosh (2021), en los yogures con β -glucano los valores de pH fueron de 4,57, 4,56 y 4,55. En esta investigación se midió el pH durante el almacenamiento, y los valores de pH disminuyeron en todos los tratamientos con β -glucanos a 4,31, 4,30 y 4,28. También Pappa *et al.* (2018), en su investigación observo que el valor de pH no tiene diferencia significativa en el momento de la fabricación, pero

observó que después de 21 días el valor de pH disminuyó en los yogures con β -glucanos de 4,29 a 4,26. Se debe principalmente por la fermentación continua de la lactosa en ácido láctico (Hamid y Doosh, 2021).

Los valores de acidez para los diferentes tratamientos se muestran en la Tabla 11, las mediciones se realizaron de manera inmediata después de la elaboración del producto. Se observa que no existe diferencia significativa en los 3 tratamientos, tanto para los tratamientos controles YN (Yogur Natural) y YF (Yogur con Fruta), como para el T3 (1,5 de β -glucano) ($p > 0,05$). Los valores de acidez fueron de 0,92, el cual se encuentra en el rango permisivo para los yogures que va de 0,9 – 1% (A. Espinoza y Zapata, 2010). Estos resultados coincide con Abbas *et al.* (2024), quienes encontraron que la acidez para los yogures con β -glucanos fue de 0,96%. Según Nikoofar *et al.* (2013), los yogures con β -glucanos aumentan su acidez después del almacenamiento, ya que los β -glucanos aumentan la producción de ácido acético y ácido propiónico.

Los valores de ceniza, humedad y sólidos totales no difieren significativamente entre los 3 tratamientos YN, YF y T3 ($p > 0,05$). Según Pappa *et al.* (2018), los valores de sólidos totales para los yogures controles y con β -glucanos no difirieron ($p > 0,05$). Mientras que para los valores de humedad hubo una diferencia significativa ($p < 0,005$), debido a que ellos añadieron el β -glucano en forma de pasta, aumentando el peso del yogur y por ende el contenido de agua en la leche.

Los 3 tratamientos YN (Yogur Natural), YF (Yogur con Fruta) y T3 (1,5 de β -glucanos), cumplieron con los requisitos establecido en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395 para Leches Fermentada (INEN, 2011), por lo que los productos son aptos para el consumo humano.

4.2.4. Análisis nutricionales.

En la Tabla 12, se observa que los resultados indican valores acordes a los establecidos en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395 para Leches Fermentada.

Tabla 12

Análisis nutricionales del yogur natural (YN), yogur con fruta (YF) y del tratamiento T3 (1,5 de β -glucano).

| Tratamientos | Proteínas | Grasas |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|
| YN | 3,44 \pm 0,23 ^a | 1,17 \pm 0,29 ^a |
| YF | 3,46 \pm 0,13 ^a | 1,00 \pm 0,00 ^a |
| T3 | 3,54 \pm 0,25 ^a | 1,33 \pm 0,29 ^a |

Nota. Los resultados se expresan como valores medios \pm la desviación estándar. Letras iguales en la misma columna no indican diferencia estadística al 95% de confianza.

En la Tabla 12, se observa que no hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) en los valores de proteína y grasa. Las mediciones de proteínas y grasas se realizaron de manera inmediata después de la elaboración del producto. Los resultados van acorde con lo encontrado en la investigación realizada por Hamid y Doosh (2021), en los yogures con β -glucano los valores de proteínas fueron de 3.51, 3.38 y 3.32%, evidenciando que no hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) después de la fabricación del yogur. Durante el almacenamiento el porcentaje de proteína incremento a 3.66, 3.45 y 3.43%. Estos resultados coinciden con la investigación realizada por Brennan y Tudorica (2008), donde evidencio el aumento en el contenido de proteína en los tratamientos de yogur de 4.76 a 4.80 después del almacenamiento de 15 días. La razón del aumento del contenido de proteínas se puede deber a la disminución del contenido de humedad, lo que llevó al alto porcentaje de sólidos totales, incluida la proteína (Hamid y Doosh, 2021).

Los valores de grasa para los diferentes tratamientos se muestran en la Tabla 12, las mediciones se realizaron de manera inmediata después de la elaboración del producto. Se observa que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) en los 3 tratamientos, tanto para los tratamientos controles YN (Yogur Natural) y YF (Yogur con Fruta), como para el T3 (1,5 de β -glucano). En la investigación realizada por Hamid y Doosh (2021), los yogures con β -glucanos aumentaron el porcentaje de grasa en comparación a los yogures controles, tal y como se observa en la Tabla 12, en los tratamientos controles YN y YF, se obtuvo 1.17 y 1.00 respectivamente; mientras que en el T3 se obtuvo 1.33 de grasa. Esto puede deberse al aumento de sólidos totales al agregar los β -glucanos.

Los 3 tratamientos YN (Yogur Natural), YF (Yogur con Fruta) y T3 (1,5 de β -glucanos), cumplieron con los requisitos establecidos para proteína y grasa en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395 para Leches Fermentada (INEN, 2011), por lo que los productos son aptos para el consumo humano.

4.2.5. Actividad Antioxidante.

La actividad antioxidante de los 3 tratamientos de yogures, YN (Yogur Natural), YF (Yogur con Fruta) y T3 (1,5 de β -glucano) se determinó mediante la actividad eliminadora de radicales libres. La actividad eliminadora de radicales DPPH es sencilla y potencialmente precisa con respecto a la medición de la actividad eliminadora de radicales libres de las bebidas. Esta metodología se basa en la reducción del radical libre estable DPPH que se absorbe fuertemente a 517 nm (Sendra *et al.*, 2006). Los resultados de la actividad antioxidantes de los yogures se presentan en la Tabla 13. Se encontraron diferencias significativas en la actividad eliminadora de radicales DPPH entre los 3 distintos tratamientos de yogur ($p < 0.05$).

Tabla 13

Capacidad antioxidante de los 3 distintos tratamientos, yogur natural (YN), yogur con fruta (YF) y del tratamiento T3 (1,5 de β -glucano).

| Tratamientos | Actividad Antioxidante |
|---------------------|-------------------------------|
| YN | 49,11 \pm 1,52 ^a |
| YF | 64,85 \pm 0,36 ^b |
| T3 | 75,88 \pm 0,63 ^c |

Nota. Los resultados se expresan como valores medios \pm la desviación estándar. Letras iguales en la misma columna indican diferencia estadística al 95% de confianza.

