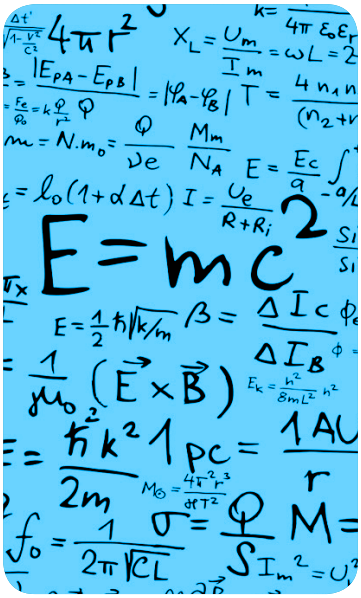


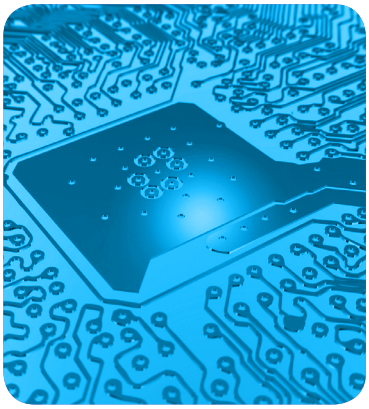
# MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias /12-13

Máster en Química Agrícola y Nuevos Alimentos

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

excelencia Campus Internacional UAM CSIC



## Incorporación de β-glucanos fúngicos en matrices alimentarias para el desarrollo de alimentos funcionales con propiedades hipocolesterolémicas

*Griselda López Göttig*

UAM EDICIONES

# *Agradecimientos*

Agradecer en primer lugar al Dr. Alejandro Ruiz Rodríguez, tutor de este proyecto de fin de máster, por haberme dado la oportunidad de estudiar e investigar en un campo tan bonito e interesante como son las setas comestibles, y por supuesto, por su tiempo dedicado a mi proyecto.

También quiero agradecer a la Dra. Cristina Soler Rivas su dedicación, apoyo y paciencia para ayudarme en todas las dudas que han surgido a lo largo de la elaboración de este proyecto.

Agradecer a mis compañeros del laboratorio de extractos fúngicos del Departamento de Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos (CIAL), especialmente a Alicia Gil y Laila Aldars por ayudarme tanto en el día a día en el laboratorio y por resolver mi gran cantidad de dudas.

Quiero hacer especial mención al gran trabajo que se realiza en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), y agradecer la oportunidad que nos han brindado al albergar un máster tan interesante como es el Máster en Química Agrícola y Nuevos Alimentos.

Gracias a todas estas personas he podido realizar este proyecto con el que he aprendido muchas cosas y con el que he podido sumergirme en el mundo de la verdadera investigación, muchas gracias a todos!

# *Índice*


**1. *Capítulo 1*. Introducción** 1

**1.1. Los Glucanos** 2

*1.1.1. Los glucanos y sus propiedades beneficiosas* 3

*1.1.2. Los hongos como fuente de β-glucanos* 6

**1.2. El ergosterol** 8

**1.3. Justificación del desarrollo de un alimento hipocolesterolémico** 10

**2. *Capítulo 2*. Objetivos** 12

**2.1. Objetivo general y objetivos específicos** 13

**3. *Capítulo 3*. Materiales y Métodos** 14

**3.1. Muestras y reactivos** 15

*3.1.1. Materia prima* 15

*3.1.2. Reactivos y otros materiales* 17

**3.2. Preparación de las muestras** 18

*3.2.1. Liofilización* 18

*3.2.2. Aislamiento de polisacáridos de la muestra y exclusión de los polisacáridos de bajo peso molecular* 19

*3.2.3. Preparación de las matrices alimentarias* 20

*3.2.4. Digestión in vitro de muestras* 22

**3.3. Determinación de β-glucanos** 23

**4. *Capítulo 4*. Resultados y discusión** 27

**4.1. Magdalenas enriquecidas en β-glucanos fúngicos como alimento funcional** 28

*4.1.1. Efecto del horneado en las magdalenas funcionalizadas con extracto enriquecido en β-glucanos* 28

*4.1.2. Efecto de la digestión in vitro en las magdalenas horneadas y funcionalizadas con extracto enriquecido en β-glucanos* 30

**4.2. Yogures enriquecidos en β-glucanos fúngicos como alimento funcional** 33

**4.3. Comparación de las matrices alimentarias** 34

**4.4. La suplementación conjunta de ergosterol y β-glucanos** 35

**5. *Capítulo 5*. Conclusiones** 38

**6. *Capítulo 6*. Bibliografía** 40

# Introducción

## Capítulo 1

## 1.1. Los Glucanos

Los glucanos son polisacáridos constituidos por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos. Estas D-glucosa pueden estar conectadas unas a otras, en una variedad de posiciones en la estructura del anillo dando lugar a:

- Los α-glucanos: Formados por enlaces glucosídicos entre el carbono 1 de una D-glucosa y el carbono 4 o 6, según el tipo de enlace, de otra D-glucosa. Tienen función de reserva principalmente. Dentro de este grupo podemos encontrar la amilosa y la amilopectina, que forman el almidón y el glucógeno.

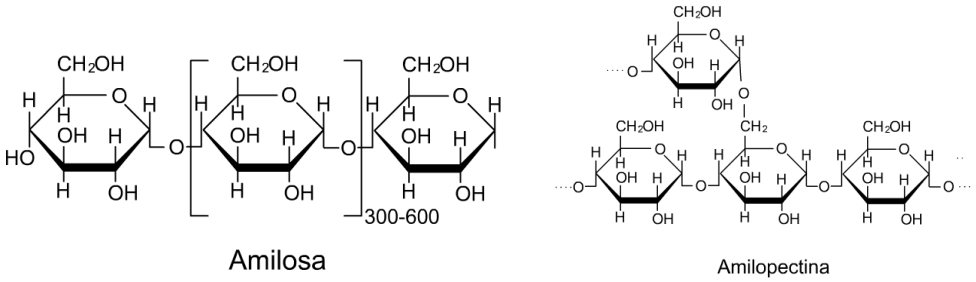



**Figura 1. Estructura amilosa (enlace α-1,4) y amilopectina (enlace α-1,4 y α-1,6)**

- Los β-glucanos: Formados por enlaces glucosídicos entre el carbono 1 de una D-glucosa y el carbono 3, 4 o 6, según el tipo de enlace, de otra D-glucosa. Tiene función estructural principalmente. Dentro de este grupo podemos encontrar la curdlana, la celulosa, la liquenina y el pleurano.

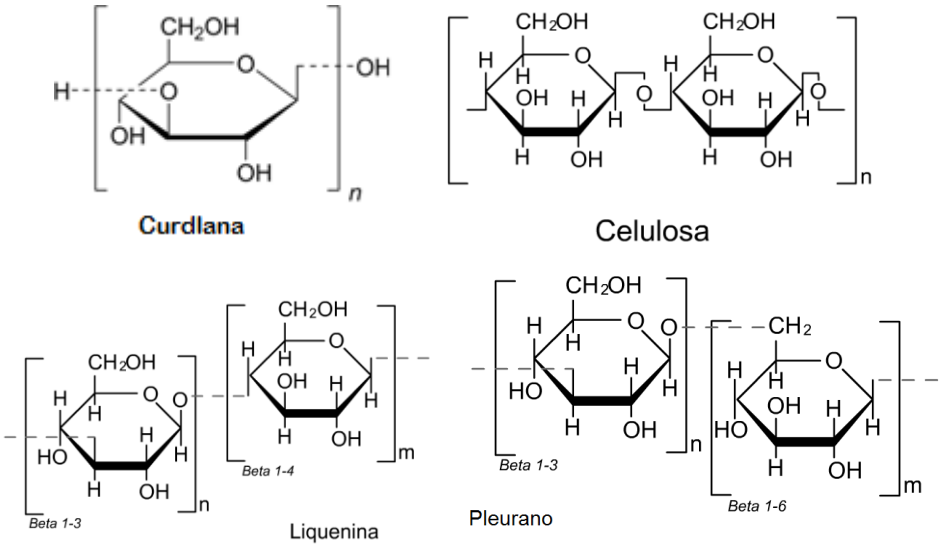



**Figura 2. Estructura curdlana (enlace β-(1,3), celulosa (enlace β-1,4), liquenina (enlace β-1,3 y β-1,4) y pleurano (enlace β-1,3 y β-1,6)**

Estos enlaces pueden dar como resultado polímeros lineales, ramificados e incluso cíclicos (*Bacic A. y col.,* 2009). Además, pueden contener en su estructura ácido glucurónico, xilosa, galactosa, manosa, arabinosa y/o ribosa (*Synytsya A. y col.,* 2009).

### 1.1.1. Los β-glucanos y sus propiedades beneficiosas

Los β-glucanos pueden ser extraídos de varias fuentes, como cereales, hongos, levaduras, algas y bacterias. Para los cereales, los β-glucanos con enlace lineal β-(1,3)(1,4) son los predominantes, sin embargo, para el caso de los hongos, levaduras y algas, la mayoría de los β-glucanos presentes contienen enlaces lineales β-(1,3) y ramificados β-(1,3)(1,6). Para las bacterias, predomina el enlace lineal β-(1,3) (*Bacic A. y col.,* 2009; *Rivero M.*, 2011; *Vetvicka V. y Novak M.,* 2011).

La estructura macromolecular de los β-glucanos, además de depender de la fuente de obtención, depende del método de aislamiento, variando principalmente la distribución y la longitud de las cadenas laterales. Parámetros como la estructura primaria, solubilidad, grado de ramificación (GR) y el peso molecular (PM), así como la carga de sus polímeros y su estructura en medios acuosos están relacionados con la actividad biológica del β-glucano. Los β-glucanos con $0.2 \leq GR \geq 0.33$, $100 \leq PM \geq 200$ kDa, y una estructura de triple hélice son los más eficaces biológicamente (*Zekovic D.B. y col.*, 2005). Además, los β-glucanos que integran unidades de

D-glucosa unidas unas a otras en la posición β-(1,3) son más activos (*Mantovani M. y col.*, 2008; *Rivero M.*, 2011; *Petravic´-Tominac, V. y col.,* 2010).

Los β-glucanos han sido objeto de estudio desde hace muchos años por sus diversas propiedades beneficiosas, lo que ha generado su aplicación en diferentes campos como veterinaria, industrias farmacéutica, cosmética y química, y en la producción de alimentos y piensos.

Dentro de estas propiedades se encuentra la actividad inmunoestimulante, que ayuda a combatir una variedad de infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias. Este efecto inmunoestimulante de los β-glucanos se asocia con la activación de células natural killer (NK), macrófagos citotóxicos, linfocitos T-helper y con la promoción de la diferenciación de los linfocitos T y su activación, por la vía alternativa del complemento (*Mantovani M. y col.*, 2008). Esta actividad se ha relacionado con una variedad de receptores, aunque solamente para un tipo de receptores, denominados Dectin-1, se ha demostrado de forma concluyente su implicación en dicha respuesta. Estos receptores, específicos de los β-(1,3)-glucanos, pertenecen a la familia de los receptores denominada *Receptores de lectina tipo C*, los cuales se expresan en células fagocíticas, incluyendo macrófagos, neutrófilos y en células dendríticas (*Werning M.L.*, 2010).

Los β-glucanos también se han descrito como moduladores de la inmunidad humoral y celular. Los β-(1,3)-glucanos de los hongos han demostrado tener efectos beneficiosos en la respuesta pre-inflamatoria, lo que indicaría un posible efecto modulador de la respuesta anti-inflamatoria como mediadores de interleucina (*Mantovani M. y col.*, 2008).

