



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de la inclusión de los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* en yogur

Julieth Pilar Uriza Pinzón

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2014

Evaluación de la inclusión de los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* en yogur

Julieth Pilar Uriza Pinzón

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director:

Ph.D. Luis Felipe Gutiérrez Álvarez

Línea de Investigación:

Desarrollo de alimentos funcionales y productos nutracéuticos

Grupo de Investigación en biomoléculas alimentarias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2014

Al creador Divino quien ha dirigido cada paso de mi vida y envía cada día ángeles reales para que todo sea posible.

A mis padres y hermanos quienes han contribuido a formar parte del ser que hoy soy.

A Jaime, amor de vida, quién con su amor y complicidad ha sido fundamental en cada sueño logrado.

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.

Albert Einstein

Agradecimientos

La autora declara sus agradecimientos:

- A Luis Felipe Gutiérrez, mi director de tesis, por su fe en el proyecto, en mí y por representar soluciones oportunas.
- A Sergio Urrego, director ejecutivo de Progal BT, por su confianza en mí, su constante guía y apoyo durante todo el proyecto.
- Al docente Carlos Novoa, hombre brillante y apasionado por el mundo de los lácteos.
- A mi compañero Edicson Mauricio quien es incondicional sin más interés que ser una excelente persona.
- A Jairo y Ernesto, quienes fueron una palabra, una sonrisa, una mano, -o tal vez cuatro-, en los momentos más críticos de desesperación.
- A Gali Quitian, quién comprensivamente me instruyó y ayudó demasiado.

Resumen

Los β -glucanos son polisacáridos derivados de cereales como la avena y la cebada, así como de algunos hongos como el *Ganoderma lucidum*, que tienen efectos benéficos sobre la salud, especialmente sobre el sistema inmune. Se han llevado a cabo diferentes investigaciones para incluir estos compuestos en bebidas y alimentos, pero dependiendo de la concentración, estos podrían afectar en menor o mayor medida las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del producto final.

Varios estudios han evaluado la adición de β -glucanos derivados de avena o cebada en matrices alimentarias, pero la inclusión de β -glucanos de hongos y levaduras dentro de productos alimentarios ha sido escasamente investigada, y tomando en cuenta que su estructura química es diferente, sus propiedades tecnológicas y funcionales también son diferentes.

Los productos lácteos son una de las principales matrices utilizadas para el diseño de alimentos funcionales, en este trabajo se busca evaluar la inclusión de adicionar β -glucanos de *Ganoderma lucidum* dentro de un yogurt batido. Los β -glucanos fueron adicionados en cinco niveles de concentración (0-1.25%) en dos momentos diferentes de adición (antes de la pasteurización, y después de la inoculación). Se evaluaron los efectos de esta adición sobre: las propiedades fisicoquímicas (pH, acidez, sinéresis, viscoelasticidad), microbiológicas (conteo de cepas probióticas) y sensoriales (aceptabilidad general) del yogurt.

Los resultados obtenidos indican que ni el nivel de concentración ni el momento de adición afectan significativamente las propiedades microbiológicas y sensoriales del yogurt. Además, la concentración de β -glucanos fue mantenida durante la vida útil del producto, y el conteo total de bacterias probióticas también se mantuvo, incluso a las concentraciones más altas de adición. Es también importante notar que la adición de β -glucanos no indujo a sinéresis en los yogures después de 21 días de almacenamiento refrigerado. Aunque el pH y la acidez no fueron afectados por la adición de β -glucanos, las propiedades viscoelásticas del yogurt variaron en función del nivel de concentración de estos polisacáridos. En general, la viscosidad incremento proporcionalmente a la concentración de betaglucanos.

Estos resultados indican que es posible elaborar un yogurt funcional con β -glucanos derivados de *Ganoderma lucidum*, aportando beneficios potenciales para desarrollos científicos e industriales. La adición de 350 mg de β -glucanos/200g de

producto antes de la pasteurización es sugerida para valorar los beneficios sobre la salud de estos compuestos bioactivos. Un estudio clínico para evaluar el beneficio potencial sobre el sistema inmune de niños está actualmente en ejecución.

Palabras clave: Hongo, *Ganoderma lucidum*, polisacáridos, β -glucanos, sistema inmune.

Abstract

β -glucans are polysaccharides derived from cereals, fungi or yeasts, which have been reported to beneficial health effects. Numerous efforts have been carried out to include these compounds in food and beverage products, but depending on their concentration, they could affect the physicochemical and sensorial properties of the final products.

Various studies have evaluated the addition of β -glucans derived from oats or barley into food matrices, but the inclusion of β -glucans from fungi and yeasts into food products has been hardly investigated, and taking into account that their chemical structure is different, their technological and functional properties are also different.

Since dairy products are one of the most important functional foods worldwide, this work aimed to evaluate for the first time the feasibility of adding β -glucans from *Ganoderma lucidum* into stirred yogurt. β -glucans were added in five different concentration levels (0-1.25%) and in two different steps of the yogurt manufacture process (before pasteurization and after inoculation). The effects of these additions were investigated on the physicochemical, microbiological and sensory properties of the yogurt.

The obtained results indicate that neither the concentration level nor the addition moment affect significantly microbiological and sensory properties of the yogurt. Moreover, the β -glucans concentration was maintained during the product shelf life, and the total counts of probiotic bacteria was also conserved, even at the highest concentration level of addition. It is also important to note that the β -glucans addition did not induced syneresis to the elaborated yogurts after 21 days of refrigerated storage. Although the pH and acidity were not affected by the addition of β -glucans, the viscoelastic properties of the yogurt varied as a function of the concentration level of these polysaccharides. In general, the viscosity increased as the concentration of β -glucans increased.

These results indicated that it is possible to elaborate a functional yogurt containing β -glucans from *Ganoderma lucidum*, providing benefits for scientific and industrial developments. The addition of 350 mg of β -glucans/200 g of product before pasteurization is suggested to assess the potential health benefit of these bioactive molecules on preschool children. A clinical study for evaluating the potential benefit on the immune system of children is currently ongoing.

Keywords: Fungi, *Ganoderma lucidum*, polysaccharides, β -glucans, immune system.

Contenido

	Pág.
Resumen	VIII
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de símbolos y abreviaturas	XV
Introducción	1
1. Capítulo 1. β-glucanos a partir de <i>Ganoderma lucidum</i>: compuestos bioactivos con efectos sobre el sistema inmune	3
1.1 Resumen	3
1.2 Introducción	4
1.3 β -glucanos del <i>Ganoderma lucidum</i>	5
1.3.1 Estructura.....	7
1.3.2 Aislamiento de los β -glucanos.....	8
1.4 Efectos de los β -glucanos sobre el sistema inmune.....	11
1.5 Uso de los β -glucanos de <i>Ganoderma lucidum</i> en alimentos.....	15
1.5.1 Dosis estimada diaria de β -glucanos de <i>Ganoderma lucidum</i>	15
1.5.2 Aplicaciones de los β -glucanos en productos lácteos.....	17
1.6 Conclusiones	20
2. Capítulo 2. Inclusión de los β-glucanos de <i>Ganoderma lucidum</i> en yogur	23
2.1 Resumen	23
2.2 Introducción	23
2.3 Materiales y métodos.....	24
2.3.1 Diseño experimental	24
2.3.2 Elaboración del yogur.....	25
2.3.3 Análisis Proximal.....	26
2.3.4 Determinación de β -glucanos de <i>Ganoderma lucidum</i>	26
2.3.5 Evaluación de las características fisicoquímicas	29
2.3.6 Evaluación sensorial	29
2.3.7 Evaluación reológica	30
2.3.8 Evaluación microbiológica.....	31
2.3.9 Análisis Estadístico	31
2.4 Resultados y Discusión.....	32
2.4.1 Análisis Proximal.....	32
37	
2.4.2 Determinación de β-glucanos de <i>Ganoderma lucidum</i>	38
2.4.3 Evaluación de las características fisicoquímicas	40
2.4.4 Evaluación sensorial	45
2.4.5 Evaluación reológica	47
2.4.6 Evaluación microbiológica.....	52
2.5 Conclusiones	55
3. Conclusiones y recomendaciones.....	57

3.1	Conclusiones.....	57
3.2	Recomendaciones.....	58
Anexo A: Formato de evaluación sensorial		60
Anexo B: Formato de aceptación sensorial en niños.		61
Bibliografía		62