Se observa que la actividad antioxidante del YN (Yogur con Fruta) (64,85%) fue significativamente mayor que la de la muestra de YN (Yogur Natural) (49,11%). La actividad eliminadora de radicales DPPH del YF, aumentó por la jalea de fruta de mora. Según Pereira *et al.* (2013), la adición de jalea de frutas (aditivos naturales) al yogur parece favorecer el contenido de antioxidantes y por ende la actividad antioxidante. El yogur de mora mostró el mayor contenido de tocoferoles (0,94 mg/100 g) en comparación

a los yogures de piña, cereza y bayas. Los tocoferoles, son antioxidantes que protegen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas de la per oxidación lipídica. Además de presentar una actividad antioxidante de 43,61 %.

También se observa en la Tabla 13, que la actividad antioxidante del T3 (1,5 de β -glucano) (75,88 %) fue significativamente mayor que la de la muestra de YF (Yogur con Fruta) (64,85%). Evidenciando que existe una actividad sinérgica entre los β -glucanos más la fruta en el yogur, por lo que la actividad eliminadora de radicales DPPH, aumentó al agregar los β -glucanos. La actividad eliminadoras de radicales libres están relacionadas con la cantidad de grupos hidroxilo en los β -glucanos (Utama *et al.*, 2020). El β -(1,3-1,4)-glucano que se extrae de la levadura demostró una actividad eliminadora de radicales hidroxilo preferible que el β -glucano extraído de cereales y mohos (Kofuji *et al.*, 2012).

Según Kuswendi *et al.* (2020) el β -glucano actúa como antioxidante ya que es donador de electrones, que puede unirse a radicales libres con electrones libres, provocando la inhibición del daño. Caso contrario, los radicales libres contaminarían las células biológicas del cuerpo, debido a que sus componentes inestables impulsan los electrones libres a formar enlaces con los macrófagos del cuerpo provocando la inactividad de una célula o la muerte celular (Utama *et al.*, 2020).

Por lo cual, se comprobó que el β -glucano no modifica las propiedades microbiológicas, fisicoquímicas y nutricionales del yogur; ya que el β -glucano no es añadido para aumento de proteína o grasa. Pero si es añadido para brindar una funcionalidad al alimento, en este caso el β -glucano añadido al yogur le brindó una actividad eliminadora de radiales libres, haciendo que el yogur sea una bebida láctea funcional.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

Se evidencia que la caña de azúcar como residuo agroindustrial puede ser utilizado como fuente de carbono para la obtención de β -glucanos de la levadura *Wickerhamomyces anomalus*; reduciendo el impacto ambiental y contribuyendo a los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) de la agenda 2030 de la UNESCO.

Mediante el diseño de Plackett Burman, se determinó que la fuente de nitrógeno que produjo la mayor cantidad de β -glucanos fue el cloruro de amonio, debido a que en este caso los microorganismos prefieren el nitrógeno inorgánico. Las variables significativas en este tratamiento fueron las cantidades de bagazo y cloruro de amonio.

En el diseño de ascenso más pronunciado, se alcanzó el punto máximo (52,3 g/100 g biomasa) en el tercer paso y no se logró ninguna mejora adicional en la respuesta a pesar de aumentar las concentraciones de nutrientes. Debido a que, en la fase estacionaria del crecimiento microbiano, existe una acumulación de desechos que inhiben su crecimiento provocando que este sea limitado a pesar de que se agregue mayor concentración de nutrientes.

En el Diseño Central Compuesto, se determinó el nivel óptimo para la obtención de β -glucanos, la mayor producción fue de 84,05 g/100 g biomasa, usando 12 g/L de bagazo y de 7,41 g/L de cloruro de amonio. Solo la concentración de cloruro de amonio fue significativa con un valor de ($p=0,0002$). El valor del coeficiente de determinación R^2 fue (0,9102).

Los panelistas mostraron preferencia particular por el tratamiento T3 (1,5 de β -glucanos) con ($p<0,05$), ya que obtuvo las calificaciones más altas en sabor y aceptabilidad global,

debido a que los β -glucanos mejoran las sensaciones en la boca del producto, sintiendo una textura más suave y con mayor viscosidad.

Se determinó que los tratamientos de yogures YN (Yogur Natural), YF (Yogur con Fruta) y T3 (1,5 de β -glucanos), cumplieron con los parámetros de microbiología, físicoquímicos y nutricionales, establecidos en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395 para Leches Fermentada (INEN, 2011), por lo que los productos son aptos para el consumo humano.

En los análisis microbiológicos, físicoquímicos y nutricionales, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de yogures YN (Yogur Natural), YF (Yogur con Fruta) y T3 (1,5 de β -glucanos); debido a que los β -glucanos añadidos no poseen proteínas o grasas que modifiquen la composición nutricional, además de que no alteran los análisis microbiológicos ni físicoquímicos.

El T3 (1,5 de β -glucano) presentó la mayor actividad eliminadora de radicales DPPH con un 75,88 %, la cual fue significativamente mayor que la de la muestra de YF (Yogur con Fruta) (64,85%) y que la muestra YN (Yogur Natural) (49,11%), evidenciando que existe una actividad sinérgica entre los β -glucanos más la fruta en el yogur, por lo que la actividad eliminadora de radicales DPPH, aumentó al agregar los β -glucanos.

5.2. Recomendaciones.

Analizar los parámetros microbiológicos, físicoquímicos, nutricionales y actividad antioxidante de los yogures durante el almacenamiento de 15 a 21 días, con el fin de evidenciar si los β -glucanos alteran las propiedades de los yogures durante este periodo.

Realizar análisis reológicos de los tratamientos de yogures con el fin de evidenciar los cambios en la viscosidad al agregar los β -glucanos al yogur.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abbas, H. M., El-Gawad, M. A. M. A., Kassem, J. M., & Salama, M. (2024). Application of fat replacers in dairy products: A review. *Foods and Raw Materials*, 12(2), 319–333. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-2-612>
- Abdeshahian, P., Ascencio, J. J., Philippini, R. R., Antunes, F. A. F., dos Santos, J. C., & da Silva, S. S. (2020). Utilization of sugarcane straw for production of β -glucan biopolymer by *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966 in batch fermentation process. *Bioresource Technology*, 314(March), 123716. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123716>
- Ahmad, M., Gani, A., Shah, A., Gani, A., & Masoodi, F. A. (2016). Germination and microwave processing of barley (*Hordeum vulgare* L) changes the structural and physicochemical properties of β -d-glucan & enhances its antioxidant potential. *Carbohydrate Polymers*, 153, 696–702. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.07.022>
- Alvarado, G. (2021). *Obtención de bioetanol a partir del bagazo de la caña de azúcar mediante hidrólisis enzimática.* 126. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/21229>
- Amata, I. A. (2013). Review article YEAST A SINGLE CELL PROTEIN: CHARACTERISTICS and METABOLISM AMATA , I . A Department of Animal Science , Delta State University , Asaba Campus , Delta State , Nigeria. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4, 158–170.
- Antontceva, E., Belyakova, T., Zabodalova, L., & Shamtsyan, M. (2019). *Fortification of yogurt with β -glucans from oyster mushroom.* February 2022, 50–54. <https://doi.org/10.22616/foodbalt.2019.038>
- AOAC. (2023). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* (22nd Editi).
- Arous, F., Azabou, S., Jaouani, A., Zouari-Mechichi, H., Nasri, M., & Mechichi, T. (2016). Biosynthesis of single-cell biomass from olive mill wastewater by newly isolated yeasts. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), 6783–6792. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-5924-2/METRICS>
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2008). *Constitucion Política Del Ecuador 2008.* Quito-Ecuador, 119. <https://n9.cl/gr4e>
- Ascencio, J. J., Philippini, R. R., Gomes, F. M., Pereira, F. M., da Silva, S. S., Kumar, V., & Chandel, A. K. (2021). Comparative highly efficient production of β -glucan by *lasiodiplodia theobromae* cct 3966 and its multiscale characterization. *Fermentation*,