Recientemente, varios estudios *in vitro* han demostrado que los β-glucanos podrían proteger contra diferentes agentes mutagénicos. El mecanismo de acción no está claro, pero se sugiere que los β-glucanos pueden reaccionar con agentes mutagénicos, impidiendo su interacción con el ADN (*Mantovani M. y col.*, 2008; *Oliveira R.J. y col.*, 2006; *Angeli J.P.F y col.*, 2006). Los β-glucanos tienen también propiedades antioxidantes y algunos de ellos han demostrado estimular la cicatrización de heridas (*Petravic´-Tominac, V. y col.*, 2010).

Con respecto al efecto antidiabético que muestran los β-glucanos, uno de los posibles mecanismos propuestos es la interacción de éstos con receptores Dectin-1, presente en las células de Langerhans del páncreas. (*Werning M.L.*, 2010).

Por otra parte, el hecho que los β-glucanos no sean degradados por los ácidos y las enzimas humanas del tracto digestivo, dota a estas moléculas de propiedades de fibra alimentaria. El mayor interés de esta propiedad es su efecto hipocolesterolémico, reduciendo el riesgo de formación de la placa de ateroma. Sin embargo, el mecanismo de acción no está completamente esclarecido (*Daou C. y Zhang H.*, 2012; *Bilal T. y col.*, 2012). Se sabe que los β-glucanos tienen una alta viscosidad a muy baja concentración (1%) (*Bilal T. y col.*, 2012), por lo que podrían reducir los niveles de colesterol en la sangre a través de su interacción con el colesterol y los ácidos biliares, lo que provocaría una disminución de su absorción intestinal favoreciéndose la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol (*Brown L. y col.,* 1999). Además, los β-glucanos son capaces de inhibir a la HMG-CoA reductasa, enzima clave en la biosíntesis de colesterol y de elevar los niveles de ARNm del receptor hepático LDL (*Guillamón E. y col.*, 2010).

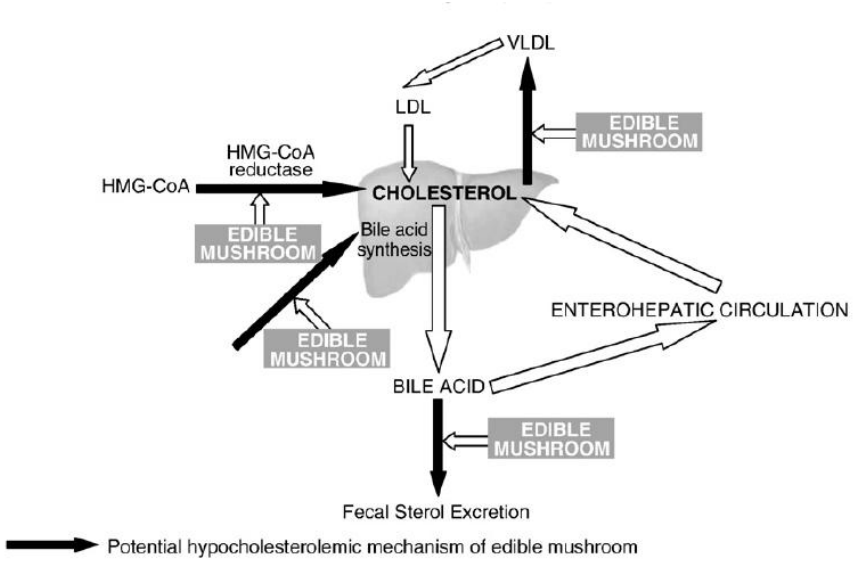



**Figura 3. Efecto de los hongos comestibles en el metabolismo del colesterol (*Guillamón E. y col.*, 2010)**

Este comportamiento de los β-glucanos de fibra alimentaria podría dotarles de un efecto prebiótico en el organismo (*Petravic´-Tominac V. y col.,* 2010; *Aida F.M.N.A. y co*l., 2009).

Otro fenómeno que favorecería la disminución del colesterol en sangre sería la fermentación de los β-glucanos por las bacterias intestinales a ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) los cuales son absorbidos en el lumen intestinal e inhiben la síntesis de colesterol hepático (*Rivero M.*, 2011).

### 1.1.2. Los hongos como fuente de β-glucanos

La obtención de β-glucanos, actualmente, se lleva a cabo principalmente a partir de los granos de cereales, fuente para la que han sido aceptadas las declaraciones de salud sobre los efectos beneficiosos de los β-glucanos (EFSA, 2011). Sin embargo, en la última década ha generado un gran interés la extracción de β-glucanos a partir de setas debido a recientes estudios que pondrían de manifiesto una mayor actividad biológica de estos compuestos debido a su enlace ramificado β-(1,3;1,6) (*Petravic´-Tominac V.* y col., 2010; *Rop O. y col.,* 2009). Además, la producción de ciertas especies de hongos comestibles constituye en la actualidad una actividad con una gran implantación, tanto en nuestro país, como en el resto del mundo (*Pardo A. y col.,* 2008).

Para la extracción de β-glucanos de las paredes celulares de setas, se prefiere el uso de especies comestibles para evitar la extracción de compuestos tóxicos o no deseables.

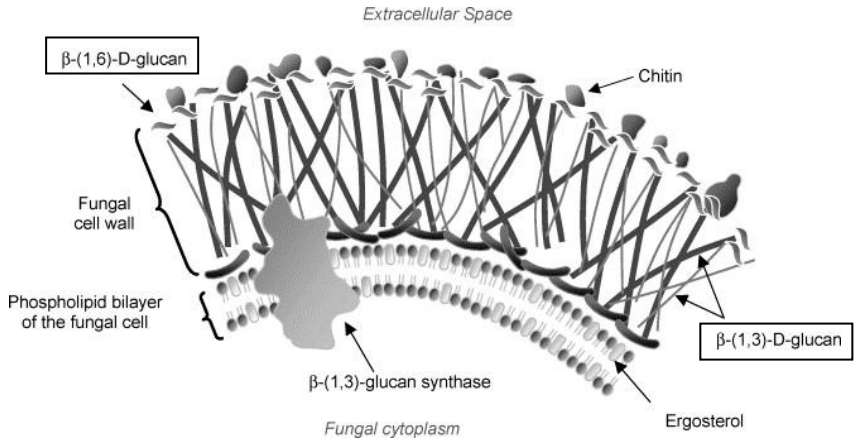



**Figura 4. Estructura y componentes de la pared celular fúngica (*Kartsonis N. A. y col.*, 2003)**

Los niveles de β-glucanos en setas van desde los 245 a 1.1 mg/100 g de peso comestible, lo que representa del 4 al 13% de la fibra dietética total (*Manzi P. y col.,* 2004). Dentro de las diferentes especies, la concentración de β-glucanos no es homogénea, algunas especies muestran una alta concentración de β-glucanos, tales como, *G. lucidum, P. ostreatus, A. aegerita y L. deliciosus* (*Gil-Ramírez A. y col.,* 2011).

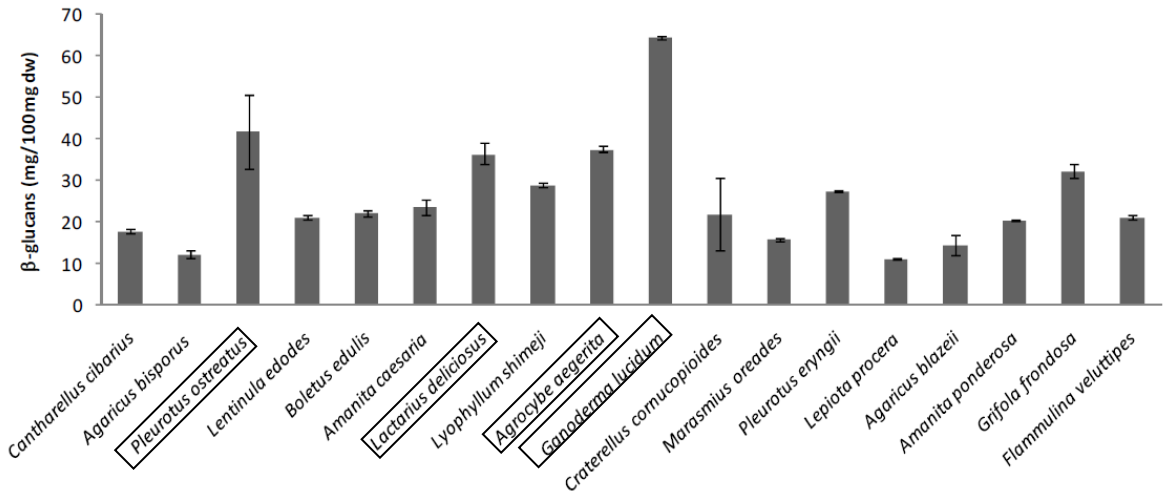



**Figura 5. Concentración de β-glucanos en diferentes especies de setas (*Gil-Ramírez A. y col.,* 2011)**

Dentro de las especies con una alta concentración de β-glucanos, la especie más producida y consumida en España es la *Pleurotus ostreatus*. El cultivo de esta seta pertenece al siglo XX y, a pesar de ser relativamente reciente, ha tenido un desarrollo muy rápido cultivándose en la actualidad en casi todas las latitudes del mundo. Su caso merece una atención especial, debido a la diversidad de substratos sobre los que es capaz de crecer además de que permite el aprovechamiento de sus desechos agropecuarios (*Pacheco M. y col.,* 2005).

En la actualidad, España ocupa el cuarto lugar en Europa como país productor de hongos cultivados, por detrás de Holanda, Polonia y Francia.

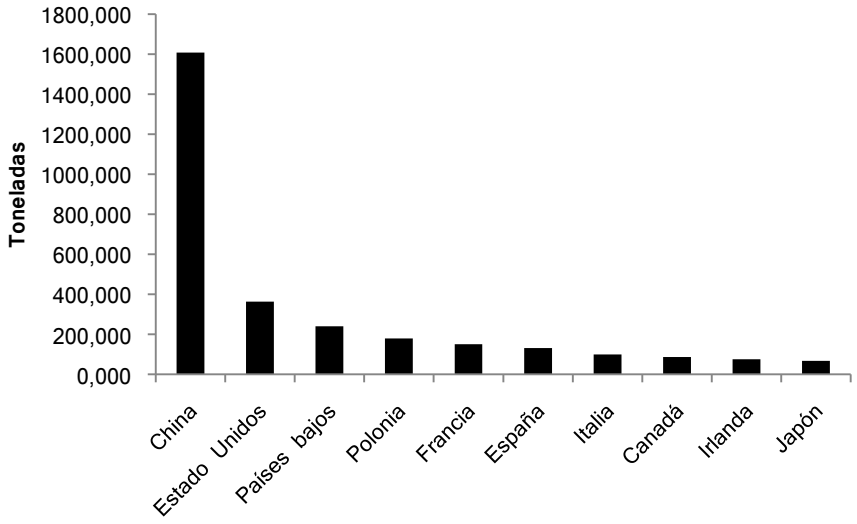



**Figura 6. Producción mundial de hongos cultivados en la temporada 2007/2008 (*Gea F.J. y col.*, 2011)**

La producción española de setas, durante la campaña 2007/08, ascendió a 136.625 toneladas, de las que 15.628 correspondieron a setas del género *Pleurotus*, lo que representó el 11,4% del total de hongos cultivados en España (*Gea F.J. y col.*, 2011).