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura química del B-glucano del <i>Ganoderma lucidum</i> [27].....	7
Figura 2. Estructura química del Beta-1,3- y Beta 1,6 Glucanos del <i>Ganoderma lucidum</i> [29].....	8
Figura 3. Aislamiento y purificación de los B-Glucanos del Ganoderma [30]	10
Figura 4. Efectos inmunomodulatorios del <i>Ganoderma</i> [27]	12
Figura 5. Efectos inmunomodulatorios de los glicopolisacaridos del <i>Ganoderma lucidum</i> (GLPS). [33]	15
Figura 6. Estructuras de β -glucanos de diferentes fuentes. [43]	19
Figura 7. Flujo de proceso para la preparación del yogurt	25
Figura 8. Contenido de carbohidratos en las muestras.....	32
Figura 9. Contenido de grasa en las muestras	34
Figura 10. Contenido de proteína en las muestras	35
Figura 11. Contenido de sólidos totales en las muestras.....	36
Figura 12. Contenido de cenizas en las muestras	37
Figura 13. Variación de los β -glucanos en el tiempo	38
Figura 14. Cinética de fermentación con o sin el ingrediente.....	41
Figura 14. Porcentaje de sinéresis de acuerdo a la concentración de β -glucanos y su momento de adición	42
Figura 15. Aceptación general del yogurt por parte de los niños.	46
Figura 16. Barrido de amplitud (G' y G'') de las muestras de yogurt	47
Figura 17. Barrido de frecuencia (G' y G'') de las muestras de yogurt	49
Figura 18. Viabilidad de microorganismos probióticos en las muestras de yogurt durante el tiempo	52

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Efectos de los polisacáridos de <i>G.lucidum</i> en las células inmunes.....	13
Tabla 2. Ingesta de β -glucanos (mg/persona/día y mg/kg de peso corporal /día) basado en datos de USDA	16
Tabla 3. Diseño experimental propuesto.....	24
Tabla 4. Valores de pH y acidez durante la vida útil	40
Tabla 5. Medias de las pruebas hedónicas realizadas a los yogures	45
Tabla 6. Conteo de microorganismos probióticos de las muestras de yogur	53

Lista de símbolos y abreviaturas

kDa	kilodaltons
β	Beta
D	Dextrogiro
CR	Receptor complemento
α Mb2 integrín	Integrín alfa M beta-2
CD	Cúmulo de diferenciación (Cluster of differentiation)
FDA	Food and Drug Administration (Administración de alimentos y medicamentos)
GRAS	Generally Recognized as Safe (Generalmente Reconocido como Seguros)
<i>G. lucidum</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>
NK	Natural Killer (Células asesinas naturales)
TLR	Toll-like receptor (Receptores de tipo Toll)
TNF	Factor de necrosis tumoral
IL	Interleuquina
NO	Óxido nítrico
PG	Prostaglandina
INF o IFN	Interferon gamma
RNA	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
GMPc	Guanosín Monofosfato sintasa
AMPc	Adenosin Monofosfato sintasa
tBOOH	Ter buti hidroxi peróxido
[Ca ²⁺]	Calcio intracelular
IP ₃	Inosiltrifosfato
DAG	Diacilglicerol
PKC	Protein kinase C (Proteína quinasa C)
MAPK	Mitogen-activated protein kinases

HCK	Tyrosine protein kinase
AKT	Proteína quinasa B
CTL	Linfocitos T citolíticos
PKA	Protein kinase A (Proteína quinasa A)
LPS	Lipopolisacárido
IgA	Inmunoglobulina A
USDA	United States Department of Agriculture

Introducción

Los alimentos funcionales son una tendencia de interés actual y que se encuentra en crecimiento potencial. Un alimento funcional se define como aquel que además de tener un aporte nutricional ofrece un beneficio y/o valor agregado para la salud de quien lo consume. [1] En las últimas décadas se han desarrollado diversidad de alimentos funcionales, para los cuales se tiene como punto de partida una matriz alimentaria saludable a la cual, generalmente, se le incorpora uno o más compuestos bioactivos.

Los compuestos bioactivos que se incorporan en los alimentos funcionales son de diferentes índoles y orígenes, pero la mayoría de ellos provienen de la naturaleza. Ejemplo de ello son los derivados del *Ganoderma lucidum*, un hongo que tiene compuestos bioactivos como el ácido ganodérico y los β -glucanos. A dichos compuestos bioactivos se les han atribuido propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antihipertensivas, antidiabéticas, hipocolesterolemiantes, entre otras. [2] [3] Los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* son polisacáridos que han sido evaluados y han demostrado actividades biológicas de modulación del sistema inmune, antitumoral, inhibición del crecimiento de células endoteliales vasculares y actividad hipoglicémica. [4] [5]

En el mundo, los β -glucanos han sido incorporados en productos como leches de fórmula, yogures, galletas, té, e inclusive en suplementos nutricionales. Uno de los alimentos percibidos positivamente para incluir compuestos bioactivos y ser denominado alimento funcional es el yogur [6]. No obstante, la inclusión de diferentes compuestos a un yogur trae consigo retos científicos y tecnológicos, dado que frecuentemente se afectan variables fisicoquímicas, sensoriales o microbiológicas, siendo las mismas fundamentales en la estabilidad, calidad e inocuidad del producto final.

En estudios que han incorporado β -glucanos a matrices lácteas se han encontrado importantes interacciones como: efectos sobre las propiedades reológicas, aumento de

determinados microorganismos, y cambios en la percepción sensorial. Estas variables podrían considerarse positivas o negativas, dado que en algunas ocasiones se han observado efectos indeseables como sinéresis, aumento de la viscosidad y en otras, efectos deseables como la conservación y protección de determinadas cepas probióticas.

[7]

En los estudios citados se evaluaron los efectos de los β -glucanos sobre matrices lácteas, pero fueron usados aquellos provenientes de avena y/o cebada. Los β -glucanos de distintos orígenes difieren unos con otros en su estructura, peso molecular y tipos de enlaces, con lo cual su solubilidad, modo de reacción y actividades biológicas también son considerablemente diferentes. Dentro de la literatura revisada no se encontró algún estudio que evaluará la utilización de los β -glucanos provenientes de *Ganoderma lucidum* sobre una matriz láctea, por ello, por medio del presente trabajo pretende evaluar los efectos de la inclusión de β -glucanos de *Ganoderma lucidum* en yogur sobre las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas. Los resultados podrían ser útiles para la producción de un yogur funcional que se ofrecerá durante un estudio clínico en niños.

1. Capítulo 1. β -glucanos a partir de *Ganoderma lucidum*: compuestos bioactivos con efectos sobre el sistema inmune

1.1 Resumen

El *Ganoderma lucidum* ha sido considerado un hongo milenario con múltiples beneficios en la salud del ser humano. Tales atributos se le han dado gracias al estudio de su composición, ya que se han encontrado más de 100 tipos de compuestos triterpenoides, polisacáridos. Se revisó la literatura enfocada a los beneficios y mecanismos de acción de los β -glucanos derivados del *Ganoderma lucidum*, encontrando que estos son polisacáridos con enlaces beta 1,3 1,6 con un amplio rango de pesos moleculares, para los cuales diferentes células del sistema inmune tendrían receptores y de esta manera se ligarían a las mismas para potenciar su función o mantenerlas en mayor alerta. El uso de este tipo de compuestos como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales se vislumbra como una oportunidad para favorecer poblaciones vulnerables como la primera infancia o ancianos. La cantidad precisa de β -glucanos a usar como ingrediente para alimentos no está aún definida, pero se considera que la adición de 150 mg a 340 mg por porción sería apropiada. Claro está, se podrían llegar a evaluar el uso de cantidades similares a los β -glucanos derivados de avena y/o cebada, de los que deben adicionarse por lo menos 750 mg por porción para contribuir a la disminución de riesgo cardiovascular. La investigación del uso de los β -glucanos en lácteos ha sido en su mayoría enfocada a aquellos derivados de cereales, y muy poco a los derivados de levaduras u hongos como el *Ganoderma lucidum*. Los efectos de este tipo de ingrediente sobre las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de alimentos como los lácteos deben ser explorados para contribuir en el desarrollo de este tipo de alimentos funcionales con efecto inmunomodulatorio.

Palabras clave: sistema inmune, *Ganoderma lucidum*, β -glucanos, lácteos, alimentos funcionales.