- 7(3), 108. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION7030108/S1>
- Atta-Allah, A. A., Ahmed, R. F., Shahin, A. A. M., Hassan, E. A., El-Bialy, H. A. A., & El-Fouly, M. Z. (2023). Optimizing the synthesis of yeast Beta-glucan via response surface methodology for nanotechnology application. *BMC Microbiology*, 23(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02845-6>
- 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>
- Bae, I. Y., Kim, K. J., Lee, S., & Lee, H. G. (2012). Response surface optimization of β -glucan extraction from cauliflower mushrooms (*Sparassis crispa*). *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1031–1035. <https://doi.org/10.1007/S10068-012-0134-X/METRICS>
- Banco Central del Ecuador. (2022). *Boletín de Análisis Agropecuario - Resultado al cuarto trimestre de 2021*. <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Encuestas/Coyuntura/Integradas/etc202104.pdf>
- Bhardwaj, K. K., Kumar, R., Bhagta, S., & Gupta, R. (2021). Optimization of culture conditions by response surface methodology for production of extracellular esterase from *Serratia* sp. EST-4. *Journal of King Saud University - Science*, 33(8), 101603. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2021.101603>
- Brennan, C. S., & Tudorica, C. M. (2008). Carbohydrate-based fat replacers in the modification of the rheological, textural and sensory quality of yoghurt: comparative study of the utilisation of barley beta-glucan, guar gum and inulin. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(5), 824–833. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2007.01522.X>
- Broach, J. R. (2012). Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics*, 192(1), 73–105. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.111.135731>
- 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. *Food Hydrocolloids*, 133, 107963. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.107963>
- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91–100.
- Chandel, A. K., Garlapati, V. K., Jeevan Kumar, S. P., Hans, M., Singh, A. K., & Kumar,

- S. (2020). The role of renewable chemicals and biofuels in building a bioeconomy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(4), 830–844. <https://doi.org/10.1002/BBB.2104>
- Chirsanova, A. I., Boistean, A. V., Chiseliță, N., Siminiuc, R., A II, K., A B, B., H, K., & P, C. (2021). Impact of yeast sediment beta-glucans on the quality indices of yoghurt. *Food Systems*, 4(1), 12–18. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-1-12-18>
- Corporacion Financiera Nacional. (2021). *Cultivo de caña de azúcar. elaboración y refinado de azúcar de caña y melaza de caña; remolacha azucarrera, etc. Venta al por mayor de azúcar, chocolate y productos de confitería. 1(1), 24.*
- Elsanhoty, R. M., & Ramadan, M. F. (2018). Changes in the physicochemical and microbiological properties of probiotic-fermented low-fat yoghurt enriched with barley β -glucan during cold storage. *Mljekarstvo*, 68(4), 295–309. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2018.0405>
- Espinoza, A., & Zapata, L. (2010). Estudio de yogur: Verificación de Producto, Evaluación de Calidad e Información Nutricional. *Odecus, Verificación de Producto, Evaluación de Calidad e Información Nutricional*, 27. <https://www.odecu.cl/wp-content/uploads/2017/12/2010-estudio-yogur.pdf>
- Espinoza, J. (2007). Evaluación sensorial de alimentos: In *Manual de prácticas de Ingeniería de Alimentos*. <https://doi.org/10.2307/j.ctv2175hnh.7>
- Feng, J., Zhang, W., Han, L., & Zhang, X. (2011). Statistical optimization of medium components to improve the antibiotic activity of *Streptomyces* sp. 19G-317. *African Journal of Agricultural Research*, 6(19), 4424–4431. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.945>
- García Martínez, E., & Fernandez Segovia, I. (2013). Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte. *Universidad Politecnica de Valencia*.
- García Ramos, C., Quirós Roque, V., & Rosales Mendoza, L. (2022). Los residuos generados en la producción de la industria azucarera en los últimos 25. *Eco Intensificacion*, 8, núm. 16, 1979–1991. <https://doi.org/https://doi.org/10.5377/ribcc.v8i16.15041>
- Genny, T., Silva, E., Cristina, A., Jordão, S., Pontes, E., Musetti, M. A., & Ometto, A. R. (2021). Economía circular. *Revista Produção Online*, 21(3), 951–972. <https://doi.org/10.14488/1676-1901.V21I3.4354>
- Go, V. L. W., Nguyen, C. T. H., Harris, D. M., & Lee, W. N. P. (2005). Nutrient-gene