En el hongo del género *Pleurotus* el principal β-glucano presente es el pleurano, el cual tiene diversos efectos beneficiosos, entre los que destacan la disminución de la presión arterial y la disminución de la actividad antioxidante de la enzima glutation peroxidasa, así como sus propiedades hipocolesterolémicas, que incluyen la disminución de las lipoproteínas VLDL y LDL, la disminución del colesterol total y triglicéridos en sangre, y la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa por acción de la lovastatina (*Guillamón E. y col.*, 2010; *Rop O. y col.,* 2009; *Bobek P. y col.,* 2001; *Cheung P.C.K*, 1998; *Gunde-Cimerman N. y Cimerman A.,* 1995).

## 1.2. El ergosterol

El ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3β-ol), es un lípido de la familia de los esteroles sintetizado principalmente por hongos que se almacena como ésteres de ácidos grasos en partículas lipídicas.

El ergosterol es el principal esterol de las membranas de las hifas de las setas (aprox. 80% de los esteroles, w/w) seguido de otros derivados tales como

ergosta-5,8,22-trien-3-ol; ergosta-7,22-dien-3-ol; ergosta-5,7-dien-3-ol y ergosta-7-en-3-ol (fungisterol) (*Gil-Ramírez A. y col.,* 2013). Además, es responsable de las propiedades de sus membranas biológicas, tales como la integridad, la fluidez, la permeabilidad, y la actividad de las enzimas unidas a la membrana. El ergosterol es, también, un precursor de la vitamina $D_2$ (ergocalciferol).

El contenido en ergosterol de los hongos normalmente se encuentra entre 0,2% y 0,6% del peso seco, pero los contenidos puede variar ampliamente dependiendo de la época de la cosecha y las condiciones de crecimiento (*Tianqi W. y col.,* 2007)

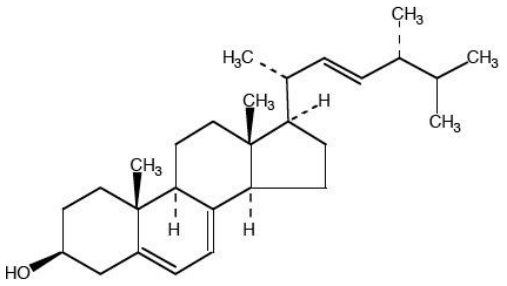



**Figura 7. Estructura química del Ergosterol**

El ergosterol actualmente se utiliza como ingrediente en alimentos funcionales con propiedades hipocolesterolémicas, junto con los β-glucanos. El mecanismo de acción del ergosterol, podría ser similar al descrito para otros fitoesteroles, basándose en su capacidad de impedir la absorción del colesterol al desplazarlo de la micelas formadas durante la digestión (*Jesch E.D. y col.,* 2006; *Carr T.P. y col.,* 2010). Los fitoesteroles comparten una similitud estructural con el colesterol compitiendo por su inclusión dentro de la micela, favoreciendo así la precipitación de colesterol y su excreción. Además, es importante destacar que los fitoesteroles tienen una menor tasa de absorción comparada con la del colesterol (*Valenzuela A. y col.,* 2004; *Giraudo M. y col.,* 2010).

Otro mecanismo de acción estudiado para algunos fitosteroles incluye la inhibición de la ACAT (colesterol aciltransferasa), enzima implicada en la absorción de colesterol por los enterocitos intestinales, y la modificación de los niveles de expresión de las proteínas NPC1L1 y ABC, ambas implicadas en el mecanismo de transporte del colesterol (*Davis H.R. y col.*, 2004).

## 1.3. Justificación del desarrollo de un alimento hipocolesterolémico

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se encuentran entre las causas más comunes de muerte en el mundo occidental y los países en vías de desarrollo. Durante las últimas décadas se han hecho grandes esfuerzos para prevenir o tratar los factores de riesgo de ECV, los cuales se han traducido en tasas significativamente más bajas de mortalidad por estas enfermedades. Sin embargo, muchos pacientes no logran un control adecuado de los factores de riesgo de ECV. Además, la creciente incidencia de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 amenaza con aumentar la prevalencia de las ECV.

Son muchas las intervenciones llevadas a cabo sobre el estilo de vida de los pacientes para la reducción de los factores de riesgo de ECV, pero son difíciles de mantener durante largos periodos de tiempo (*Cannon C.P.,* 2007). Estas intervenciones se basan en disminuir biomarcadores de riesgo de ECV ampliamente aceptados, como es el aumento de las lipoproteínas LDL y los triglicéridos en sangre (*Guillamón E. y col.,* 2010). Hoy en día existen en el mercado medicamentos que bloquean la absorción del colesterol reduciendo su concentración plasmática, pero pueden tener una serie de efectos colaterales (*Giraudo, M. y col*., 2010), por lo que se hace necesario estudiar a fondo compuestos que puedan inhibir la absorción del colesterol de modo que, ingeridos en la dieta, puedan llegar a controlar su absorción por medios no farmacológicos, siempre que la hipercolesterolemia del individuo no sea elevada.

Sin embargo, aunque los pacientes no logren mantener buenos hábitos en su estilo de vida, cada vez son más conscientes de que los alimentos pueden mejorar su salud. Hoy en día, los alimentos no sólo proporcionan los nutrientes necesarios para el ser humano, sino que también pueden prevenir enfermedades relacionadas con la nutrición y mejorar el bienestar físico y mental de los consumidores; en este sentido, los alimentos funcionales juegan un papel fundamental. El aumento de la demanda de este tipo de productos se puede explicar por el aumento del costo de la atención médica, el aumento de la esperanza de vida, y el deseo de las personas por mejorar su calidad de vida (*Siró I. y col*., 2008).

Por lo tanto, el desarrollo de alimentos funcionales con propiedades hipocolesterolémicas dirigidos a una población adulta con hipercolesterolemia leve o

moderada, se plantea como un nuevo tratamiento hacia la reducción de las ECV impulsado por la preocupación de los consumidores por su salud.

# Objetivos

Capítulo 2

## 2.1. Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido el estudio del posible uso de un extracto de *Pleurotus ostreatus* como ingrediente bioactivo para el desarrollo de un alimento funcional con propiedades hipocolesterolémicas debidas a la incorporación de b-glucanos fúngicos.

### 2.1.1. Objetivos específicos

- ✓ Extracción y aislamiento de la fracción de polisacáridos de alto peso molecular del hongo *Pleurotus ostreatus* e inclusión de la misma en diferentes matices alimentarias.

- ✓ Cuantificación de los α- y β-glucanos presentes en las diferentes matrices alimentarias preparadas sin tratamiento, tras el horneado y tras un proceso de digestión *in vitro* que simula las condiciones fisiológicas de la digestión humana para evaluar su bioaccesibilidad.

- ✓ Comparación entre diferentes matrices alimentarias para estudiar la estabilidad del ingrediente bioactivo en una matriz rica en hidratos de carbono y otra rica en proteínas.

- ✓ Estudio de posibles sinergias, tanto positivas como negativas, cuando se incorporan, además de β-glucanos, otros compuestos hipocolesterolémicos presentes en los hongos como es el caso del ergosterol.

# Materiales y Métodos

Capítulo 3

## 3.1. Muestras y Reactivos

### 3.1.1. Materia Prima

*Descripción y clasificación taxonómica de la muestra biológica*

En este trabajo se ha utilizado como material de partida cuerpos fructíferos del hongo *Pleurotus ostreatus*. A continuación, se indica en la tabla su clasificación taxonómica.

**Tabla 1. Clasificación taxonómica del hongo *P. ostreatus***

| Nombre botánico | División | Orden | Familia | Género | Especie | Nombre común |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Pleurotus ostreatus* | Basidiomicota | Agaricales | Pleurotaceae | Pleurotus | ostreatus | Seta de ostra<br>Gírgola<br>Seta de chopo<br>Orellana |

El hongo *P. ostreatus* es una seta comestible entre cuyas características se encuentra su sombrero de hasta 20 cm de diámetro, con forma de concha, inicialmente convexa pero que se va aplanando con el tiempo. El sombrero es, además, liso, sedoso y de un color que va desde el marrón violáceo hasta el azul pizarra.

Sus láminas son en parte bifurcadas y de color crema, su pie es corto, lateral y blanco, mientras que su carne es blanca y fibrosa, de olor parecido al del pescado y de sabor suave. Esta seta crece en grandes matas sobre madera de árboles vivos y sobre material en descomposición, encontrándose muy extendida en Europa central.

**Figura 8. Esquema e imagen de una piña de *Pleurotus ostreatus* y sus diferentes componentes.**

Las setas fueron obtenidas de las salas de cultivo del CTICH (Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de La Rioja, España) y pertenecieron a la primera florada, siendo recolectadas cuando su desarrollo fue el óptimo para su consumo.

*Descripción de las matrices alimentarias*

Las matrices alimentarias se obtuvieron en ambos casos en supermercados.

La masa utilizada pertenece a la marca "La cocinera" siendo indicada para la realización de bizcochos, magdalenas y pasteles de limón. Sus ingredientes y la información nutricional se indican a continuación.

Ingredientes: Azúcar, agua, harina de trigo, aceite vegetal, huevo en polvo, almidón, gasificante (bicarbonato sódico), zumo de limón concentrado (0.7%), aroma de limón, sal, concentrado de frutas y hortalizas (zanahoria, manzana y limón).

**Tabla 2. Información nutricional de la masa para magdalenas.**

| Información nutricional | Por 100 g | Por porción de 55 g |
|---|---|---|
| Valor energético | 389 kcal | 228 kcal |
| Proteínas | 5 g | 2.9 g |
| Hidratos de carbono | 48.9 g | 28.6 g |
| De los cuales azúcares | 31 g | 18.1 g |
| Grasas | 19.2 g | 11.2 g |
| De las cuales saturadas | 2 g | 1.2 g |
| Fibra alimentaria | 0.3 g | 0.2 g |
| Sodio | 0.11 g | 0.06 g |

El yogur utilizado fue natural de la marca "Hacendado". Sus ingredientes y la información nutricional se indican a continuación.

Ingredientes: Leche parcialmente desnatada, lactosa y proteínas de leche, fermentos lácticos.

**Tabla 3. Información nutricional del yogur**

| Información nutricional | Por 100 g | Por porción de 125 g |
|---|---|---|
| Valor energético | 64 kcal | 80 kcal |
| Proteínas | 3.3 g | 4.1 g |
| Hidratos de carbono | 2.8 g | 3.5 g |
| De los cuales azúcares | 2.8 g | 3.5 g |
| Grasas | 2.9 g | 3.6 g |
| De las cuales saturadas | 1.9 g | 2.4 g |
| Fibra alimentaria | 0 g | 0 g |
| Sodio | 0.05 g | 0.06 g |

3.1.2. Reactivos y otros materiales

El etanol absoluto, el cloruro de calcio, el cloruro de sodio y el ácido acético glacial se obtuvieron de Panreac (Barcelona, España), mientras que el Trizma, el ácido maléico, la pepsina de mucosa gástrica porcina, el extracto biliar porcino, la

pancreatina (desoxicolato sódico) de páncreas porcino, la lecitina de huevo (L-α-fosfatidilcolina), el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio y el ácido clorhídrico al 37% se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Alemania). Por último, el ergosterol (96% pureza) se consiguió de Alfa Aesar GmbH & Co (Karlsruhe, Germany).

Por otra parte, el kit comercial K-YBGL, fue obtenido de Megazyme (Wicklow, Irlanda) y las membranas de diálisis se adquirieron en Berlabo S.A (Madrid, España).

## 3.2. Preparación de las muestras

### 3.2.1. Liofilización

Las setas se cortaron en trozos de aproximadamente 1 $cm^3$ y se sometieron a un proceso de liofilización (Telstar, LyoBeta 15). Las condiciones del proceso de liofilización fueron las siguientes: temperatura de congelación: -20 °C; presión de vacío: 0,020 mbares; temperatura de secado: 4 °C; duración: 4 días.