1.2 Introducción

El género *Ganoderma* envuelve diferentes especies de hongos, la mayoría de las cuales son bien conocidas por sus propiedades medicinales y han sido utilizadas en varios países como alimento o ingrediente de productos con distintos beneficios. Las especies de *Ganoderma* son hongos de madera en descomposición que viven como parásitos o saprofito en el tronco vivo o seco de los árboles, sobre todo en bosques templados. La evaluación fitoquímica de los componentes activos ha sido conducida predominantemente en China, Corea, Japón y los Estados Unidos. [8]

El hongo *G. lucidum* es un hongo basidiomiceto, que se ha considerado que promueve la longevidad y preserva la vitalidad en Asia. Un número de componentes bioactivos han sido identificados desde el *G. lucidum* y especies relacionadas, en los cuales los polisacáridos, triterpenoides, esteroides, lectinas, y algunas proteínas tienen propiedades benéficas en el tratamiento y prevención de una variedad de enfermedades tales como hipertensión, diabetes, hepatitis, cáncer y SIDA. [9] Adicionalmente, se ha encontrado que la concentración y tipo de algunos compuestos bioactivos como los ácidos ganodéricos pueden variar entre diferentes especies, además de que podría estar afectado por condiciones climáticas y geográficas. [8]

Normalmente, el *G. lucidum* está disponible en la forma del cuerpo fructífero maduro, micelio, y fermentación líquida. El micelio y su bioproducto por fermentación son productos alternativos o sustitutos del cuerpo fructífero. Sin embargo, ambos, los cuerpos fructíferos y el micelio del *G. lucidum* están actualmente disponibles en Asia y Norte América y están principalmente preparados para su uso en la formulación de nutraceuticos y alimentos funcionales. [9]

El *G. lucidum* es un hongo medicinal comúnmente usado en medicina tradicional china y es formulado en varios países de Asia para prevenir y tratar varias enfermedades [10, 11]. En China, el *Ganoderma* ha sido usado por los humanos desde hace miles de años [12], siendo uno de los medicamentos tradicionales más prescritos.

El hongo está ampliamente distribuido en el mundo, desde el Amazonas a regiones del sur de Norteamérica y gran parte de Asia. Este hongo se encuentra menos frecuentemente en regiones templadas que en las sub-tropicales [13].

El hongo *G. lucidum* posee un 31% de humedad y una composición (% peso seco) de 11.1% de glucosa, proteína 7.3% y un 10.2% de metales. El *G. lucidum* es un hongo bajo en calorías y rico en proteínas vegetales, quitina, vitaminas y minerales. Entre otros componentes naturales bioactivos, además de los polisacáridos y los triterpenos, se encuentran nucleósidos, ácido ganodérico, ergosteroles, proteínas, ácidos grasos insaturados, vitaminas y minerales. [14].

Los estudios recientes se han concentrado en las propiedades medicinales de estos hongos dados sus compuestos bioactivos, los cuales incluyen no solo el ácido ganodérico y los polisacáridos (β -glucanos principalmente), sino que también proteínas y otros metabolitos. [15]

1.3 β -glucanos del *Ganoderma lucidum*

Más de 200 polisacáridos han sido aislados de los cuerpos fructíferos, las esporas, micelios y caldos de cultivo del *G. lucidum*, que representan una clase de macromoléculas biológicas estructuralmente diversas con amplias propiedades fisicoquímicas con una gran capacidad para transportar información biológica debido a su variabilidad estructural. [12] Los métodos de extracción de los β -glucanos desde el *Ganoderma lucidum* pueden ser: la convencional, normalmente por medio de centrifugación en medio acuoso; con agua presurizada donde suelen usarse altas presiones y temperaturas; con fluidos supercríticos usando comúnmente dióxido de carbono como solvente; asistida con ultrasonido; y asistida con microondas; técnicas en las que por lo general parten desde el cuerpo fructífero del hongo. [16, 17] También existe el método biotecnológico para la obtención de β -glucanos en el que se parte de un inóculo y se biotransforma en cultivo sumergido bajo condiciones controladas de pH, sustrato, temperatura para fomentar la producción específica de estos metabolitos.

Los β -glucanos son polisacáridos ligados por enlaces glucosídicos, que pueden variar mucho de acuerdo a la masa molecular, solubilidad, tamaño, tipos de enlaces y configuración tridimensional. Suelen encontrarse en la pared celular de las plantas (avena, cebada), levaduras, hongos. Los polisacáridos como los β -Glucanos, heteropolisacaridos y glicoproteínas han sido aislados y caracterizados como los de mayor actividad en el *G. lucidum* [18]. Se ha encontrado que los glucanos con alto peso molecular parecen ser más efectivos que los de bajo peso molecular. [19]

A partir del *G. lucidum* han sido aislados más de 200 polisacáridos. La investigación farmacéutica moderna muestra que los polisacáridos de *G. lucidum* tienen varios efectos fisiológicos y para la salud, incluyendo actividad antioxidante, inmunomoduladora y anti-tumor. [20] [21] Entre los principales polisacáridos aislados del *G. lucidum* se encuentran: polisacáridos con enlaces β -D 1-3, β - D 1-6, heteroglucanos con enlaces β -1-4, y peptidoglucanos (Ganoderan A, B, y C). [22]

Diferentes polisacáridos a partir del *G. lucidum* podrían producirse de acuerdo al sustrato que tenga el hongo en el medio de fermentación. Un estudio que empleó como sustrato residuo de cuajada de soya caracterizó distintos tipos de polisacáridos los cuales, dependiendo de su estructura, peso molecular, conformación, inclusive las condiciones de cultivo del micelio podrían tener mayor o menor actividad biológica sea como antioxidante y/o inmunoestimulador. [20] Los principales polisacáridos bioactivos aislados de las especies del *Ganoderma* son glucanos, beta-(1,3) y beta-(1,6)-D-Glucanos. Uno de los productos más investigados últimamente llamado *Ganopoly*, consta principalmente de polisacáridos compuestos por unidades de glucosa. Aproximadamente la tercera parte de los polisacáridos consisten de β -(1-3)-D-Glucanos, que contienen ramificaciones β -(1-6)-D-glucosiladas. [12]

Cuando los glucanos son consumidos, pueden ser absorbidos en el tracto gastrointestinal y luego entrar a la circulación para influir el sistema inmune sistémico. Varias actividades antitumorales e inmunomoduladoras se han reportado desde los años 60 y recientemente se han conducido amplios estudios sobre el efecto antitumoral, especialmente los polisacáridos solos y ligados a proteínas. Los polisacáridos, especialmente los β -Glucanos han mostrado que poseen efectos anti-tumorales a través de la inmunomodulación y anti-angiogénesis. Adicionalmente, los polisacáridos tienen un

efecto protector frente a los radicales libres reduciendo el daño celular causado por mutágenos. [12]

β -glucanos del *G. lucidum* de bajo peso molecular (5.2 – 15.4 kDa) también han demostrado actividad antioxidante, y se requerirían mayores estudios para conocer otros beneficios y mecanismos de acción. De esta manera, también podrían tener potencial como antioxidantes naturales en la industria de alimentos y farmacéutica. [21]

1.3.1 Estructura

Los β -Glucanos (beta-Glucanos) se componen de polímeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos tipo beta. Estos anillos de seis caras pueden ser conectados unos a otros, en una variedad de posiciones en la estructura del anillo de D-glucosa variando su solubilidad, viscosidad, peso molecular y configuración tridimensional. (Figura 1)

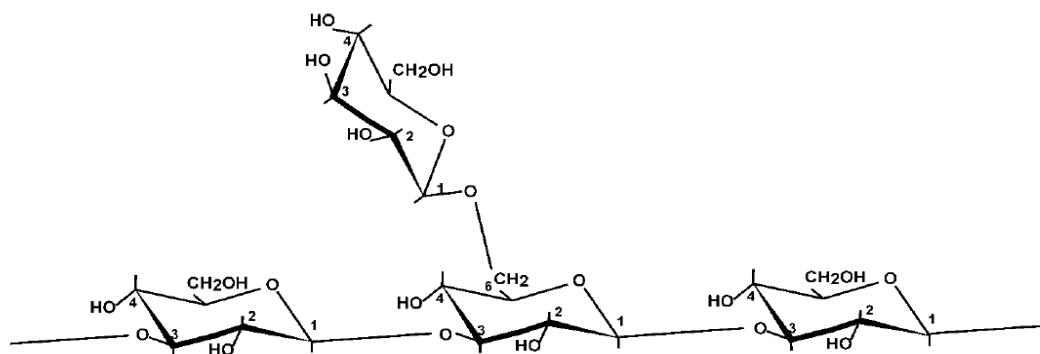


Figura 1. Estructura química del B-glucano del *Ganoderma lucidum* [23]

La estructura química más común de los β -glucanos de hongos es beta-1,3-Glucanos en el tallo y diferentes grados de beta-1,6 y/o beta-1,4 en las ramificaciones. Investigaciones han demostrado que β -glucanos insolubles (1,3 / 1,6), tienen mayor actividad biológica que sus homólogos β -glucanos solubles (1,3 / 1,4) [24]. (Figura 2)