- interaction: metabolic genotype-phenotype relationship. *The Journal of Nutrition*, 135(12 Suppl). <https://doi.org/10.1093/JN/135.12.3016S>
- Gonzalez, J. M., & Aranda, B. (2023). Microbial Growth under Limiting Conditions-Future Perspectives. *Microorganisms*, 11(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071641>
- Gutiérrez-Antonio, C., Lira-Flores, J. A. De, Quiroz-Pérez, E., & Martínez-Guido, S. I. (2020). Conversión de residuos agroindustriales para la generación de biocombustibles, productos de valor agregado y bioenergía. *Digital Ciencia@UAQRO*, 13(1), 27–35. <https://revistas.uaq.mx/index.php/ciencia/article/view/41>
- Hamid, A. I., & Doosh, K. S. (2021). Studying of Physicochemical and Sensory Properties of Reduced Fat Yogurt Manufactured by Adding Beta-Glucan of Barley. *Annals of the Romanian Society for Cell ...*, January. <http://annalsofrscb.ro/index.php/journal/article/view/2880%0Ahttp://annalsofrscb.ro/index.php/journal/article/download/2880/2391>
- HealthLink BC. (2023). *Alimentación Saludable*. <https://www.healthlinkbc.ca/health-topics/healthy-eating>
- INEN. (2011). NTE INEN 2395 - Leches Fermentadas. *Norma Técnica Ecuatorina Nte Inen 2395:2011*, 2395(V), 2–8. http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/NORMAS_2014/ACO/17122014/nte-inen-2395-2r.pdf
- Jach, M. E., Serefko, A., Ziaja, M., & Kieliszek, M. (2022). Yeast Protein as an Easily Accessible Food Source. *Metabolites*, 12(1), 63. <https://doi.org/10.3390/METABO12010063/S1>
- Kleijnen, J., & Angun, E. (2004). Response surface methodology; steepest ascent and step size revisited. *European Journal of Operational Research*. https://www.academia.edu/5157628/Response_surface_methodologys_steepest_ascent_and_step_size_revisited
- Kofuji, K., Aoki, A., Tsubaki, K., Konishi, M., Isobe, T., & Murata, Y. (2012). Antioxidant Activity of β -Glucan. *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 1–5. <https://doi.org/10.5402/2012/125864>
- Kowalski, S. M., Borrór, C. M., & Montgomery, D. C. (2005). A modified path of steepest ascent for split-plot experiments. *Journal of Quality Technology*, 37(1), 75–83. <https://doi.org/10.1080/00224065.2005.11980302>

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726–732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Kuswendi, H., Kusumawati, E. D., & Utama, G. L. (2020). The Functional Aspects and Potential of Fungi Based β -Glucan. *International Journal on Emerging Technologies*, 11(4), 1–11.
- Liu, X. Y., Wang, Q., Cui, S. W., & Liu, H. Z. (2008). A new isolation method of β -glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids*, 22(2), 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.11.008>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010a). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010b). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. In *Pharmacognosy Reviews* (Vol. 4, Issue 8, pp. 118–126). Wolters Kluwer -- Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., & Luis Fernando Restrepo-Betancur, E. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales Comparison of methods using sulfuric acid for determination of total sugars. *Rev. Cubana Quím*, 29(2), 2224–5421. <http://ojs.uo.edu.cu/index.php/cq>
- Mah, E., Kaden, V. N., Kelley, K. M., & Liska, D. A. J. (2020). Beverage Containing Dispersible Yeast β -Glucan Decreases Cold/Flu Symptomatic Days After Intense Exercise: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Dietary Supplements*, 17(2), 200–210. <https://doi.org/10.1080/19390211.2018.1495676>
- Mahapatra, S., & Banerjee, D. (2013). Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 627–634. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.039>
- Mejri, W., Bornaz, S., & Sahli, A. (2014). Formulation of non-fat yogurt with β -glucan from spen brewer's yeast. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 8, 163–173.
- Melati, R., Schmatz, A., Pagnocca, F., & Contiero, J. (2017). Sugarcane bagasse: Production, composition, properties, and feedstock potential. In *Chapter*. https://www.researchgate.net/publication/317770155_Sugarcane_bagasse_Producti

on_composition_properties_and_feedstock_potential

- Mendoza¹, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 15–23.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Mo, L., Chen, Y., Li, W., Guo, S., Wang, X., An, H., & Zhan, Y. (2017). Anti-tumor effects of (1 → 3)-β-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* in S180 tumor-bearing mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 385–392.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.106>
- Morales, D. (2023). Food By-Products and Agro-Industrial Wastes as a Source of β-Glucans for the Formulation of Novel Nutraceuticals. *Pharmaceuticals*, 16(3), 1–12.
<https://doi.org/10.3390/ph16030460>
- Mostacilla, S. R., & Sandino, M. (2013). Propuesta metodológica para la gestión de residuos en la industria azucarera usando lean manufacturing Methodological proposal for including lean manufacturing in sugar industry waste management. *Magazín Empresarial*, 9(21), 59–65.
- Mykhalevych, A., Polishchuk, G., Nassar, K., Osmak, T., & Buniowska-Olejniak, M. (2022). β-Glucan as a Techno-Functional Ingredient in Dairy and Milk-Based Products—A Review. *Molecules*, 27(19).
<https://doi.org/10.3390/molecules27196313>
- Nakashima, A., Yamada, K., Iwata, O., Sugimoto, R., Atsuji, K., Ogawa, T., Ishibashi-Ohgo, N., & Suzuki, K. (2018). β-Glucan in Foods and Its Physiological Functions. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64(1), 8–17.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.64.8>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803.
https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.9B01285/SUPPL_FILE/NP9B01285_SI_009.PDF
- Nikoofar, E., Hojjatoleslamy, M., Shakerian, A., Molavi, H., & Shariaty, M. A. (2013). Surveying the Effect of Oat Beta Glucan As a Fat Replacer on Rheological and Physicochemical Characteristics of Non Fat Set Yoghurt. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2(20), 790–796.
- Olawoye, B. (2021). Design of Experiment - A COMPREHENSIVE HANDOUT ON

- CENTRAL COMPOSITE DESIGN (CCD). *Statistical and Multivariate Analysis in Material Science*, July 2016, 46–82. <https://doi.org/10.1201/b21873-4>
- Pang, G. chang, Xie, J. bo, Chen, Q. sen, & Hu, Z. he. (2012). How functional foods play critical roles in human health. *Food Science and Human Wellness*, 1(1), 26–60. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2012.10.001>
- Pappa, E. C., Kondyli, E., MacNaughtan, W., Kakouri, A., Nesseris, K., & Israilides, C. (2018). Quality and Sensory Properties of Reduced Fat Yoghurt Made with Addition of β -Glucans. *Food and Nutrition Sciences*, 09(04), 390–402. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.94031>
- Peña, D. (2021). *DESARROLLO DE UNA BEBIDA NO LÁCTEA ENRIQUECIDA CON BETAGLUCANO A BASE DE SALVADO DE AVENA Y HARINA DE CEBADA* [Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano]. [https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/22327/Documento Escrito. Tesis MIPSI. Daniela Peña.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/22327/Documento%20Escrito.%20Tesis%20MIPSI.%20Daniela%20Pe%C3%91a.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Pereira, E., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Relevance of the mention of antioxidant properties in yogurt labels: In vitro evaluation and chromatographic analysis. *Antioxidants*, 2(2), 52–61. <https://doi.org/10.3390/antiox2020062>
- Pylak, M., Oszust, K., & Fraç, M. (2021). Optimization of growing medium and preservation methods for plant beneficial bacteria, and formulating a microbial biopreparation for raspberry naturalization. *Agronomy*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/agronomy11122521>
- Raita, S., Kusnere, Z., Spalvins, K., & Blumberga, D. (2022). Optimization of Yeast Cultivation Factors for Improved SCP Production. *Environmental and Climate Technologies*, 26(1), 848–861. <https://doi.org/10.2478/rtuect-2022-0064>
- Reyes J., & Ludeña F. (2015). Evaluación de las Características Físico-Químicas, Microbiológicas y Sensoriales de un Yogur Elaborado con Sucralosa y Estevia. *Revista Politecnica*, 36(2), 9.
- Rizal, S., Murhadi, Kustyawati, M. E., & Hasanudin, U. (2020). Growth optimization of *saccharomyces cerevisiae* and *rhizopus oligosporus* during fermentation to produce tempeh with high β -glucan content. *Biodiversitas*, 21(6), 2667–2673. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210639>
- Roberfroid, M. B. (1999). What is beneficial for health? The concept of functional food. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9–10), 1039–1041. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00080-0)