Una vez liofilizados, los trozos de setas se homogeneizaron en un molino (Grindomix GM 200) a 8000 rpm durante 30 s, hasta obtener un tamaño de partícula inferior a 300 µm. La seta en polvo se almacenó en bolsas de cierre hermético a -20 °C hasta su posterior tratamiento.

**Figura 9. Esquema del proceso de liofilización y molienda**

3.2.2. Aislamiento de polisacáridos de la muestra y exclusión de los polisacáridos de bajo peso molecular

Este paso se llevó a cabo según el protocolo descrito por *Jeurink P.V. y col.,* (2008). En dicho protocolo, se parte de 1 g de muestra, que en nuestro caso fueron polvo de hongo, yogur o magdalena (se cogieron muestras tanto del centro de la magdalena como de la corteza). La muestra se disolvió en 100 mL de agua Milli Q, tras lo cual fue autoclavada (Tomy SX-700E) durante 20 min a 120°C.

Posteriormente, la mezcla fue enfriada a temperatura ambiente y se le añadieron 200 mL de etanol absoluto a 4°C, el cual actuó como antisolvente (*Rivero M.,* 2011) provocando la aparición de un precipitado correspondiente a la fracción de polisacáridos, esta mezcla se mantuvo toda la noche en refrigeración. Los polisacáridos precipitados se recuperaron por centrifugación (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge 3SR Plus) de la disolución anterior a 4.000 rpm durante 30 min a 4°C. Inmediatamente se descartó el sobrenadante, donde se encuentran la mayoría de las proteínas y las grasas, y el precipitado fue resuspendido en 50 mL de agua Milli Q.

Para finalizar, la mezcla anterior fue introducida en membranas de diálisis de 3500 Da, previamente acondicionadas, las cuales se dejaron 24 horas en un baño de agua MilliQ a 4°C con agitación constante para favorecer la salida de los polisacáridos de un peso molecular menor a 3500 Da. Transcurridas las 24 horas, el contenido de las membranas (PM > 3500 Da) se conservó a -20°C hasta su posterior liofilización, obteniendo finalmente un extracto de polisacáridos de alto peso molecular que de aquí en adelante será denominado como "Extracto de PSC".

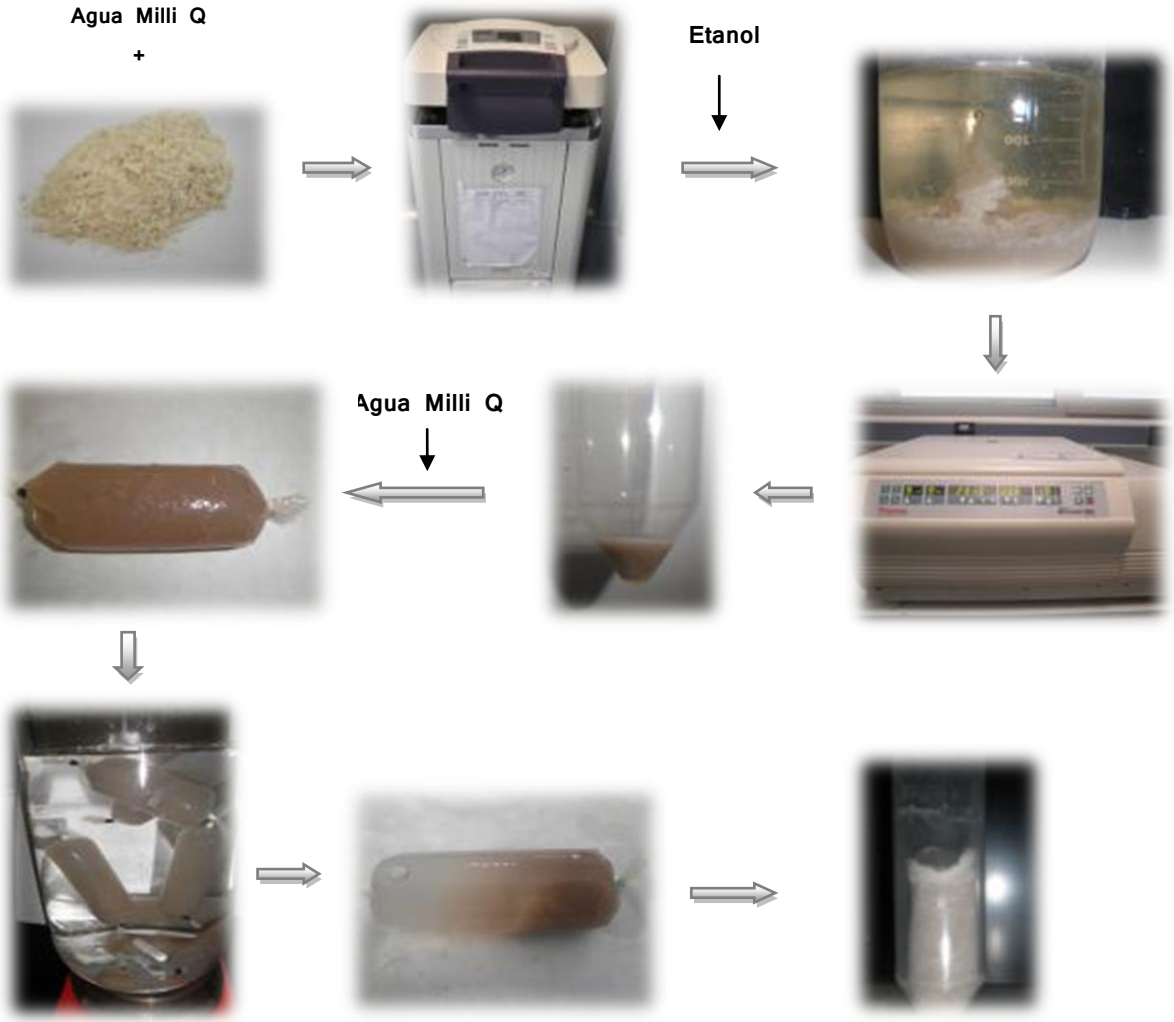



**Figura 10. Esquema del proceso de aislamiento de polisacáridos de la muestra y exclusión de los polisacáridos de bajo peso molecular.**

3.2.3. Preparación de las matrices alimentarias

Para el desarrollo de este proyecto, como matrices alimentarias se eligieron dos: 1) la magdalena, por ser un modelo de alimento rico en hidratos de carbono diferentes a los β-glucanos y que sufre un tratamiento térmico seco, este tratamiento térmico supone un procesado agresivo de la matriz alimentaria lo que podría dar lugar a la destrucción parcial de los compuestos bioactivos, además, fue elegido por sus ventajas para ser manipulado en el laboratorio [facilidad de preparación y pequeño volumen], y 2) el yogur, elegido como ejemplo de alimento rico en proteínas, las cuales no interfieren con los β-glucanos debido a que a esta matriz no se le aplica ningún tratamiento térmico antes de su consumo, también fue elegido por su fácil manejo durante la preparación de las diferentes mezclas a estudio.

Para la preparación de las magdalenas, se llevaron a cabo cuatro mezclas homogéneas diferentes que se explican en la siguiente tabla:

**Tabla 4. Composición de las magdalenas**

| Mezcla | Gramos Masa | Gramos Extracto PSC | Gramos Ergosterol |
|---|---|---|---|
| 1 | 35.5 | -- | -- |
| 2 | 35 | 0.5 | -- |
| 3 | 35 | 0.5 | 0.05 |
| 4 | 35.5 | -- | 0.05 |

Cada mezcla se realizó por triplicado, obteniendo 3 magdalenas con la misma composición, dos de las cuales se hornearon a 180°C durante 20 minutos.

**Figura 11. Esquema de la preparación de magdalenas**

Para la preparación de los yogures, se realizaron las mismas mezclas que aparecen en la Tabla 4, pero se realizó solamente un yogur por mezcla.

En el caso concreto de las magdalenas, se prepararon unas magdalenas control sin ingredientes bioactivos, con la finalidad de calcular la cantidad de α-glucanos procedentes principalmente del almidón de la harina de la masa [amilosa y amilopectina] así como los β-glucanos procedentes principalmente del endospermo amiláceo del trigo del que se obtuvo la harina de la masa [enlaces β-(1,3)-(1,4)-glucano] (Rivero M., 2011; Bacic A. y col., 2009).

Una segunda mezcla consistió en la sustitución de 0.5 g de masa por 0.5 g del extracto de PSC con la finalidad de estudiar el comportamiento de los β-glucanos procedentes de setas comestibles de configuración principalmente β-(1,3)-glucanos y β-(1,3)-(1,6)-glucanos (Bacic A. y col., 2009; Vetvicka V. y col., 2011). En la mezcla se usaron 0.5 g del extracto de PSC debido a que en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio se observó que era la máxima cantidad que se podía adicionar sin afectar de manera relevante a la textura del producto, lo que supone una adición de un 1,43% (p/p).

La tercera mezcla incluye, además de los 0.5 g de extracto de PSC, una cantidad de ergosterol. Esta mezcla sirvió para evaluar los posibles efectos, tanto positivos como negativos, de la adición de ergosterol sobre los β-glucanos. Se piensa que el ergosterol podría tener efectos negativos sobre los β-glucanos debido a la capacidad de estos últimos para unirse a moléculas lipídicas como el colesterol. Debido a la similitud estructural entre el ergosterol y el colesterol, el ergosterol podría influir en la determinación de los β-glucanos. En este caso, se adicionaron 50 mg de ergosterol, que sería el equivalente de ergosterol que contendrían 0.5 g de polvo de hongo; además, habitualmente, al formular un alimento funcional la cantidad de ingredientes bioactivos adicionados no suelen sobrepasar del 10% del total del peso del alimento.

Por último, se realizó una mezcla con 35.5 g de masa y 50 mg de ergosterol a modo de control, lo que nos permitió estudiar el efecto de este ingrediente únicamente sobre los β-glucanos presentes en la masa.

En cuanto a los yogures, se realizaron las mismas mezclas que en el caso de las magdalenas por los mismos motivos, aunque en este caso, el control sin ingredientes bioactivos, tuvo el objetivo de determinar los posibles α- y β-glucanos sintetizados por bacterias lácticas [β-(1,3)-glucano, α-(1,3), α-(1,4) y α-(1,6)-glucano] por acción de las glucansacarasas y glucosiltransferasa presentes en el yogur de partida, los cuales influyen en la viscosidad característica del yogur.

### 3.2.4. Digestión *in vitro* de muestras

La digestión de las muestras fue llevada a cabo en tres etapas: Masticación, Digestión gástrica y Digestión intestinal. Las muestras que se sometieron a digestión fueron: una magdalena horneada de cada tipo de mezcla, un yogur de cada tipo de mezcla y el extracto de PSC sin matriz.

En la etapa de masticación, 4 g de muestra, 5 mL de saliva humana y 5 mL de agua del grifo fueron mezclados en un mortero durante dos minutos intentando reproducir la fricción que producen los dientes sobre la muestra. En el caso del extracto de PSC, para mantener la proporción, se utilizaron 0.057 g de muestra.

En la etapa de digestión gástrica, primeramente se preparó un medio ácido mezclando 54 g de agua Milli Q con unas gotas de HCl 6 M hasta conseguir un pH de 2, luego se disolvió en ella 0.275 g de pepsina (equivalente a 0.5 g pepsina/100

mL homegeneizado). Se adicionó la muestra masticada al recipiente termostatizado del dispositivo valorador (Titrimo Plus 877, Metrohm) junto con el medio ácido con pepsina y se mantuvo en agitación a nivel 8 durante 15 minutos a pH 2 a 37°C.