La forma más activa de los β -glucanos son los que integran unidades de D-glucosa unidas unas a otras en la posición (1,3) con cadenas laterales de D-glucosa unidas a la posición (1,6). Estas son referidas como 1,3/1,6- β -Glucano. Algunos investigadores han sugerido que es la frecuencia, la ubicación y la longitud de la cadena lateral, en lugar de

la columna vertebral de β -glucano, la que determina su actividad sobre el sistema inmune. [24]

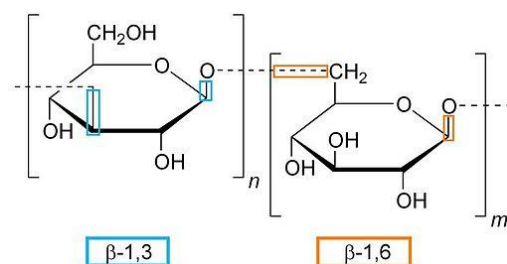


Figura 2. Estructura química del Beta-1,3- y Beta 1,6 Glucanos del *Ganoderma lucidum* [25]

Otra variable es el hecho de que algunos de estos compuestos contienen una única cadena de filamentos, mientras que las columnas vertebrales de otros beta-1,3-Glucanos existen en forma de cadenas de hélice doble y triple. Hay opiniones diferentes sobre qué peso molecular, forma, estructura y fuente de β -(1,3)-Glucanos proporcionan el mayor beneficio terapéutico.

La estructura en triple hélice, el peso molecular y la carga de los polímeros glucanos son determinantes importantes en la unión al receptor de membrana (CR3, aMb2 integrín, o CD11b/CD18) a través del cual se inicia la respuesta inmune innata o adaptativa de los linfocitos y macrófagos [23], siendo este el paso inicial de la notable capacidad de los β -glucanos derivados *G. lucidum* para modular el sistema inmunitario.

1.3.2 Aislamiento de los β -glucanos

La Administración de Drogas y Alimentos, (Food and Drug Administration FDA), ha aceptado la notificación de la afirmación de GRAS (Generalmente Reconocido como Seguros, por sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe) a los β -glucanos aislados del hongo *G. lucidum*. Las condiciones específicas de fabricación, los datos de seguridad y las especificaciones del producto solo se aplican a la versión β -1,3-D-Glucano producido con un proceso tal como se define en el expediente de GRAS y en la notificación de FDA. [26]

El micelio de la cepa de *G. lucidum* se subcultiva y es mantenido en medio de agar estéril bajo condiciones controladas. El proceso de fabricación se inicia con la preparación de una medio de cultivo que contiene glucosa, galactosa, sacarosa, manosa y extracto de levadura. Después de un procedimiento de esterilización a una temperatura seleccionada y la presión durante un tiempo específico, el de *G. lucidum* se introduce en el medio estéril y se cultiva utilizando una incubadora a diferentes temperaturas por 3-5 semanas para permitir el crecimiento completo del hongo. Posteriormente, se extraen los β -glucanos del micelio, utilizando una centrífuga de alta velocidad y un homogeneizador ultrasónico. La solución resultante se filtra y se separa usando una membrana cerámica para despojar a la mayoría de las pequeñas moléculas de carbohidratos residuales. Las partículas del concentrado de β -glucanos son reunidas, secadas y molidas en la forma de polvo. Al finalizar, los β -glucanos se empaquetan como polvo. [26] (Figura 3)



Figura 3. Aislamiento y purificación de los B-Glucanos del Ganoderma [26]

El producto final está compuesto por β -glucanos (50-70%) con un contenido total de carbohidratos de más de 95%. Los β -glucanos también contienen aproximadamente 1% de grasa, 1% de proteínas, 3% de cenizas y 2% humedad. [26]

1.4 Efectos de los β -glucanos sobre el sistema inmune

Los β -glucanos son reconocidos por su capacidad de activar el sistema inmunológico. Se sabe que un receptor en la superficie de las células inmunes llamado Receptor del Complemento 3 (CR3 o CD11b /CD18) es responsable de la unión a β -glucanos, permitiendo que las células inmunes los reconozcan. Sin embargo, la actividad de los β -glucanos, diferente de algunos fármacos que sobre estimulan el sistema inmunológico, hacen que este sistema funcione mejor. Al mejorar la actividad del sistema inmunológico, los β -glucanos ayudan en el tratamiento y prevención de infecciones, así como potencial adyuvantes en el tratamiento del cáncer. [5]

Los polisacáridos son unos de los principales compuestos del *G. lucidum* que modulan la función inmune in vivo e in vitro, su efecto es múltiple: promueve la presentación del antígeno a las células, acción sobre células mononucleares, inmunidad celular y humoral. [19]

Estudios en ratones inmunosuprimidos han mostrado como los polisacáridos del *G. lucidum* mejoran la respuesta inmunológica, ayudan a recobrar las células de la médula ósea, glóbulos rojos, glóbulos blancos así como las células natural killer (NK) esplénicas, las células T natural killer. Mejora la proliferación de linfocitos T y B (al octavo día de suministrado), los linfocitos T citotóxicos (al quinto día) y las células NK (entre el séptimo y noveno día), se promueve la fagocitosis y la citotoxicidad de macrófagos al día doce sin encontrar ningún tipo de efectos adverso. [27]

Aún no están completamente claros los detalles sobre la forma como las células reconocen a los polisacáridos. Sin embargo, hay reportes y experimentos que han propuesto algunos receptores de β -glucanos. [28] Entre los receptores de β -glucanos que intervienen en estas actividades inmunomoduladoras se encuentran el receptor de Complemento 3 (CR3, α M β 2-integrina, CD11b/CD18), la lactosilceramida, el glicoesfingolípido, receptores estabilizadores de radicales libres, la dectina-1, y los receptores TLR-2 y TLR-4. [12] El reconocimiento de los microbios y sus moléculas mediadoras por parte de los macrófagos, es mediado por receptores TLRs que son específicos para diferentes componentes microbianos. [12] Se ha encontrado que el *G. lucidum* suprime marcadamente la secreción de citoquinas inflamatorias: factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleuquina-6 (IL-6), óxido nítrico (NO) y la prostaglandina E 2 (PGE 2). [3]

Los polisacáridos del *G. lucidum* como inmunomodulador biológico actúan a través de los siguientes mecanismos [12] (Figura 4):

1. Mediante la activación de los macrófagos, facilita la transformación de linfocitos T, en células T citotóxicas y, aumenta el número y la actividad de los linfocitos B y las células natural killer (NK).
2. Puede activar el sistema retículo endotelial y el sistema de complemento; Induce varios factores inmunes tales como: INF, TNF., etc.
3. Puede influenciar “el Sistema Inmune neuro endocrino”
4. Puede facilitar la síntesis de RNA y ADN y la síntesis celular de proteínas, así como aumentar los contenidos celulares de GMPc y AMPc.

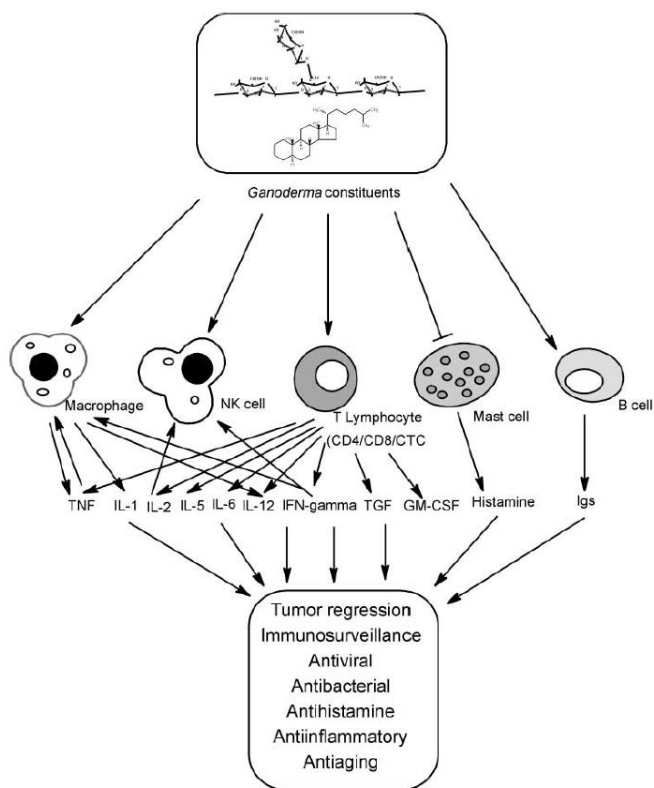


Figura 4. Efectos inmunomoduladores del *Ganoderma* [23]

Tabla 1. Efectos de los polisacáridos de *G.lucidum* en las células inmunes.