- Rojo, M. C., Talia, P. M., Lerena, M. C., Ponsone, M. L., Gonzalez, M. L., Becerra, L. M., Mercado, L. A., Martín-Arranz, V., Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., & Combina, M. (2023). Evaluation of different nitrogen sources on growth and fermentation performance for enhancing ethanol production by wine yeasts. *Heliyon*, *9*(12), e22608. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E22608>
- Salem, S. A., Hamad, E. M., & Ashoush, I. S. (2016). Effect of Partial Fat Replacement by Whey Protein, Oat, Wheat Germ and Modified Starch on Sensory Properties, Viscosity and Antioxidant Activity of Reduced Fat Ice Cream. *Food and Nutrition Sciences*, *07*(06), 397–404. <https://doi.org/10.4236/fns.2016.76041>
- Sampieri Hernández, R., Collado Fernández, C., & Lucio Baptista, P. (2002). *Metodología de la Investigación*. McGraw-Hill Interamericana.
- Sendra, J. M., Sentandreu, E., & Navarro, J. L. (2006). Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *European Food Research and Technology*, *223*(5), 615–624. <https://doi.org/10.1007/S00217-005-0243-3/METRICS>
- Sidana, A., & Farooq, U. (2014). Sugarcane Bagasse: A Potential Medium for Fungal Cultures. *Chinese Journal of Biology*, *2014*, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/840505>
- Singh, M., Kim, S., & Liu, S. X. (2012). Effect of purified oat β -glucan on fermentation of set-style yogurt mix. *Journal of Food Science*, *77*(8). <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2012.02828.X>
- Suárez, Machín; Garrido, C. (2016). *Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>
- Sushytskyi, L., Synytsya, A., Čopíková, J., Lukáč, P., Rajsiglová, L., Tenti, P., & Vannucci, L. E. (2023). Perspectives in the Application of High, Medium, and Low Molecular Weight Oat β -d-Glucans in Dietary Nutrition and Food Technology—A Short Overview. *Foods*, *12*(6), 1121. <https://doi.org/10.3390/foods12061121>
- Tomova, A. A., Vengelova, A., Ventsislava, K. & Petrova, Y., Kujumdzieva, A. V., & Yankova Petrova, V. (2019). Carbon source influences Saccharomyces cerevisiae yeast cell survival strategies: quiescence or sporulation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *33*(1), 1464–1470. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1674188>
- Trocine, L., & Malone, L. C. (2000). Finding important independent variables through

- screening designs: A comparison of methods. *Winter Simulation Conference Proceedings, 1*, 749–754. <https://doi.org/10.1109/WSC.2000.899789>
- Tsiapali, E., Whaley, S., Kalbfleisch, J., Ensley, H. E., Browder, I. W., & Williams, D. L. (2001). Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*(4), 393–402. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00485-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00485-8)
- UNESCO IESALC. (2023). Directrices generales para la implementación de la sostenibilidad en instituciones de educación superior. *Instituto Internacional de La UNESCO Para La Educación Superior En América Latina y El Caribe (IESALC)*, 23. <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/igo/>
- Utama, G. L., Dio, C., Lembong, E., Cahyana, Y., & Balia, R. L. (2020). Microorganism-based β -glucan production and their potential as antioxidant. *Systematic Reviews in Pharmacy*, *11*(10), 868–873. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.10.130>
- Vanaja, K., & Rani, R. H. S. (2007). Design of experiments: Concept and applications of plackett burman design. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, *24*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1080/10601330701220520>
- Varelas, V., Tataridis, P., Liouni, M., & Nerantzis, E. T. (2016). Valorization of Winery Spent Yeast Waste Biomass as a New Source for the Production of β -Glucan. *Waste and Biomass Valorization*, *7*(4), 807–817. <https://doi.org/10.1007/S12649-016-9530-4/METRICS>
- Vargas, Y. A., & Pérez, L. I. P. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, *14*(1), 59–72. <https://doi.org/10.18359/RFCB.3108>
- Villalva, F. J., Cravero Bruneri, A. P., Vinderola, G., Gonçalves de Oliveira, E., Paz, N. F., & Ramón, A. N. (2018). Formulation of a peach ice cream as potential symbiotic food. *Food Science and Technology (Brazil)*, *37*(3), 456–461. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.19716>
- Yan Yun, T. I., Jun Feng, R., Bo Zhou, D., Yun Pan, Y., Feng Chen, Y., Wang, F., Yan Yin, L., Dong Zhang, Y., & Hui Xie, J. (2018). *Optimization of fermentation conditions through response surface methodology for enhanced antibacterial metabolite production by Streptomyces sp. 1-14 from cassava rhizosphere*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206497>
- Ye, M., Ren, L., Wu, Y., Wang, Y., & Liu, Y. (2013). Quality characteristics and antioxidant activity of hickory-black soybean yogurt. *Lwt*, *51*(1), 314–318.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.027>

Yilmaztekin, M., Cabaroğlu, T., & Erten, H. (2013). Effects of Fermentation Temperature and Aeration on Production of Natural Isoamyl Acetate by *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *BioMed Research International*, 2013.

<https://doi.org/10.1155/2013/870802>

Żbikowska, A., Kupiec, M., Szymanska, I., Osytek, K., Kowalska, M., Marciniak-Lukasiak, K., & Rutkowska, J. (2020). Microbial β -glucan Incorporated into Muffins: Impact on Quality of the Batter and Baked Products. *Agriculture 2020*, Vol. 10, Page 126, 10(4), 126. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE10040126>

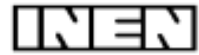
Zhang, K., Zhou, W., Wang, W., Zhao, S., Lin, C., Ru, X., Guan, J., Cong, H., & Yang, Q. (2023). Area Gene Regulates the Synthesis of β -Glucan with Antioxidant Activity in the *Aureobasidium pullulans*. *Foods*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/foods12030660>

Zheng, Z., Deng, W., Li, Y., Song, H., & Chen, S. (2022). Extraction, physiological function and application of soluble dietary fiber from edible fungi: a review. *Food Science and Technology (Brazil)*, 42, 1–9. <https://doi.org/10.1590/fst.35422>

ANEXOS.