Tras los 15 minutos, se comenzó con la digestión intestinal añadiendo 1 mL de solución de $CaCl_2$ 5 mM, y 3 mL de solución de NaCl 150 mM y se ajustó el pH a 6, una vez alcanzado este valor, se añadió una solución pancreática que constaba de 6 mL de tampón Trizma-Maleato 50 mM a pH 7.5, 0.633 g de sales biliares (equivalente a 20 mM en el recipiente del dispositivo valorador) y 0.228 g lecitina (equivalente a 4 mM en el recipiente del dispositivo valorador). Por último, se ajustó y se mantuvo el pH en el recipiente del digestor a 7,5 añadiendo NaOH 1M y utilizando un electrodo viscotrode (Metrohm, Herisau) colocado en el dispositivo del valorador. La digestión se llevó a cabo durante 1 h a 37°C en agitación a nivel 8.

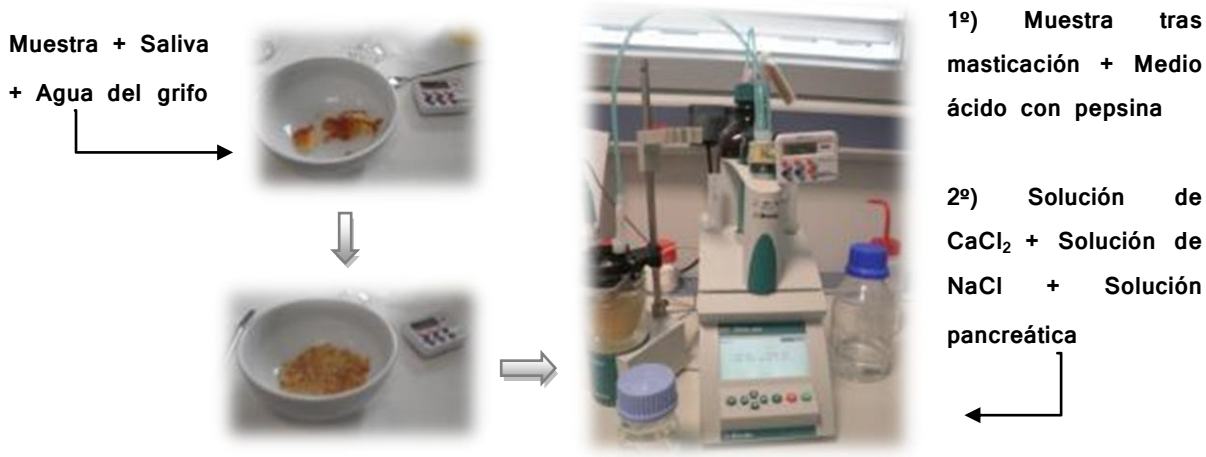



**Figura 12. Esquema de la digestión *in vitro* de muestras**

Tras finalizar la digestión, el contenido del recipiente del digestor se mantuvo a -20°C hasta el aislamiento y exclusión de los polisacáridos de bajo peso molecular mediante el protocolo explicado en el punto 3.2.2.

## 3.3. Determinación de β-glucanos

La determinación de los β-glucanos se llevó a cabo con un kit comercial específico para hongos y levaduras. Este kit se basa en un primer ensayo que determina los glucanos totales de la muestra (α-glucano + β-glucano), la D-glucosa en oligosacáridos y en sacarosa y la D-glucosa libre; y otro segundo ensayo, que

determina los α-glucanos (glucógeno y almidón), la D-glucosa en sacarosa y la D-glucosa libre de la muestra. Debido a que los mono-, di- y oligosacáridos de la muestra, así como polisacáridos rotos o pequeños son insignificantes, los valores obtenidos mediante la realización del primer ensayo pueden referirse principalmente a los glucanos totales, y en el segundo ensayo a los α-glucanos. Por lo tanto, en estos tipos de muestras, los β-glucanos se pueden cuantificar mediante la diferencia de ambos ensayos, obteniéndose así los mg de β-glucanos por 100 mg de muestra.

Para la determinación de α-glucanos, a 50 mg de muestra se le añadieron 1 mL de KOH 2M, y se mantuvieron en un baño de hielo en agitación durante 20 min. Posteriormente, se añadieron 4 mL de tampón de acetato de sodio 1,2M de pH 3.8, se sacó la muestra del baño de hielo y se adicionó, inmediatamente, 0.1 mL de amiloglucosidasa. La muestra se llevó después a un baño de agua a 40 °C y se mantuvo durante 30 min.

Para el caso de las magdalenas, debido a que su contenido en α-glucanos es superior al 10%, procedentes en su mayoría de la harina de su formulación, se realizó una dilución 1/10 usando agua Milli Q, tras sacar la muestra del baño a 40°C.

Posteriormente se centrifugó la mezcla a 4700 rpm durante 10 min tras lo cual se traspasaron 0.1 mL del sobrenadante a tubos de vidrio a los que se les adicionó 0.1 mL de tampón de acetato sódico 200mM pH 5 y 3 mL de reactivo de determinación de glucosa (GOPOD). Esta operación se llevó a cabo por duplicado. Además, se realizó un blanco con 0.2 mL de tampón de acetato sódico 200mM pH 5 y un patrón de glucosa con 0.1 mL de glucosa y 0.1 mL de tampón de acetato sódico 200mM pH 5. La mezcla se incubó a 40°C durante 20 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 510 nm (Evolution 600 UV-VIS, Thermo Scientific).

Para la determinación de los glucanos totales, a 100 mg de muestra se le añadió 1.5 mL de HCl al 37% y se incubó la mezcla en un baño de agua a 30°C durante 45 minutos. Luego, se añadieron 10 mL de agua Milli Q y se incubó la mezcla a 100°C durante 2 h.

La mezcla fue posteriormente enfriada tras lo que se le añadieron 10 mL de KOH 2M. Después, se realizó una dilución 1/5 enrasando con tampón de acetato sódico 200mM a pH 5 y se centrifugó la muestra a 4700 rpm durante 10 min. Posteriormente, un volumen de 0.1 mL del sobrenadante fue trasvasado a tubos de

vidrio a los que se les añadió 0.1 mL de tampón de acetato sódico 200mM pH 5, y 0.1 mL de suspensión de *exo*-1,3-β-Glucanasa y β-glucosidasa. Esta operación se lleva a cabo por duplicado. Las mezclas se incubaron durante 1 h a 40°C.

Por último, se añadieron 3 mL de GOPOD, y además, se realizó un blanco con 0.2 mL de tampón de acetato sódico 200mM pH 5, y un patrón de glucosa con 0.1 mL de glucosa y 0.1 mL de tampón de acetato sódico 200mM pH 5. Las mezclas se incubaron a 40°C durante 20 min. Finalmente se midieron las absorbancias a 510 nm.

El principio del kit Megazyme se basa en que los β-(1,3)(1,6)-D-glucanos, β-(1,3)-D-glucanos y α-glucanos se solubilizan en un concentrado de ácido clorhídrico (37%; 10 N) y luego se hidrolizan con una solución de HCl 1,3N a 100 °C durante 2 h. La hidrólisis de D-glucosa se completa mediante la incubación con una mezcla de alta pureza de *exo*-(1,3)-β-glucanasa y β-glucosidasa. Mientras que algunos β-glucanos son fácilmente solubles en agua caliente o KOH caliente, estos disolventes no son eficaces en la solubilización de los β-glucanos de la levadura o las setas. El análisis de estos glucanos requiere de una hidrólisis ácida parcial previa para eliminar las propiedades de formación de gel y enlaces covalentes a otros polisacáridos -por ejemplo quitina- o proteínas.

La reacción que tiene lugar en ambas determinaciones, se basa en que la glucosa, el agua y el oxígeno son los sustratos, mientras que el ácido glucónico y el peróxido de hidrógeno son los productos. En la determinación, medimos rápidamente uno de los productos formados, el peróxido de hidrógeno. Para que esto se pueda medir, a la enzima glucosa oxidasa se le adicionan dos componentes, la 4-aminoantipirina y un fenol; cuando estos dos compuestos reaccionan con el peróxido de hidrógeno da lugar a la aparición de un compuesto (Quinoneimina), de color rosa, por lo tanto, a mayor color rosa, mayor cantidad de peróxido de hidrógeno formado.

**Tabla 5. Reacciones en la determinación de los α-glucanos**

| Condiciones | Reacción |
|---|---|
| Amiloglucosidasa, 40°C, 30 min | α.glucanos + $H_2O$ ⟶ D-glucosa |
| Glucosa oxidasa, 40°C, 20 min. | D-glucosa + $H_2O$ + $O_2$ ⟶ D-gluconato + $H_2O_2$ |
| Peroxidasa, 40°C, 20 min. | $H_2O_2$ + ácido ρ-hidroxibenzoico + 4-aminoantipirina ⟶ Quinoneimina + $H_2O$ |

**Tabla 6. Reacciones en la determinación de los glucanos totales**

| Condiciones | Reacción |
|---|---|
| HCl concentrado, 30°C, 45 min. | 1,3:1,6-β-glucanos + 1,3-β-glucanos + α-glucanos + $H_2O$ → Glucanos solubles |
| HCl 1.3 M, 100°C, 2 h. | Glucanos solubles + $H_2O$ → D-glucosa + Polisacáridos (trazas) |
| *Exo*-1,3-β-glucanasa + β-glucosidasa, 40°C, 1 h. | Polisacáridos (trazas) + $H_2O$ ⟶ D-glucosa |
| Glucosa oxidasa, 40°C, 20 min. | D-glucosa + $H_2O$ + $O_2$ ⟶ D-gluconato + $H_2O_2$ |
| Peroxidasa, 40°C, 20 min. | $H_2O_2$ + ácido ρ-hidroxibenzoico + 4-aminoantipirina → Quinoneimina + $H_2O$ |

# Resultados y Discusión

Capítulo 4

## 4.1. Magdalenas enriquecidas en β-glucanos fúngicos como alimento funcional

Para determinar la resistencia del extracto enriquecido en β-glucanos a los diferentes procesados se eligieron dos modelos de alimentos: uno mínimamente procesado, con una mínima influencia sobre el extracto de β-glucanos, como fue el yogur, que se describirá posteriormente; y la magdalena, donde se esperaba una gran influencia sobre el extracto debido al tratamiento térmico durante su procesado y a la gran cantidad de hidratos de carbono que el producto contiene de partida.

### 4.1.1. Efecto del horneado en las magdalenas funcionalizadas con extracto enriquecido en β-glucanos

El extracto fúngico se mezcló con una masa cruda de un preparado comercial para hacer magdalenas al 1.43%, y se determinó el contenido en α- y β-glucanos mediante el aislamiento de aquellos PSC con masa molecular mayor que 3.5 KD para poder diferenciarlos de oligómeros o productos de degradación generados por el procesado. La masa utilizada para hacer las magdalenas contuvo entre 100 y 140 mg α-glucanos/g masa (Figura 13). Aparentemente, la masa control (CONTROL) y la masa con sólo ergosterol (ERG) contuvo menos cantidad de α-glucanos -aproximadamente entre 20 y 40 mg/g masa menos- que cuando se mezcló con el extracto de PSC. Podría pensarse que estas diferencias fueran debidas al aporte extra de α-glucanos provenientes del extracto de PSC, sin embargo, las bajas cantidades en que fue adicionado en la mezcla 1.43% (p/p) no son suficientes para explicar estas diferencias. Por lo tanto, estos resultados indican que podría darse una cierta interacción entre los α- y β-glucanos, procedentes estos últimos del extracto de PSC. Esta interacción podría ser debida a los demás componentes de la mezcla, puesto que la masa contiene una elevada cantidad de proteínas tipo gluten y agentes emulsionantes de forma que, algunos β-glucanos de baja masa molecular podrían unirse durante el amasado a los α-glucanos en la red del gluten y pasar a formar parte de los PSC de más alto peso molecular (> 3.5 KD), lo que haría aumentar tanto el número de α-glucanos como el de β-glucanos determinados en las muestras. Además, la formación de estos complejos podría interferir a la hora de cuantificar correctamente el número de α- y β-glucanos, ya que en el tipo de ensayo empleado el cálculo de los β-glucanos se hace por sustracción del número de α-glucanos a los glucanos totales.