Células de Inmunidad	Efectos
Macrófagos	<p>Mejora la fagocitosis.</p> <p>Promoción IL-1, la producción del TNFα y la expresión del TNFα mRNA.</p> <p>Previene la lesión oxidativa inducida por tBOOH oxidante</p> <p>Protege la membrana mitocondrial y alivia la lesión de la membrana por radicales libres.</p> <p>Incrementa el [Ca²⁺]</p> <p>Induce la formación del IP₃ y el DAG</p> <p>Incrementa la actividad del PKC</p> <p>Activa los macrófagos a través de TLR4 y TLR4-modulada por proteína quinasa y vías de señalización.</p> <p>Aumento de la PKC, MAPK, HCK y actividad de la tirosina quinasa Lyn.</p>
Neutrófilos	<p>Inhibir la apoptosis espontánea e inducida por la activación de AKT-regulados vías de señalización.</p>
Células Dendríticas	<p>Promover la maduración y la iniciación de la respuesta inmune inducida por CD.</p> <p>Promover la citotoxicidad de CTL específica inducida por CD.</p> <p>mejorar las células NK</p>
Células Natural killer	<p>Aumentar la citotoxicidad mediada por células NK</p> <p>Promover la IL-2 y la producción de IFN-γ</p>
Linfocitos T	<p>Incrementar la síntesis del DNA y mejorar la actividad del DNA polimerasa α.</p> <p>Incrementar el porcentaje de CD4⁺, CD5⁺ y CD8⁺.</p> <p>Incrementar la producción del IP₃ y el DAG.</p> <p>Incrementar el PKA y el PKC.</p>

Células de Inmunidad	Efectos
Linfocitos B	Incrementar la proliferación linfocitaria inducida por LPS. Aumentar la secreción de inmonoglobulina. Estimular la expresión del PKC. Reducir la respuesta de mucosa de IgA específica en ratones adultos jóvenes inmunizados con la toxina del cólera por vía oral.

Extraído de : [19]

En la Figura 5, se aprecia un esquema de los efectos inmunomoduladores de los polisacáridos del *Ganoderma lucidum* sobre las células inmunes: Estimula la proliferación y activación de las células B, promueve la relación de las células T y el TNF, aumenta la activación y maduración de las CD inmaduras, promueve la maduración y diferenciación de los macrófagos, y sensibiliza a las células NK por citotoxicidad. Estos efectos son mediados por diferentes vías de señalización.

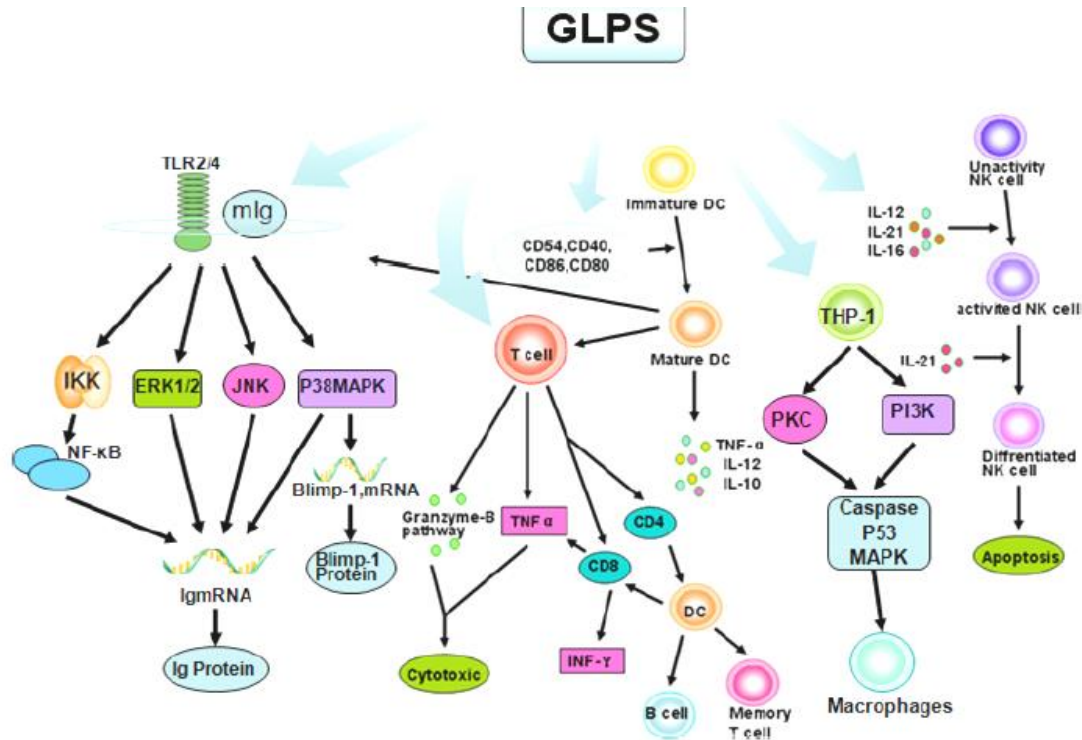


Figura 5. Efectos inmunomoduladores de los glipopolisacaridos del *Ganoderma lucidum* (GLPS). [29]

1.5 Uso de los β-glucanos de *Ganoderma lucidum* en alimentos

1.5.1 Dosis estimada diaria de β-glucanos de *Ganoderma lucidum*

La tabla 2 resume la ingesta de β-glucanos, evaluada por la USDA, los valores fluctúan entre 338,7 y 678,4 mg/persona/día (7,3 y 16,4 mg/kg de peso corporal/ía), respectivamente, con un promedio de 150 mg de β-glucanos por porción en adultos; y, en niños mayores de 2 años 16,6 mg /kg de peso corporal/día vía oral.

Tabla 2. Ingesta de β -glucanos (mg/persona/día y mg/kg de peso corporal /día) basado en datos de USDA

Grupo de población	Grupo de edad (años)	% Usuarios	Actual # Usuarios	Todos los consumos de persona (mg)		Todos los consumos de usuarios (mg)	
				Media	Percentil 90 ^{ta}	Media	Percentil 90 ^{ta}
Infantes	0-2	71.6	2,526	224,1 ^c (17.8) ^d	521.6 (41.0)	287.3 (22.9)	568.4 (44.2)
Niños	3-11	98.4	6,205	389.8 (16.1)	712.6 (31.1)	397.7 (16.5)	713.9 (31.2)
Mujeres adolescentes	12-19	91.5	642	330.9 (6.1)	702.6 (14.3)	361.8 (6.7)	726.6 (14.5)
Hombres adolescentes	12-19	91.7	638	436.2 (72.)	930.3 (15.1)	476.4 7.8	972.9 (16.3)
Mujeres adultas	20 y más	85	3,887	238.7 (3.7)	526.9 (8.4)	278.2 (4.3)	551.9 (8.9)
Hombres adultos	20 y más	81,6	3,876	290.6 (2.6)	678.8 (8.6)	355.1 (4.4)	743.7 (9.5)
Total de la población	Todas las edades	86.4	17,812	292.7 (6.3)	644.7 (15.4)	338.7 (7.3)	678.4 (16.9)

La determinación de la seguridad de los β -glucanos del *G. lucidum* se basa en la totalidad de la evidencia disponible, incluyendo específicamente estudios de toxicidad animal, así como estudios en humanos e in vitro, que han corroborado su seguridad. [26]

1.5.2 Aplicaciones de los β -glucanos en productos lácteos

En la actualidad, la FDA aprueba el consumo de los β -glucanos, derivados del *G. lucidum* como ingrediente alimentario en una cantidad de 150 mg por porción en: productos de panadería, bebidas y bases de bebidas, cereales y productos de cereales, leche y productos lácteos, productos de proteínas vegetales, frutas y jugos de frutas, caramelos blandos y sopas [26].

El uso extendido de los β -glucanos en alimentos se ha dado en mayor parte de aquellos derivados de avena y/o cebada, dados sus comprobados efectos sobre la salud cardiovascular. Para obtener estos beneficios y que un alimento funcional pueda tener una declaración de salud relacionada con el estado cardiovascular, entes regulatorios como la FDA y el Ministerio de Salud y Protección Social en Colombia, exigen la adición de por lo menos 0.75 g de fibra soluble proveniente de avena o cebada por porción [30]. Tecnológicamente se puede dificultar el uso de los β -glucanos por sus efectos en las propiedades reológicas, ya que tienen gran capacidad de formar gel y aumentar la viscosidad en medios acuosos, lo cual podría ser un inconveniente sensorial dependiendo de la matriz alimentaria y la cantidad en que se incorporen [31].