Anexo A

Norma técnica Ecuatoriana 2395



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 2395:2011
Segunda revisión



LECHES FERMENTADAS. REQUISITOS.

Primera Edición

FERMENTE MILKS. REQUIREMENTS.

Anexo B

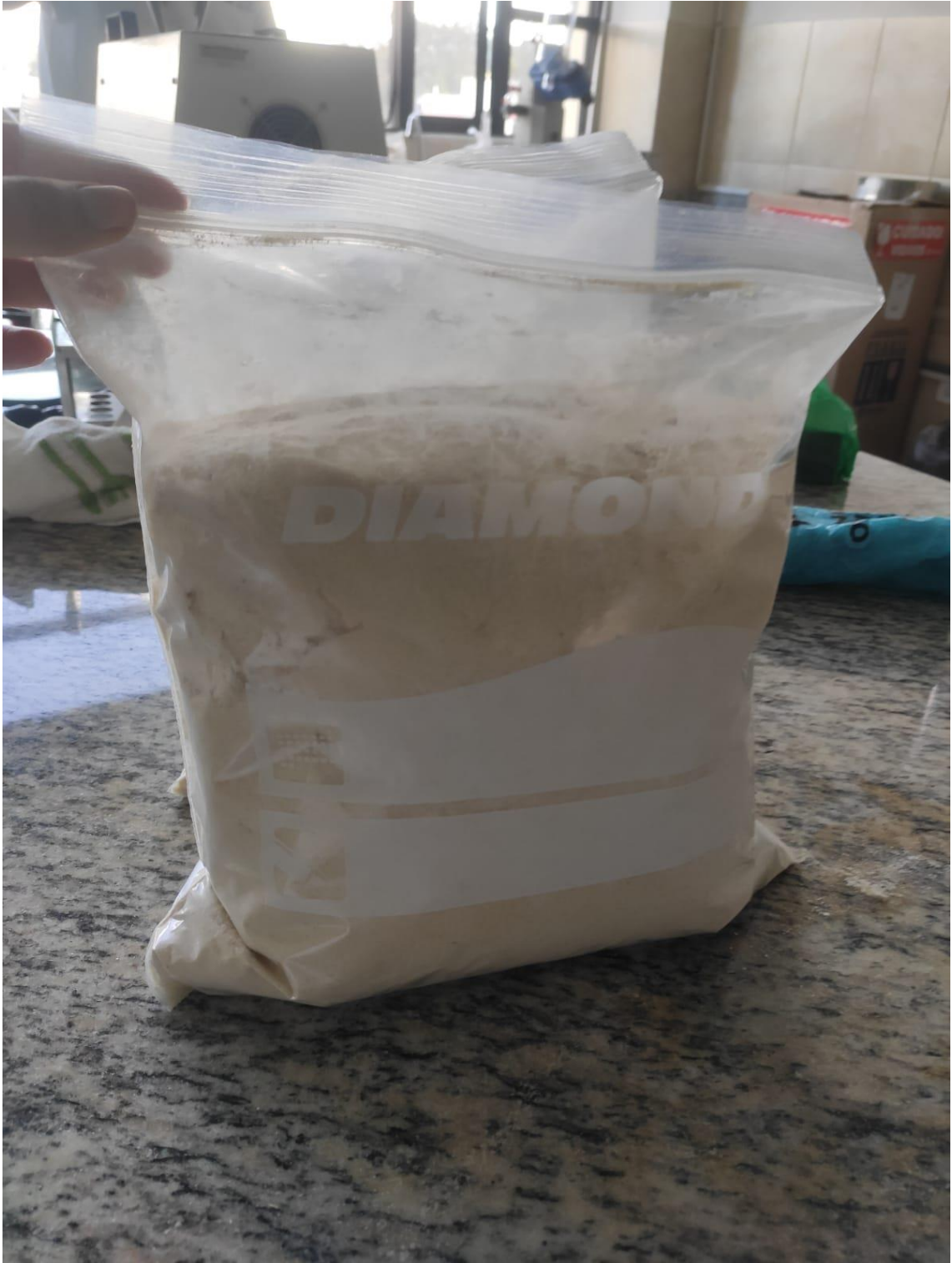
Ficha de Evaluación Sensorial.

| | | |
|---|--|---|
|  | UNIVERSIDAD POLITECNICA ESTATAL DEL CARCHI Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos |  |
| FICHA DE EVALUACIÓN SENSORIAL | | |
| Producto: Yogurt con β -glucano | Edad: | Fecha: 21/03/2024 |
| Nombre: | | |
| <p>Objetivo: Determinar el grado de aceptación en los atributos, color, olor, sabor, viscosidad y aceptabilidad global de 3 muestras de yogurt con diferente porcentaje de β-glucano.</p> <p>Instrucciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> Frente a usted se presenta tres (3) muestras de yogurt, Deguste cada una de ellas de izquierda a derecha e indique su nivel de agrado marcando con una X de acuerdo al puntaje de la escala indicada abajo, en el código correspondiente a cada una de las muestras. RECUERDE consumir la galleta y el enjuague bucal con agua entre cada degustación, mismos que se encuentra a su derecha (Esquina superior). | | |
| Puntaje | Categoría | 966 |
| | | Color Olor Sabor Viscosidad Aceptación Global |
| 1 | Me disgusta mucho | |
| 2 | Me disgusta moderadamente | |
| 3 | No me gusta ni me disgusta | |
| 4 | Me gusta moderadamente | |
| 5 | Me gusta mucho | |
| Puntaje | Categoría | 750 |
| | | Color Olor Sabor Viscosidad Aceptación Global |
| 1 | Me disgusta mucho | |
| 2 | Me disgusta moderadamente | |
| 3 | No me gusta ni me disgusta | |
| 4 | Me gusta moderadamente | |
| 5 | Me gusta mucho | |
| Puntaje | Categoría | 192 |
| | | Color Olor Sabor Viscosidad Aceptación Global |
| 1 | Me disgusta mucho | |
| 2 | Me disgusta moderadamente | |
| 3 | No me gusta ni me disgusta | |
| 4 | Me gusta moderadamente | |
| 5 | Me gusta mucho | |
| <ul style="list-style-type: none"> Observaciones: | | |
| Nota: Estos resultados evaluados serán utilizados únicamente para fines académicos | | |

Anexo C.