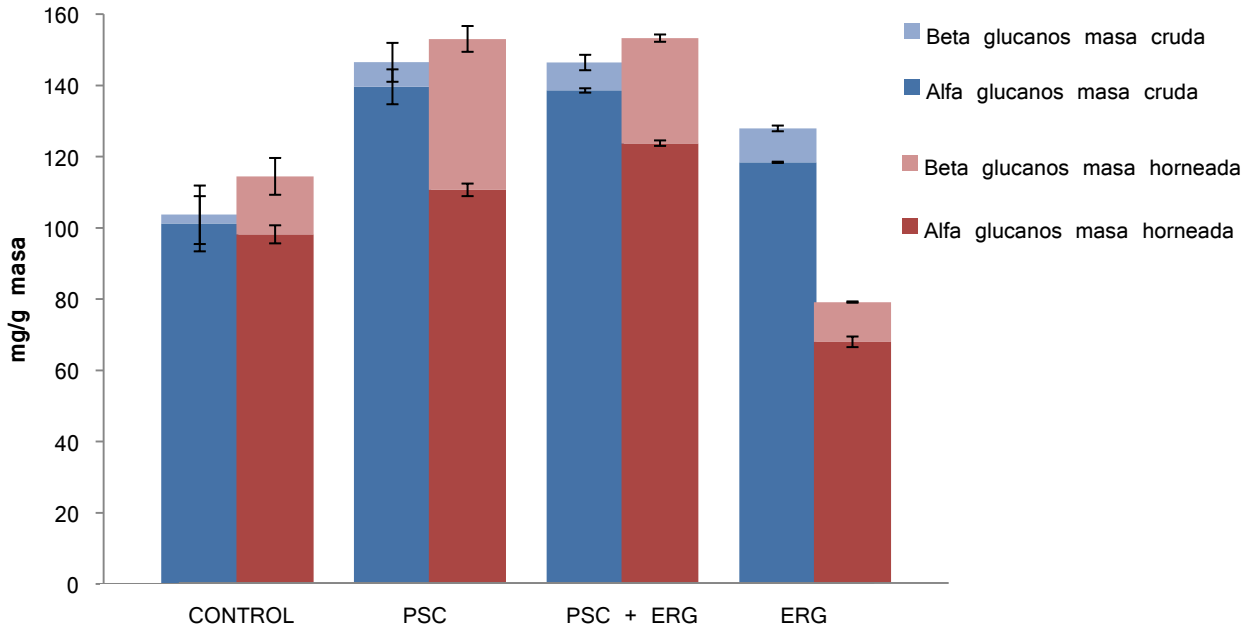



**Figura 13. Contenido de α-glucanos y β-glucanos en las diferentes formulaciones de magdalenas crudas y horneadas.**

En todas las muestras de masa cruda, la mayoría de los glucanos presentes en las magdalenas fueron α-glucanos procedentes del almidón de la harina de las magdalenas. La cantidad de β-glucanos en las masas crudas en comparación con los α-glucanos fue muy pequeña debido a que el extracto contuvo 3.6 mg β-glucano/g extracto fue adicionado en un porcentaje bajo sin que se pudiera distinguir de los β-glucanos originales del trigo y aquellos procedentes de los extractos fúngicos.

El proceso de horneado produjo una pérdida de agua de constitución de alrededor de un 9%, factor que se tuvo en consideración a la hora de hacer los cálculos para poder referirlos todos a g de masa cruda y, por tanto, poder comparar valores. Además dio lugar a la adquisición de un tono marrón en la superficie, y un aumento de volumen debido a la expansión de las burbujas de gas ($CO_2$) con el calor del horno. Los resultados mostrados en la Figura 13 sugieren que el horneado supuso una disminución de los α-glucanos excepto para el caso de las magdalenas control. Pero para entender los cambios que sufre la masa con las altas temperaturas, hay que ver los pasos que se dan durante el horneado. Primero, durante los primeros minutos de horneado (Tª < 60°C), las α-amilasas catalizan la reacción de hidrólisis de los α-(1-4)-glucanos dando lugar a unidades más elementales lo que conlleva una disminución en la viscosidad de la masa. Por otra parte, las β-amilasas liberan maltosa a partir del almidón. Sin embargo, cuando se alcanzan temperaturas de 70-85°C tiene lugar la inactivación térmica de las amilasas. Al mismo

tiempo, al superar los 60°C, las proteínas del gluten empiezan a coagularse y liberan agua, que es tomada por el almidón presente. Esas proteínas coaguladas se adhieren a la superficie del almidón y forman una malla compacta pero elástica que evita la pérdida de las burbujas de gas y mantiene la forma hinchada de la masa, luego se generan estructuras moleculares grandes de alta masa molecular. Por último, al enfríar las magdalenas, se obtiene una estructura con menos agua, más compacta y entrelazada (*A.A.P.P.A.,* 2004).

Por lo tanto, aunque parezca que los α-glucanos se degradan no ocurre lo mismo que con los β-glucanos, que parecen aumentar, cosa que no puede ser posible debido a que no pueden sintetizarse de novo, de ahí que los resultados podrían sugerir que las estructuras complejas que se forman con el horneado son también debidas a la unión de α- y β-glucanos, generando moléculas difíciles de separar y analizar. En cualquier caso, si se tiene en consideración la totalidad de los glucanos, se puede concluir que el proceso de horneado no modifica de manera importante la cantidad de glucanos de masas moleculares > 3.5 KD, comparado con la masa cruda, excepto para las muestras enriquecidas con ergosterol, donde el nivel se reduce significativamente.

Si consideramos pues, el total de glucanos antes y después del horneado se observa un ligero incremento con el horneado. El horneado es un tratamiento térmico que favorece la formación de enlaces fuertes entre la trama de la magdalena por lo que no es de extrañar que después del horneado se aíslen y midan mayor cantidad de polisacáridos de alto peso molecular.

El único dato sorprendente fue el encontrado para la magdalena adicionada con sólo ergosterol, donde el horneado supuso una disminución significativa de glucanos de alto peso molecular, como si la presencia de este compuesto favoreciera la degradación de α-glucanos, hecho al que no se encuentra explicación puesto que ocurrió en las cuatro determinaciones realizadas.

### 4.1.2. Efecto de la digestión *in vitro* en las magdalenas horneadas y funcionalizadas con extracto enriquecido en β-glucanos

Tras el horneado, las magdalenas fueron sometidas a un proceso de digestión *in vitro* que simulaba las condiciones fisiológicas de la digestión humana. Como se muestra en la Figura 14, tras la digestión de las magdalenas los niveles de α-

glucanos disminuyeron drásticamente en los cuatro tipos de magdalenas estudiadas. Estos resultados fueron los esperados puesto que el almidón es un polisacárido fácilmente digerible por los animales monogástricos, pudiendo ser degradado totalmente y transformado en monosacáridos para ser absorbidos.

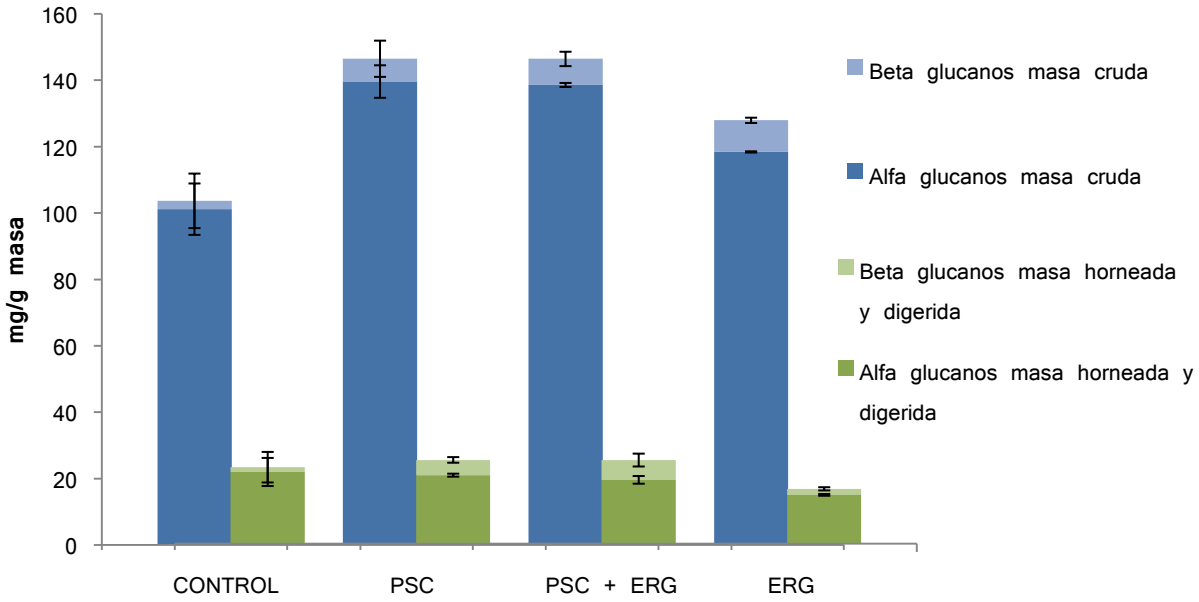



**Figura 14. Contenido de α-glucanos y β-glucanos en las diferentes formulaciones de magdalenas crudas, horneadas y digeridas**

En nuestro modelo de digestión *in vitro*, la digestión del almidón comenzaría en la etapa de masticación, proceso mecánico en el que se aumenta la superficie de exposición a las enzimas hidrolíticas aportadas por la saliva de voluntarios, entre las que se encuentra la α-amilasa salivar, que hidroliza uniones α-(1,4); hasta el descenso del pH en la etapa de digestión gástrica. La digestión del almidón propiamente dicha tendría lugar en la etapa de digestión intestinal, en un proceso que simularía los primeros tramos del intestino delgado, donde la enzima que participa es la α-amilasa pancreática, enzima presente en la solución pancreática adicionada en nuestro modelo de digestión *in vitro*. La α-amilasa pancreática rompería la cadena lineal de la amilosa pero no podría romper las ramificaciones de enlaces α-(1-,6) de la amilopectina por lo que se generarían en el recipiente del digestor una mezcla de glucosa, maltosa y oligosacáridos (*Mataix J.,* 2009). Todo este proceso de digestión provocaría una disminución de las cantidades de α-glucanos en la muestra, entendiendo esta pérdida de α-glucanos como una absorción de las moléculas más elementales que lo conforman.

Los β-glucanos se vieron afectados en menor medida por la digestión al no ser degradados por nuestras enzimas digestivas (*Bilal T. y col.,* 2012). Los β-glucanos presentes en nuestras muestras pertenecen principalmente al extracto de PSC obtenido de la seta *Pleurotus ostreatus*. En este género los β-glucanos se distribuyen aproximadamente entre un 27.1 y un 37.8 % como fibra soluble, y entre un 62.2 y un 72.9 % como fibra insoluble (*Manzi P. y col.,* 2004), por lo tanto, la mayoría de los β-glucanos de nuestras muestras pueden ser considerados como fibra no digerible.