No obstante, el desarrollo de β -glucanos mejorados, más puros y concentrados ha contribuido a contrarrestar los inconvenientes relacionados con las propiedades reológicas de los mismos. Sahan y colaboradores aplicaron este tipo de β -glucanos, derivados de la avena, en yogur y encontraron que concentraciones entre 0.25 y 0.50% no afectaron considerablemente la firmeza del gel, ni la capacidad de retención de agua, pero estas variables disminuyeron con el tiempo de almacenamiento. Por otra parte, en este mismo estudio, el panel de expertos mostró aceptación por los yogures con β -glucanos, aunque tuvo mayor preferencia por el yogur control [32]. En quesos también se usó este tipo de productos utilizándolos como sustituto de la grasa, y aquellos en los que se reemplazó de 50 a 70% (6.8% y 3.47% de grasa) menos de grasa que el queso control mostraron menor dureza, fracturabilidad, e índice de fluidez; aunque el queso con 3.47% de grasa fue más pastoso [33].

La adición de β -glucanos como fibra dietaria en sistemas coloidales como los lácteos ha mostrado afectar la estabilidad del producto, debido a que frecuentemente se ocasiona separación de las fases. La interacción entre las micelas de caseína y los polímeros de β -glucano fueron estudiados ampliamente, demostrando la presencia de sedimentación y formación de gel a la concentración requerida para declarar 2.5g de fibra por porción de 200mL, es decir de 12.5g/L de Glucagel (producto comercial derivado de cebada, cuyo mayor constituyente son β -glucanos) [34].

Así como con el uso de estos compuestos pueden darse modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de los lácteos, también podrían presentarse interacciones con los cultivos iniciadores y/o con los cultivos probióticos. Un estudio sugirió que los β -glucanos incorporados en un yogur tienen efectos protectores para los microorganismos probióticos *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium breve* al ser sometidos a estrés, almacenándolos a baja temperatura [35]. Otro sugirió que los cultivos iniciadores (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) despolimerizaron los β -glucanos de cebada cuando la lactosa llegó al límite durante la fermentación [36].

Martensson y cols. encontraron que en una bebida fermentada, después del proceso de fermentación, la alta concentración de β -glucanos se mantenía, lo cual sugeriría que dadas las características químicas de los mismos, estos podrían ser difíciles de digerir por diferentes microorganismos, lo que sería positivo para garantizar determinada cantidad de estos compuestos [37]. Sin embargo, este mismo autor encontró que al parecer el *B. bifidum* consume estos polisacáridos porque disminuyó el contenido de β -glucanos en el producto fermentado por esta cepa, mientras que otras cepas evaluadas (*L. reuteri* y *L. acidophilus*) permanecieron viables durante el período de refrigeración [38]. Dependiendo de si los microorganismos fermentadores consumen o no parte de este tipo de fibra, podrían darse cambios en la viscosidad y acidificación del producto final, y los resultados han sido variables de acuerdo al origen de los β -glucanos y a los microorganismos incluidos, algunas veces siendo consumida parte de la fibra soluble o la insoluble, y otras veces sin ningún consumo [39]. Acorde a estos estudios, los β -glucanos, podrían llegar a ser utilizados en determinada concentración sin afectar considerablemente las propiedades del yogur, y actuando además como prebióticos. Este último estudio reportó preferencia sensorial del yogur con β -glucanos frente a otros prebióticos como la inulina, lactulosa y maltodextrina [40].

Algunas fibras también pueden ser usadas en los lácteos como reemplazantes de la grasa. El reemplazo de la grasa láctea con una mezcla entre maltodextrina y β -glucanos en un yogurt demostró aceptación general, aunque durante el período de almacenamiento se observó disminución en la viscosidad [41]. Un yogurt al que se incorporaron β -glucanos de levadura fue afectado de manera significativa en sus propiedades sensoriales (consistencia, sabor) de acuerdo al contenido de los mismos. Soportando una adición de hasta 3% de β -glucanos para mantener la misma calidad sensorial y estructura frente al yogurt control [42].

Gran parte de la literatura ha reportado el uso de β -glucanos de avena y/o cebada en diferentes matrices de alimentos. Pero, al diferir de la estructura de los β -glucanos derivados de hongos como el *Ganoderma lucidum*, su forma de interactuar puede diferir, además de depender también del peso molecular de los mismos. La Figura 6 presenta las diferencias entre las estructuras de β -glucanos de diferentes fuentes [43]:

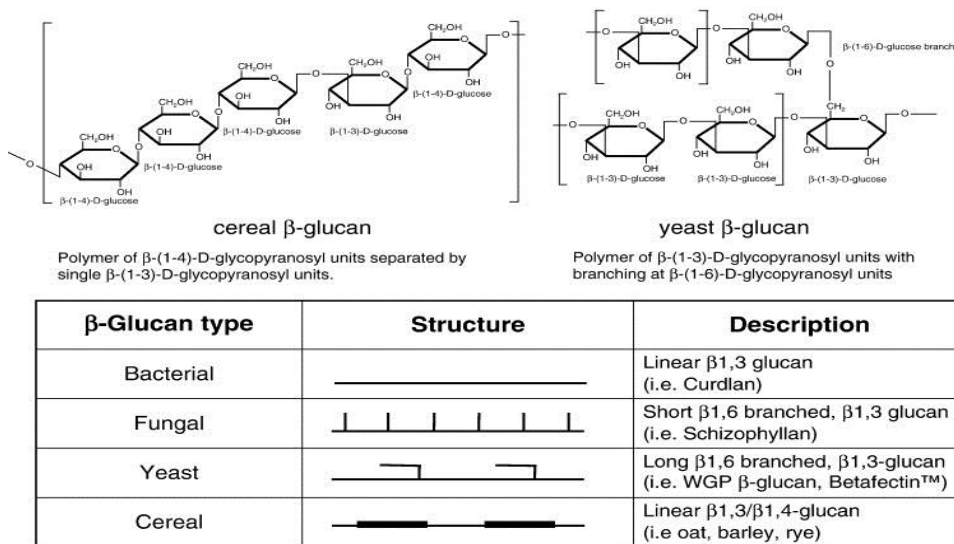


Figura 6. Estructuras de β -glucanos de diferentes fuentes. [43]

Hozová y cols. evaluaron la adición de hidrogeles de β -glucanos aislados de los hongos *Pleurotus ostreatus* (Pleuran) y *Lentinus edodes* (Lentinan) para incrementar la bioactividad de yogures. [44]. Al estudiar las propiedades microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales, no encontraron una influencia negativa sobre la matriz láctea, manteniendo así su calidad durante el período de almacenamiento. Cabe aclarar que, las concentraciones utilizadas fueron pequeñas, de 0.25 mL a 1 mL por botella de 150 mL (0.17-0.67%) [44].

Los efectos de estos compuestos sobre el yogur pueden variar considerablemente de acuerdo a la concentración en que se incluya, un estudio que evaluó varias concentraciones (0 - 0.5%) encontró que en una concentración hasta de 0.3% podría ser adicionada sin formar fases separadas, ya que a mayor concentración se observó retraso en el proceso de fermentación con cambios notables en las características del yogur [45]. En otro estudio se admitió la adición de 0.24% p/p mejorando la viabilidad del *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (Bb12) y la estabilidad frente a la inulina [46].

La forma de extracción de los polisacáridos de *Ganoderma lucidum* también puede incidir en las propiedades reológicas del alimento. Lai y Yang compararon los polisacáridos extraídos desde el cuerpo fructífero frente a los extraídos desde el micelio, siendo estos últimos los que demuestran mayor viscosidad, probablemente debido a su mayor peso molecular [47]. Así, podría pensarse que β -glucanos de menor peso molecular tendrían menor incidencia tecnológica sobre algunas propiedades fisicoquímicas de los alimentos, pero, contrariamente, sus efectos fisiológicos también cambiarían.

1.6 Conclusiones

Los β -glucanos de diferentes fuentes han demostrado efectos benéficos sobre el organismo humano, entre los que se destacan aquellos sobre la salud cardiovascular por parte de los derivados de avena o cebada y aquellos sobre el sistema inmunológico por parte de los provenientes de hongos o levaduras.

La variedad de métodos y fuentes para la obtención de β -glucanos permite que el resultado final sean metabolitos de diferente estructura química y peso molecular, con lo que su actividad biológica también puede variar considerablemente.

Los β -glucanos derivados de levaduras y hongos como el *Ganoderma lucidum*, suelen estar unidos por enlaces β -D glucosídicos, con un amplio rango de peso molecular sus efectos biológicos han sido mayormente demostrados sobre el sistema inmunológico. Dentro de los mecanismos de acción descritos para justificar el efecto de los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* está la unión a receptores específicos ubicados en células del sistema inmune.