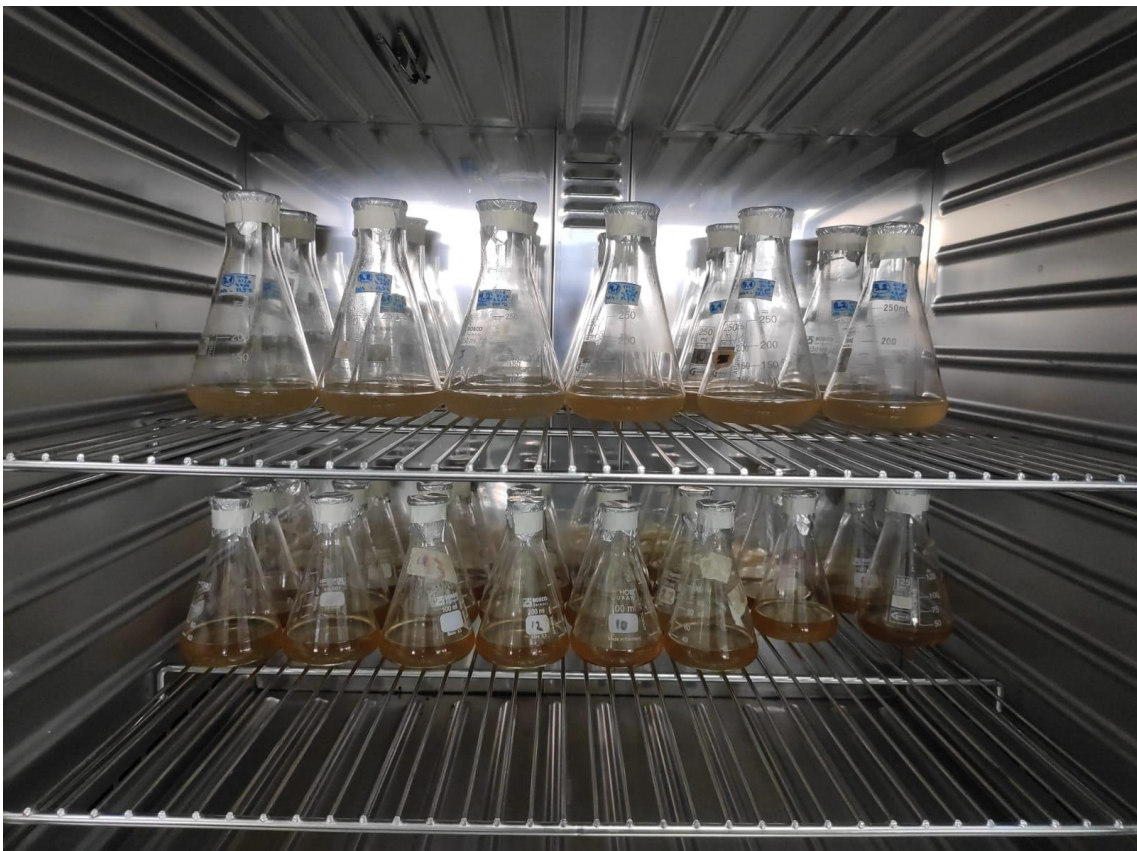
Preparación del bagazo residual.





Anexo D

Crecimiento de la levadura en los medios de cultivo con bagazo de caña de azúcar.



Anexo E

Beta glucano extraído y listo para añadirlo al yogur.



Anexo F.

Yogur Natural base.



Anexo G.

Análisis Sensorial de la Muestra.

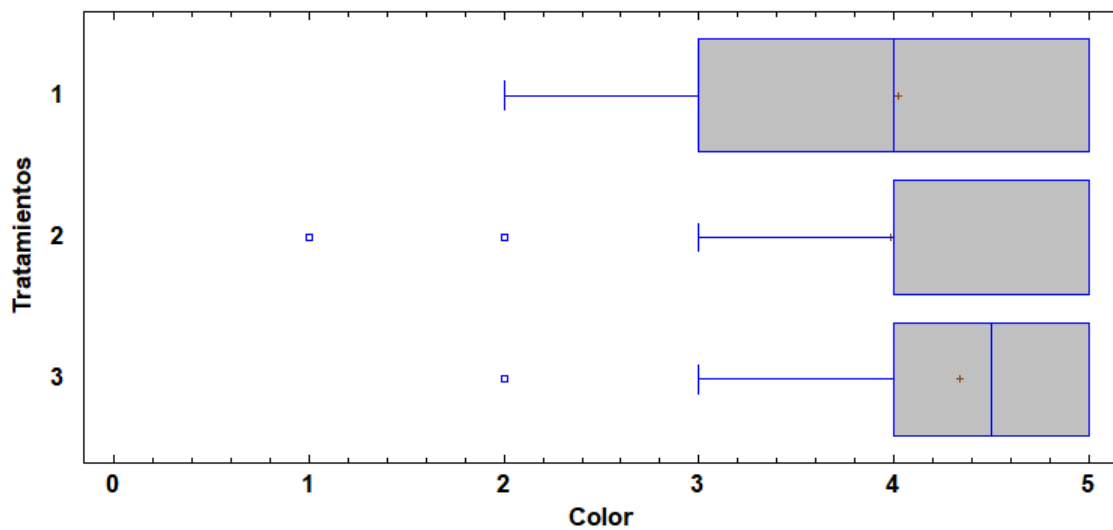


Anexo H

Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para Color por Tratamiento.

| Tratamientos | Tamaño Muestra | Rango Promedio |
|--------------|----------------|----------------|
| T1 | 50 | 71,34 |
| T2 | 50 | 69,71 |
| T3 | 50 | 85,45 |

Nota. T1 (0,5% de beta glucano), T2 (1% de beta glucano) y T3 (1,5 % de beta glucano). La prueba de Kruskal Wallis, indica el valor de P es 0,103401.