A continuación se recogen los datos obtenidos en forma de porcentaje de degradación tras el horneado y digestión de las muestras:

**Tabla 6. Porcentaje de degradación de α-glucanos y β-glucanos tras el horneado y la digestión de las magdalenas**

| Muestra | α-glucanos | β-glucanos |
|---|---|---|
| CONTROL | 78.58% | 42.56% |
| PSC | 85.17% | 32.76% |
| PSC + ERG | 86.09% | 23.59% |
| ERG | 87.55% | 80.86% |

Si se calcula el % de degradación de los α- y β-glucanos se obtiene que el % de degradación tras la digestión de los α-glucanos es superior al de los β-glucanos en todos los casos estudiados puesto que los α-glucanos (almidón) son compuestos muy digeribles, mientras que los β-glucanos forman parte de la fibra no digerible (Tabla 6). El porcentaje de degradación de los α-glucanos fue del 78-88% aproximadamente.

Para el caso de los β-glucanos, el porcentaje de degradación es menor del 50%, excepto en el caso de la magdalena suplementada únicamente con ergosterol. También podemos ver que las magdalenas suplementadas con Extracto de PSC tienen porcentajes de degradación más bajos para los β-glucanos que las magdalenas sin suplementar, esto se debe a que los β-glucanos procedentes del extracto de PSC son principalmente insolubles y no pueden ser degradados por las enzimas digestivas.

## 4.2. Yogures enriquecidos en β-glucanos fúngicos como alimento funcional

El otro alimento funcional objeto de estudio fue el yogur en el que, al igual que en la magdalena, el extracto se adicionó al 1.4% (w/w). La composición de los polisacáridos de los yogures es totalmente diferente a la que encontramos en las magdalenas puesto que no tienen casi α-glucanos. En realidad no tienen casi hidratos de carbono sino proteínas, por lo que la adición de β-glucanos fúngicos supone un cambio muy acusado en su perfil de polisacáridos. Esto se puede observar en la Figura 15, donde la cantidad de α- y β-glucanos del yogur control es muy baja comparada con la de los yogures suplementados. Los azúcares que contiene son principalmente disacáridos como la lactosa, ya que la cantidad de β-glucanos sintetizados por bacterias lácticas es muy pequeña.

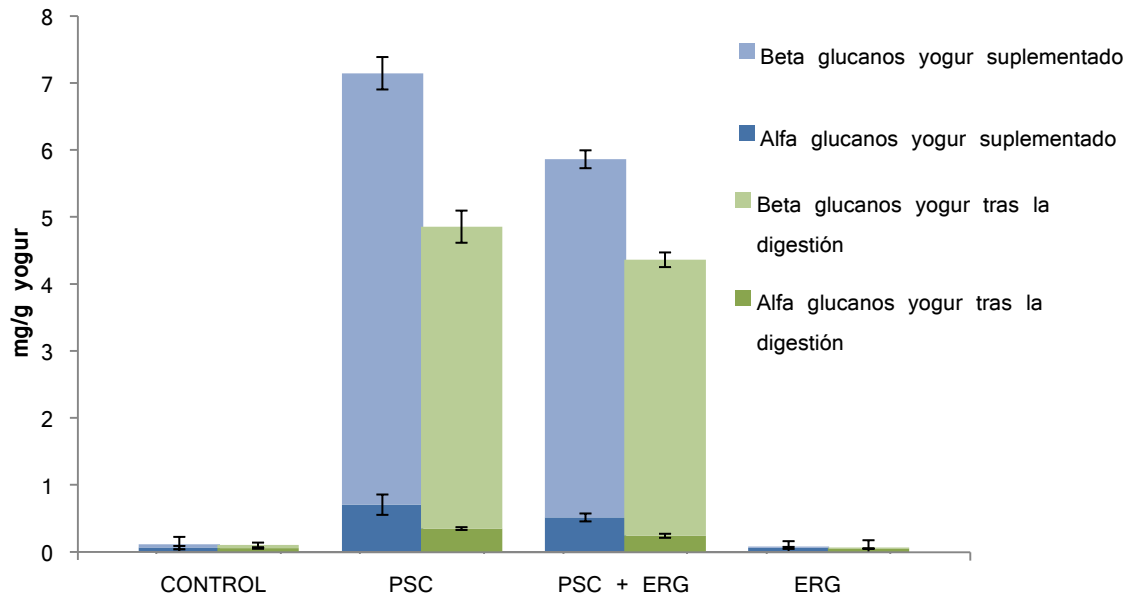



**Figura 15. Contenido de α-glucanos y β-glucanos en las diferentes formulaciones de yogures suplementadas y tras la digestión.**

En los yogures suplementados, los α- y β-glucanos que se observan proceden del extracto de PSC del hongo *Pleurotus ostreatus* que contenía principalmente β-glucanos y, en menor cantidad, α-glucanos. Según los datos, este suplemento aportó entre 5 y 6 mg de β-glucanos/g yogur. La suplementación del yogur se hizo tras la fermentación de la leche, luego es un ejemplo de alimento poco procesado, que sólo fue sometido a un proceso de homogeneizado no térmico tras el cual se pasó al proceso de digestión *in vitro*.

La digestión de los yogures funcionalizados supuso una degradación de hasta un 52% de los α-glucanos. Sin embargo, los β-glucanos se degradaron entre un 23-30% aprox. (Tabla 7). Esta degradación pudo observarse tanto en los yogures enriquecidos con extracto de PSC como en el yogur enriquecido con extracto de PSC y ergosterol, luego la adición de ergosterol no supuso cambio alguno durante el proceso de digestión al que se sometieron las muestras (su efecto se describirá con mayor detalle más adelante).

**Tabla 7. Porcentaje de degradación de los α- y β-glucanos tras la digestión de los yogures**

| Muestra | α-glucanos | β-glucanos |
|---|---|---|
| CONTROL | 3.85% | 7.18% |
| PSC | 50.23% | 30.51% |
| PSC + ERG | 52.65% | 23.47% |
| ERG | 8.50% | 7.79% |

De forma similar a lo observado para las magdalenas, el porcentaje de degradación de los β-glucanos fue menor comparado con el de los α-glucanos puesto que los primeros forman parte de la fibra no digerible.

## 4.3. Comparación de las matrices alimentarias

Para poder seleccionar la mejor matriz alimentaria para la incorporación del extracto de PSC se compararon los cambios que sufrían los β-glucanos tras la digestión si formaban parte de una magdalena, un yogur o si se digerían directamente sin la protección de una matriz alimentaria (Figura 16).

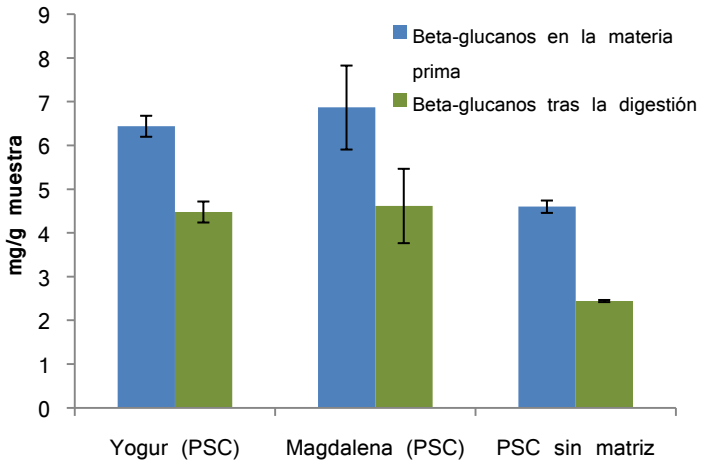



**Figura 16. Efecto de la matriz alimentaria en la digestión de los β-glucanos**

Cuando el extracto formaba parte de una magdalena, tras la digestión se observó una degradación del 32.76% lo que, comparado con los datos de cuando formaba parte del yogur (30.51%), se trata de un % de degradación muy similar. Sin embargo, si se digería el extracto solo, la degradación era del 42.56%, luego lo más adecuado sería que se consuman como β-glucanos dentro de una matriz alimenticia. Sin embargo, en este estudio los dos tipos de matriz alimentaria fueron igualmente adecuados como medio para incorporar los β-glucanos.

## 4.4. La suplementación conjunta de ergosterol y β-glucanos

A la hora de tratar de diseñar un alimento con una mezcla de dos compuestos con actividad hipocolesterolémica (ergosterol y β-glucanos) hay que investigar posibles sinergias positivas/negativas, ya que los β-glucanos presentes en el extracto de PSC son considerados como fibra no digerible, existiendo la posibilidad de que puedan unirse al ergosterol, de igual forma que lo harían al colesterol, formando complejos que dificultasen tanto su actuación como agentes hipocolesterolémicos, como la correcta determinación de los β-glucanos.

Para poder estudiar la influencia del ergosterol en la determinación de β-glucanos se determinó la concentración de ergosterol presente en las matrices alimentarias y se comparó la cantidad de β-glucanos en la matriz alimentaria suplementada con extracto de PSC frente a la cantidad de β-glucanos en la matriz alimentaria cuando se adicionaba, además, ergosterol.

En las magdalenas suplementadas con ergosterol, la concentración de ergosterol en la masa cruda rondaba los 0.4-0.6 mg ergosterol/g alimento crudo. Esta cantidad se mantenía más o menos constante tras el horneado y la digestión de las magdalenas, sin embargo, al adicionar extracto de PSC la cantidad de ergosterol disminuía con el horneado y la digestión (Figura 17) (el horneado supuso una disminución del 43% aproximadamente, mientras que el horneado y la digestión del producto dio lugar a una disminución del 79%).

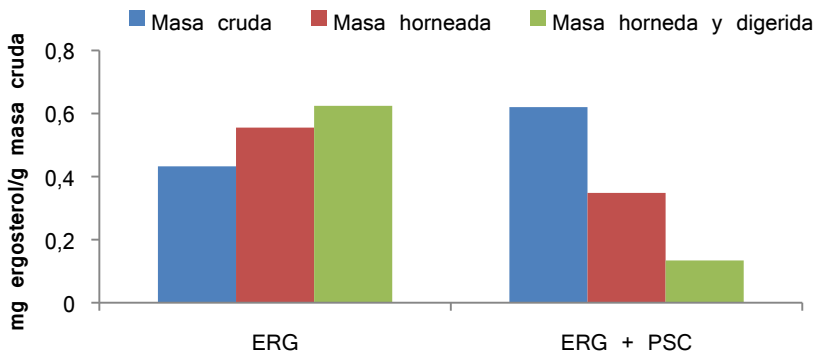



**Figura 17. Cantidad de ergosterol en las magdalenas suplementadas**

El motivo por el cual parece que el extracto de PSC induce una disminución en la cantidad de ergosterol detectada cuando se encuentra adicionado en una magdalena podría ser debido a una acción secuestradora provocando su eliminación de la fase orgánica durante el proceso de saponificación, lo que indicaría que la mezcla de ambos compuestos sería negativa.

Por otra parte, en los yogures suplementados con ergosterol la concentración de ergosterol fue similar a la de las magdalenas, sin embargo ambas muestras sufrieron una degradación similar del ergosterol tras la digestión del yogur (Figura 18).