En los últimos años fue aprobado el uso de β -glucanos de *Ganoderma lucidum* como ingrediente para alimentos, lo que abre una gran oportunidad para el desarrollo de alimentos funcionales enfocados a contribuir al fortalecimiento del sistema inmune.

El uso de los β -glucanos como ingrediente funcional conlleva múltiples retos científicos y tecnológicos que permitan obtener una matriz alimentaria final que sea saludable, con adecuadas características fisicoquímicas y sensoriales y con un beneficio comprobado sobre la salud humana.

En los productos lácteos se han venido desarrollando investigaciones que evalúen el uso de β -glucanos, en especial aquellos provenientes de avena y cebada que tienen enlaces β -1,3 y β -1,6. La investigación del uso de β -glucanos derivados del *Ganoderma lucidum* ha sido escasa.

Se requiere mayor investigación sobre la forma de inclusión y concentración de β -glucanos derivados del *Ganoderma lucidum* en diferentes matrices alimenticias, además de considerar y evaluar el efecto de β -glucanos de bajo peso molecular.

2. Capítulo 2. Inclusión de los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* en yogur

2.1 Resumen

El *Ganoderma lucidum*, hongo conocido como Reishi o Lingzhi, tiene múltiples compuestos bioactivos que pueden ejercer diferentes efectos fisiológicos, por lo que se ha estudiado para contrarrestar y/o prevenir enfermedades por medio de su uso directo o de alguno de sus componentes. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la inclusión de β -glucanos del *Ganoderma lucidum*, en yogur, para evaluar los cambios fisicoquímicos, microbiológicos, sensoriales y reológicos que pudieran ocasionar cuatro concentraciones adicionadas (0.17-1.25%) en dos momentos (previo a la pasteurización y después de la inoculación). Los β -glucanos en yogur mejoraron algunas propiedades fisicoquímicas tales como contenido total de sólidos, exopolisacáridos, y sinéresis comparados con el control. En cuanto a la aceptación por parte de los consumidores fue buena para las nueve muestras evaluadas, y específicamente para la muestra que fue evaluada por niños (0.17% Inicio) con un 80% de aceptación. Además, la adición de los β -glucanos no tuvo incidencia sobre la viabilidad de los microorganismos probióticos. Finalmente, se encontró que la adición de β -glucanos incide sobre las propiedades reológicas del yogur (G' , G'' y δ°) frente al control ($P < 0.01$), aumentando la viscosidad directamente proporcional a las concentraciones, y siendo más evidente en aquellas muestras en las que se adicionó al final de la fermentación.

2.2 Introducción

La elaboración de alimentos funcionales conlleva retos técnico-científicos entorno a la inclusión y compatibilidad de determinados compuestos bioactivos sobre las matrices alimentarias. Las matrices lácteas son productos muy atractivos para incluir ingredientes bioactivos, debido a su reputación como “alimentos saludables”. No obstante, la inclusión de estos compuestos en un sistema coloidal con presencia de múltiples sustancias como

el lácteo, puede generar cambios en las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales.

Los β -glucanos son polisacáridos derivados de hongos como el *Ganoderma lucidum* que tienen efectos benéficos sobre la salud, especialmente sobre el sistema inmune. [4]

Su estructura química está caracterizada por enlaces beta 1,3 y 1,6, con algunas ramificaciones, lo que implica que al ser adicionados en un producto alimenticio como el yogur puedan afectarlo en menor o mayor medida, pudiendo causar: sinéresis, mayor viscosidad, aumento o disminución de cultivos iniciadores o probióticos, y sensación en la boca más cremosa o espesa, entre otros.

Se han encontrado múltiples referencias de la evaluación de β -glucanos derivados de avena o cebada sobre matrices lácteas, pero, no se ha encontrado literatura que reporte la inclusión y evaluación de aquellos derivados de *Ganoderma lucidum* que difieren en su estructura molecular. [32-34] Por ello, el presente estudio pretende incorporar los β -glucanos de este hongo en yogur, para evaluar los efectos que podría tener sobre esta matriz.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Diseño experimental

La metodología experimental se desarrolló mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial que cuenta con dos factores: concentración de β -glucano y momento de adición, con cinco y dos niveles respectivamente, según se ilustra en la Tabla 3.

Tabla 3. Diseño experimental propuesto

		Concentración β -glucanos					Total
		0	0.17	0.37	0.75	1.25	
Momento de Adición	Final	0	3	3	3	3	12
	Inicio	0	3	3	3	3	12
	No Aplica	3	0	0	0	0	3
Total		3	6	6	6	6	27

Cada tratamiento fue realizado por triplicado y cada análisis de la variable respuesta se llevó a cabo igualmente por triplicado. Los ensayos se llevaron a cabo a partir de unidades experimentales conformadas por lotes de 1L de yogur.

2.3.2 Elaboración del yogur

Se elaboró un yogur batido mediante el empleo de leche en polvo, sacarosa, cultivos iniciadores: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y como probióticos: *Lactobacillus acidophilus* (LACID CSL Starter Cultures), *Bifidobacterium infantis* B1, *Bifidobacterium breve* Bbr8 y *Bifidobacterium longum* B1 10 (BIFI CSL Starter Cultures); adicionados de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo A). Los yogures se formularon para obtener un producto con 3% de grasa, 8% de sólidos lácteos no grasos, y 10% de azúcar. Se prepararon las diferentes formulaciones teniendo en cuenta los factores y niveles (Tabla 3).

Para la preparación del yogur con los β -glucanos incorporados se siguió el procedimiento esquematizado en la Figura 7.