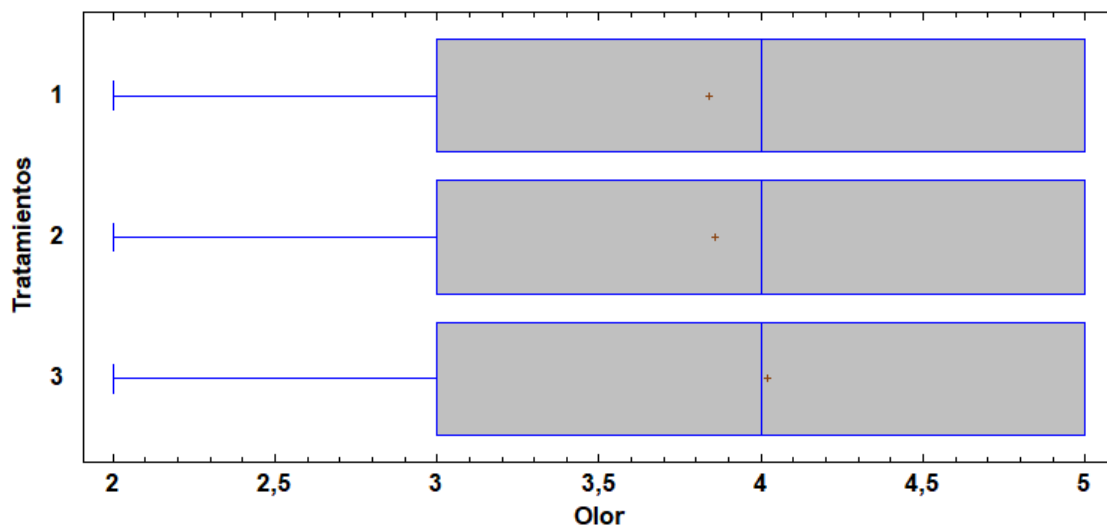


Anexo I

Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para Olor por Tratamiento.

| Tratamientos | Tamaño Muestra | Rango Promedio |
|--------------|----------------|----------------|
| T1 | 50 | 72,2 |
| T2 | 50 | 73,62 |
| T3 | 50 | 80,68 |

Nota. T1 (0,5% de beta glucano), T2 (1% de beta glucano) y T3 (1,5 % de beta glucano). La prueba de Kruskal Wallis, indica el valor de P es 0,544394.

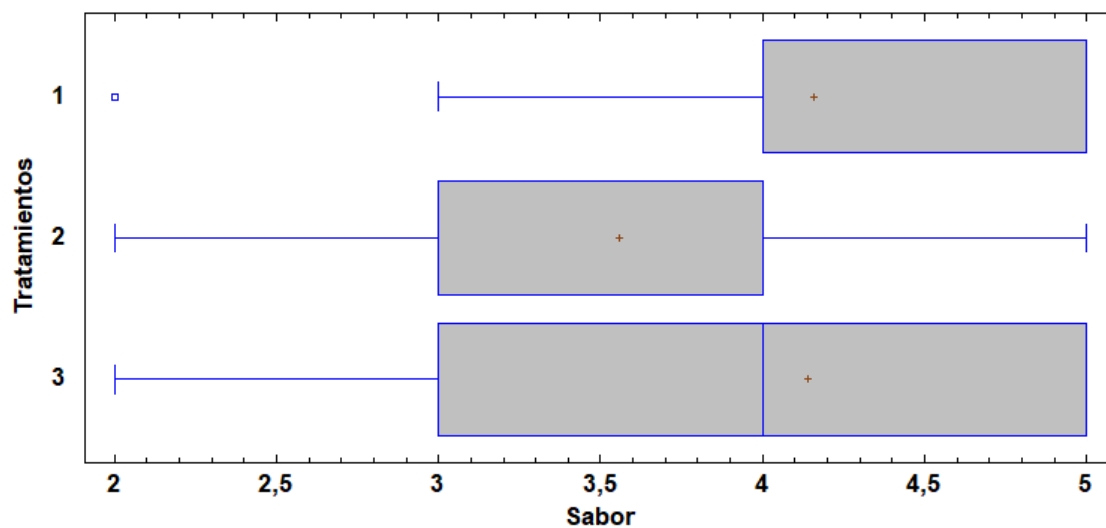


Anexo J

Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para Sabor por Tratamiento

| Tratamientos | Tamaño Muestra | Rango Promedio |
|--------------|----------------|----------------|
| T1 | 50 | 83,04 |
| T2 | 50 | 60,06 |
| T3 | 50 | 83,4 |

Nota. T1 (0,5% de beta glucano), T2 (1% de beta glucano) y T3 (1,5 % de beta glucano). La prueba de Kruskal Wallis, indica el valor de P es 0,00533812.

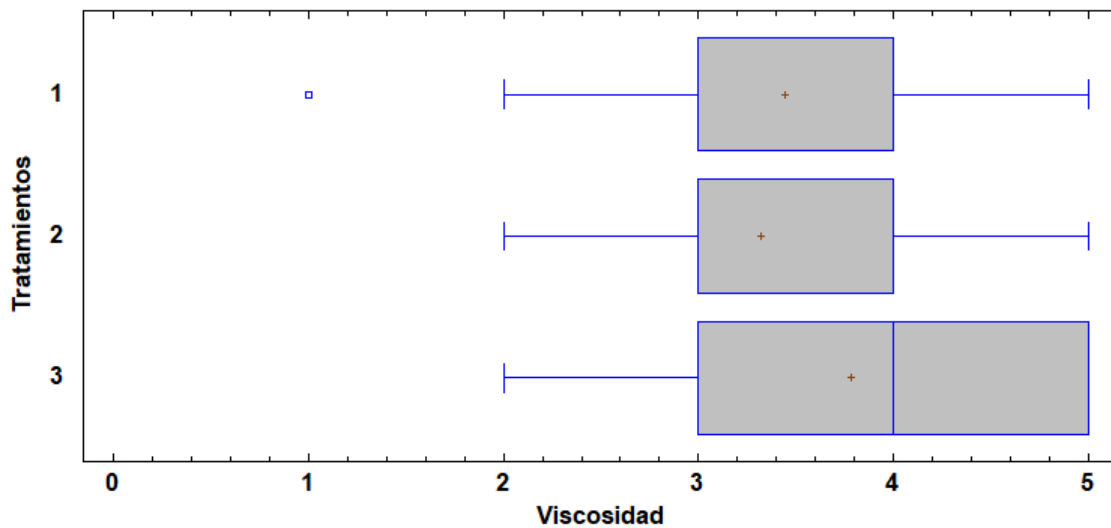


Anexo K.

Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para Viscosidad por Tratamiento.

| Tratamientos | Tamaño Muestra | Rango Promedio |
|--------------|----------------|----------------|
| T1 | 50 | 73,11 |
| T2 | 50 | 67,14 |
| T3 | 50 | 86,25 |

Nota. T1 (0,5% de beta glucano), T2 (1% de beta glucano) y T3 (1,5 % de beta glucano). La prueba de Kruskal Wallis, indica el valor de P es 0,0650384.



Anexo L

Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para Aceptación Global por Tratamiento.

| Tratamientos | Tamaño Muestra | Rango Promedio |
|--------------|----------------|----------------|
| 1 | 50 | 80,04 |
| 2 | 50 | 61,74 |
| 3 | 50 | 84,72 |

Nota. T1 (0,5% de beta glucano), T2 (1% de beta glucano) y T3 (1,5 % de beta glucano). La prueba de Kruskal Wallis, indica el valor de P es 0,0135769.