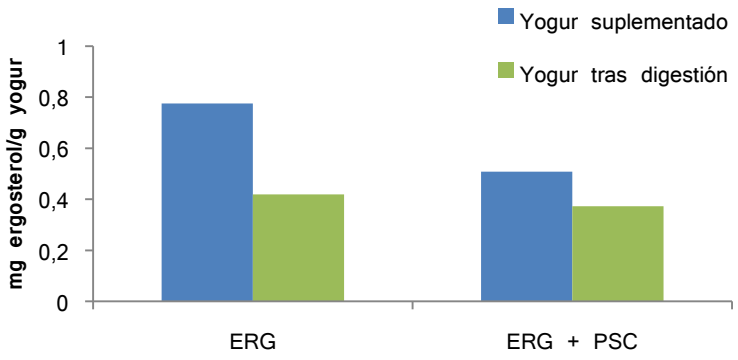



**Figura 18. Cantidad de ergosterol en yogures suplementados**

Una vez conocida las concentraciones de ergosterol en las muestras y la influencia de los β-glucanos sobre la determinación del ergosterol, se estudió la influencia del ergosterol sobre la determinación de los β-glucanos en las diferentes matrices alimentarias estudiadas (Figura 19).

Para el caso de la magdalena, la adición de ergosterol a la masa no influyó en la cantidad detectada de β-glucanos. En el yogur, sí que se observó una ligera disminución de la cantidad de β-glucanos presentes en la materia prima pero, por el contrario, esta disminución no se observó tras la digestión del yogur. Estos resultados podrían ser achacables al error experimental. Por lo tanto, podemos concluir que la digestión afectó a los β-glucanos por igual en presencia o ausencia de ergosterol e independientemente de la matriz usada.

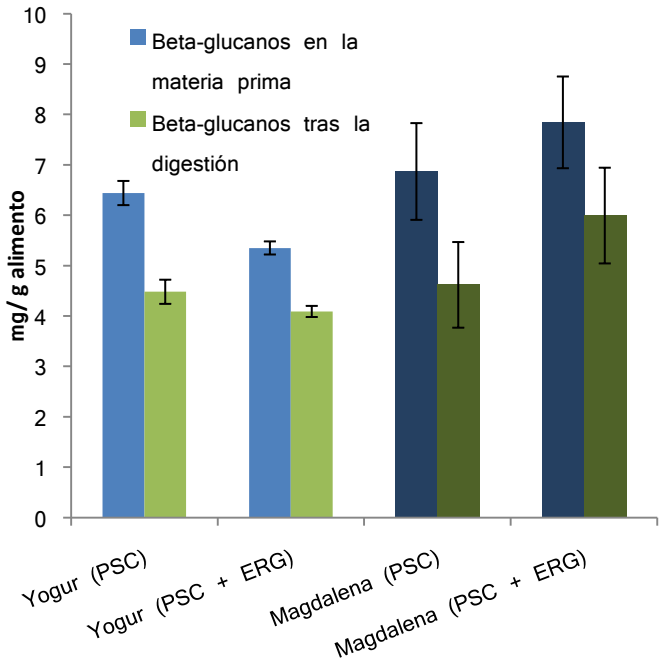



**Figura 19. Influencia del ergosterol sobre los β-glucanos en alimentos suplementados con extracto de PSC**

# Conclusiones

Capítulo 5

## 5.1. Conclusiones

- ✓ El extracto de polisacáridos obtenido a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* contuvo un 36 % de β-glucanos (p/p), lo que lo hace susceptible de ser empleado como ingrediente para funcionalizar matrices alimentarias.

- ✓ El proceso de horneado de magdalenas con/sin extracto enriquecido en β-glucanos no modificó el contenido en glucanos totales pero supuestamente sí dio lugar a la formación de complejos entre los α- y β-glucanos, impidiendo la determinación adecuada de unos y otros.

- ✓ Tras la digestión *in vitro* de las magdalenas y yogures suplementados, los α-glucanos se degradaron en mayor medida que los β-glucanos, ya que estos últimos son considerados fibra alimentaria.

- ✓ La incorporación de los β-glucanos dentro de una matriz alimentaria mejora su bioaccesibilidad en comparación con la ingesta directa, siendo las dos matrices de estudio adecuadas para incorporar este ingrediente bioactivo.

- ✓ El ergosterol no interfiere en las determinaciones de β-glucanos mediante el kit comercial utilizado, sin embargo, los β-glucanos sí podrían interferir en la capacidad del ergosterol de actuar de forma similar a los fitosteroles vegetales en la reducción de la absorción del colesterol, aunque se necesitan más estudios para confirmarlo.

# Bibliografía

Capítulo 6

A.A.P.P.A. (Academia del Área de plantas piloto de alimentos) (2004). Introducción a la tecnología de alimentos, 2º Edición. Ed. Limusa. ISBN: 968- 18-6368-2.

Aida F.M.N.A.; Shuhaimi M.; Yazid M.; Maaruf A.G. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 567-575.

Angeli J.P.F.; Ribeiro L.R.; Gonzaga M.L.C.; Soares S.A.; Ricardo M.P.S.N.; Tsuboy M.S.; Stidl R.; Knasmuller S.; Linhares R.E.; Mantovani M.S. (2006). Protective effects of β-glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. *Cell Biology and Toxicology*, 22, 285-291.

Bacic A.; Fincher G.B.; Stone B.A. (2009). Chemistry, biochemistry and biology of (1,3)-β-Glucans and related polysaccharides. Ed. Academic Press. ISBN:978-0-12-373971-1.

Badel S.; Bernardi T.; Michaud P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29, 1, 54-66.

Bilal T.; Gursel F.E.; Ates A.; Keser O. (2012). Effects of Dietary β-Glucan on Serum Lipids and Performance Indices in Rats Fed a Diet Enriched with Cholesterol. *Pakistan Veterinary Journal*, 32, 97-100.

Bobek P.; Nosalova V.; Cerna S. (2001). Effect of pleuran (beta glucan from *Pleurotus ostreatus*) in diet or drinking fluid on colits rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 45, 360-363.

Brown L.; Rosner B.; Willett W.W.; Sacks F. M. (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 30-42.

Cannon C.P. (2007). Cardiovascular disease and modifiable cardiometabolic risk factors. *Clinical Cornerstone*, 8, 11-28.

Carr T.P.; Ash M.M.; Brown A.W. (2010). Cholesterol-lowering phytosterols: factors affecting their use and efficacy. *Nutrition and Dietary Supplements*, 2, 59-72.

Cheung P.C.K. (1998). Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in hamsters fed Straw mushroom diets. *Journal of Nutrition*, 128, 1512-1516.

Daou C.; Zhang H. (2012). Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 355-365.

Davis H.R.; Zhu L.; Hoos L.M.; Tetzloff G.; Maguire M.; Liu J.; Yao X.; Iyer S.P. N.; Lam M.; Lund E.G.; Detmers P.A.; Graziano M.P.; Altmann A.W. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) Is the Intestinal Phytosterol and Cholesterol Transporter and a Key Modulator of Whole-body Cholesterol Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 33586-33592.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to β-glucans from oats and barley and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1236, 1299), increase in satiety leading to a reduction in energy intake (ID 851, 852), reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 821, 824), and "digestive function" (ID 850) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal 2011*, 9(6):2207 [21 pp.].

Gea F.J.; Láinez M.C. (2011). Cultivo de setas *Pleurotus*. *Tecnología Agroalimentaria*, Boletín informativo del SERIDA, 9, 41-48.

Gil-Ramírez A.; Aldars-García L.; Palanisamy M.; Jiverdeanu R.M.; Ruiz-Rodríguez A.; Marín F.R.; Reglero G.; Soler-Rivas C. (2013). Sterol enriched fractions obtained from Agaricus bisporus fruiting bodies and by-products by compressed fluid technologies (PLE and SFE). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18, 101-107.

Gil-Ramírez A.; Clavijo C.; Palanisamy M.; Soler-Rivas C.; Ruiz-Rodríguez A.; Marín F. R.; Reglero G.; Pérez M. (2011). Edible mushrooms as potencial sources of new hypocholesterolemic compounds. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*.

Giraudo, M.; Ugarte M.; Sanchez H.; Beaufort C.; Álvarez R.; Menéndez J. (2010). Actualización: alimentos que reducen la absorción del colesterol. *Actualización en nutrición*, 11, 128-139.

Guillamón E.; García-Lafuente A.; Lozano M.; D´Arrigo M.; Rostagno M. A.; Villares A.; Martínez J.A. (2010). Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81, 715-723.

Gunde-Cimerman N.; Cimerman A. (1995). *Pleurotus* Fruiting Bodies Contain the Inhibitor of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase–Lovastatin. *Experimental Mycology*, 19, 1-6.

Jesch E.D.; Carr T.P. (2006). Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. *Nutrition Research*, 26, 579-584.

Jeurink P.V.; Noguera C.L.; Savelkoul H.F. J.; Wichers H.J. (2008). Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, 8, 1124-1133.

Kartsonis N.A.; Nielsen J.; Douglas C.M. (2003). Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resistance Updates*, 6, 197-218.

Mantovani M.S.; Bellini M.F.; Angeli J.P.F.; Oliveira R.J.; Silva A.F.; Ribeiro L. (2008). β-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research*, 658, 154-161.

Mataix J. (2009). Nutrición y Alimentación Humana, 2º Edición. Tomo I. Ed. Ergon. ISBN: 978-84-8473-664-6

Oliveira R.J.; Ribeiro L.R; Silva A.F.; Matuo R.; Mantovani M.S.,(2006). Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of b-glucan from barley, in CHO-K1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicology In Vitro*, 20, 1225-1233.

Pacheco M.; Ancona L.; Flores A.; Pech V.C. (2005). Estimación de la demanda de *Pleurotus ostreatus* en el estado de yucatán. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 9, 1405-9282.

Pardo A.; Perona M.A.; Pardo J. (2008). Utilización de fibra de kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) en la elaboración de sustratos específicos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. *Revista Iberoamerica de Micología*, 25, 57-61.

Petravic´-Tominac, V.; Zechner-Krpan, V.; Grba, S.; Srečec, S.; Panjkota-Krbavčic´, I.; Vidovic´, L. (2010). Biological effects of yeast β-glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus,* 75, 149-158.

Rivero M. (2011). Extracción y reología de los β-glucanos de cebada y elaboración de masas de pan sin gluten enriquecidas con los extractos. Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos. E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera, Universidad de Valladolid.

Rop O.; Mlcek J.; Jurikova T. (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*, 67, 624-631.

Siró I.; Kápolna E.; Kápolna B..; Lugasi A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51, 456-467.

Synytsya A.; Míčková K.; Synytsya A.; Jablonský I.; Spěváček J.; Erban V.; Kováříková E.; Čopíková J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76, 548–556.

Tianqi W.; Hanxiang L.; Manyi W.; Tianwei T. (2007). Integrative Extraction of Ergosterol, (1,3)-α-D-Glucan and Chitosan from *Penicillium chrysogenum* Mycelia. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15, 725–729.

Valenzuela A.; Ronco A.M. (2004). Los fitoesteroles: Aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Revista chilena de nutrición*, 31, 161-169.

Vetvicka V.; Novak M. (2011) Biology and Chemistry of Beta Glucan. Vol 1: Beta Glucans-Mechanisms of action. Ed. Bentham Science. ISBN: 978-1-60805-706-1.

Wasser S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 258-274.

Welman A.D.; Maddox I.S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21, 269-274.

Werning M.L. (2010). Caracterización de la síntesis del (1,3)(1,2)-β-D-Glucano y de las bacterias lácticas productoras. Tesis Doctoral. Departamento de Biología molecular, Universidad Autónoma de Madrid.

Zekovic D.B.; Kwiatkowski S.; Vrvic M.M.; Jakovljevic D.; Moran C.A. (2005). Natural modified (1,3)-β-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 205-230.