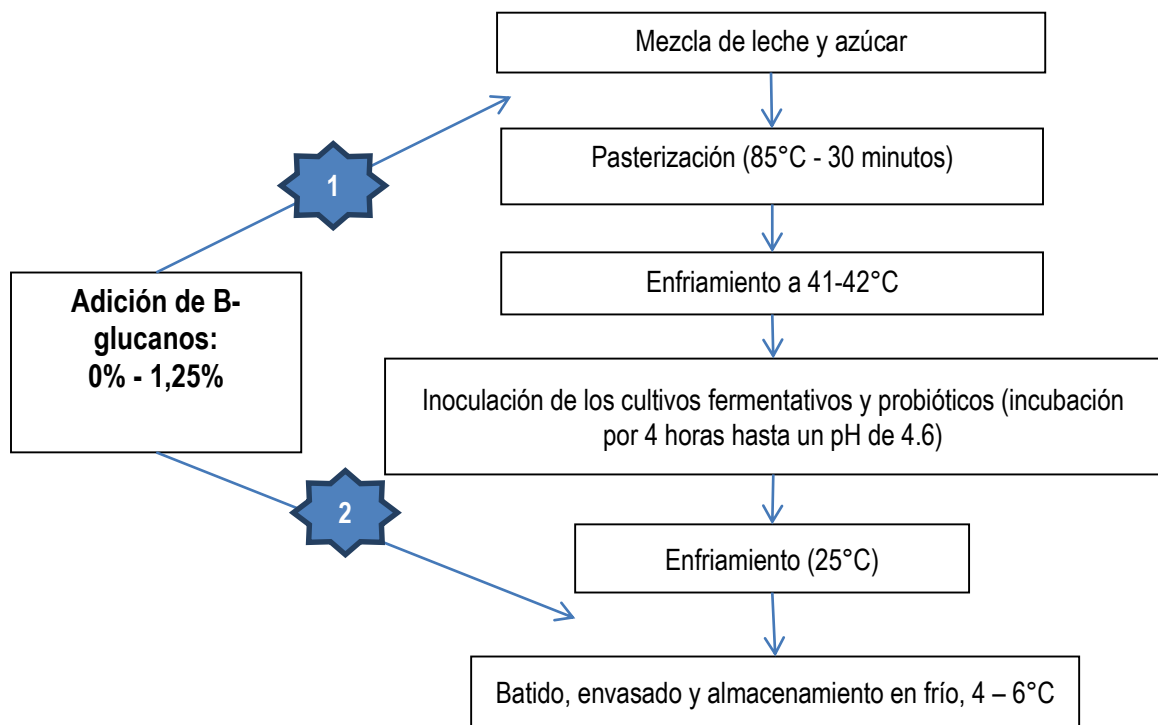


Figura 7. Flujo de proceso para la preparación del yogurt

2.3.3 Análisis Proximal

- Análisis de proteína: El contenido total de proteína total fue establecido por el método Kjeldahl según método AOAC 991.20, 991.23 y 920.105. Para esto se llevó a cabo la digestión de 5g de yogur con ácido sulfúrico, seguido de una destilación con NaOH en ácido bórico al 4% y la titulación del destilado obtenido con ácido clorhídrico 0.1N, determinando el contenido de nitrógeno. Para convertir los valores obtenidos a proteína, se empleó el factor 6.38 como factor multiplicación.
- Determinación de grasa: Por el método de Gerber según AOAC 15.030 y 2000.18. 10 mL de ácido sulfúrico fueron adicionados al butirómetro, seguidos de 1 ml de agua destilada a 60°C. La muestra de yogur (11 mL) fue colocada en el butirómetro, seguido de 5 mL de agua destilada a 60° y 1mL de alcohol isoamílico. Finalmente la muestra fue centrifugada a 1300rpm y 65° durante 5 minutos. El porcentaje de grasa se registró de acuerdo con la medida observada en la columna.
- Determinación de Carbohidratos: Por cálculo de diferencia así:
Carbohidratos totales = 100 – proteína – grasa – cenizas – humedad
- Determinación de cenizas: Por método con mufla según método AOAC 945.46. Para esto 40g de yogur fueron colocados a 550°C hasta la obtención de cenizas.
- Determinación de sólidos totales, por el método AOAC 925.23 y 930.15. Para esto, se determinó la pérdida de peso por evaporación de agua, colocando 40-50g de yogur en una estufa al vacío a 70° hasta obtener peso constante.

2.3.4 Determinación de β -glucanos de *Ganoderma lucidum*

Se midió la concentración de β -glucanos derivados del *G. lucidum* incorporados en el yogur a lo largo de la vida útil. Estos se evaluaron en tres tiempos: tiempo 1 (inicio), tiempo 2 (10 días) y tiempo 3 (20 días).

El contenido total de β -glucanos derivados del *G. lucidum* se analizó utilizando un procedimiento con kit enzimático (Megazyme Int.) que contiene exo-1,3-b-glucanasa, b-

glucosidasa, amiloglucosidasa, invertasa, reagente GOPOD como buffer y enzimas (GOPOD-glucosa oxidasa, peroxidasa, 4-aminoantipirina), solución estándar de glucosa y control de β -glucano.

Acorde a las indicaciones del fabricante del kit, y partiendo de una muestra liofilizada, el procedimiento aplicado fue el siguiente:

Se somete a molienda la muestra hasta 0.5 mm aproximadamente, se añade la muestra molida (100 mg aproximadamente) a un tubo Falcon asegurándose de que la totalidad de la muestra queda en el fondo del tubo. Se añade 1.5 mL del HCl concentrado al tubo, se tapa y agita en vórtex. Se coloca el tubo en un baño de agua a 30°C durante 45 minutos y se agitan en vórtex cada 15 minutos (para asegurar una completa disolución de los β glucanos). Se añade 10 mL de agua a cada tubo y se mezcla mediante vórtex. Se colocan en un baño de agua a punto de ebullición (100°C), y se continúa la incubación por 2 horas más. Se enfrían los tubos a temperatura ambiente, se añaden 10 mL de KOH 2 N. Se transfiere el contenido de cada tubo a un matraz aforado de 100 ml. Se lava el tubo con Buffer Acetato 200mM, pH 5, y se lleva a volumen. Se mezcla mediante inmersión. Se filtra una alícuota de cada suspensión a través de un papel de filtro de fibra de vidrio Whatman GF/A (centrifugar a 1500g durante 10 minutos).

Se transfiere 0.1 ml (100 μ L) de alícuotas (por triplicado) del filtrado o centrifugado y pasarlo a tubos de vidrio. Se añade 0.1 ml (100 μ L) de la botella 1 (Ependorff con exo 1,3 β glucanasa y β gluco oxidasa + 200 mM de buffer acetato de sodio pH 5.0) a cada tubo mezclar en vortex e incubar a 40° C durante 60 minutos.

Se preparan: el blanco: 0.2 ml (200 μ L) de buffer acetato de sodio (200Mm, pH5.0) + 3.0 ml glucosa oxidasa peroxidasa (GOPOD). El D-glucosa estándar: 0.1 ml (100 μ L) de D Glucosa estándar más 0,1 ml (100 μ L) de buffer acetato de sodio (200 mM pH 5.0) + 3.0 ml de GOPOD.

Se añade 3ml de GOPOD a cada tubo y se incuba a 40 ° C por 20 minutos. En el espectrofotómetro se mide la absorbancia de las soluciones a 510 nm frente al blanco del reactivo.

Tras estas pruebas se aplican las siguientes ecuaciones para el cálculo de glucanos totales, alfa glucanos y β -glucanos.

$$\begin{aligned}\text{Glucanos totales } \left(\% \frac{W}{W}\right) &= \Delta E * F * \frac{100}{0,1} * \frac{1}{1000} * \frac{100}{W} * \frac{162}{180} \\ &= \Delta E * \frac{F}{W} * 90\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\alpha \text{ Glucanos } \left(\% \frac{W}{W}\right) &= \Delta E * F * 1000 \text{ (ó } 103) * \frac{1}{1000} * \frac{100}{W} * \frac{162}{180} \\ &= \Delta E * \frac{F}{W} * 90 \text{ (volumen final de } 100 \text{ ml)} \\ &= \Delta E * \frac{F}{W} * 9,27 \text{ (volumen final de } 10,3 \text{ ml)}\end{aligned}$$

β Glucanos = Glucanos totales (+ oligómeros, etc.) – α Glucanos (+ oligómeros, etc.)

En donde:

- ΔE = Absorbancia de **MUESTRA** – Absorbancia del **BLANCO**
- $F = \frac{\text{Factor para convertir absorbancia a } \mu\text{g de D-Glucosa}}{\text{Absorbancia de GOPOD para } 100 \mu\text{g de Estándar D}}$
- **100/0,1** = Factor de corrección para el volumen para el contenido total de glucanos (Levadura), (0,1 mL de 100 mL fue analizado)
- **103** = Factor de corrección de volumen para el α .Glucano (0.1 mL de 10.3 ml fueron analizados)
- **ó**
- **1000** = Factor de corrección de volumen para el α .Glucano (0.1 mL de 100 ml fueron analizados)
- **1/1000** = Conversión de μg a miligramos
- **1000/W** = Conversión de 100mg de muestra (por ejemplo como %w/w)
- **W** = peso de las muestras analizadas

- **162/180** = Factor para convertir de D- Glucosa, como se determinó libre a anhidroglucosa, como ocurre en β glucano

2.3.5 Evaluación de las características fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas se evaluaron durante el tiempo de vida útil, en el tiempo tiempo 1 (inicio), tiempo 2 (10 días) y tiempo 3 (21 días). Se evaluó:

- a) pH: Se estableció por inmersión directa del electrodo, utilizando el potenciómetro previamente calibrado con buffers de pH 4 y 7, mediante el método AOAC 973.41.
- b) Acidez: Por medio de titulación con NaOH 0.1N, según la AOAC 947.05.
- c) Sinéresis: Por método de centrifugación. Se pesó la muestra previamente (30g) y se colocó en los tubos para centrífuga, dejándose centrifugar por 15 minutos a 7000 rpm a una temperatura de 4°C. Después de la centrifugación se obtuvo el peso del sobrenadante y se calculó el porcentaje de sinéresis (p/p) mediante la relación entre el peso del sobrenadante y el peso de la muestra.

2.3.6 Evaluación sensorial

Se aplicó un análisis sensorial a panelistas reclutados en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, con una muestra de 20 personas (una proporción aproximada de 50/50 para hombres y mujeres). Las muestras de los diferentes experimentos fueron codificadas con números al azar de 3 dígitos y presentadas aleatoriamente a los panelistas. Se evaluaron los atributos de sabor, aroma, textura y aceptación general mediante una escala hedónica de 5 puntos, en la que 1 significa me disgusta mucho y 5 me gusta mucho.

El producto final, al ser un yogur cuyo valor agregado estaría enfocado a contribuir a fortalecer el sistema inmunológico, tiene como principal público objetivo la población de primera infancia, que es una de las poblaciones más vulnerables frente a enfermedades infecciosas respiratorias y gastrointestinales. Además, la valoración de la aceptación

sensorial se enfocó en población infantil debido a que este alimento funcional sería la matriz a evaluar durante un estudio de intervención en niños menores de 5 años para comprobar su efecto sobre el sistema de defensas. Para ello, se seleccionaron las muestras con 0.17% de β -glucanos, adicionados previo a la pasterización para que fuesen evaluadas por el público objetivo. Se presentaron las muestras a setenta niños de 3 a 5 años por medio de evaluación guiada por adulto mediante una escala hedónica facial de 5 puntos con preferencia en grados ascendentes, en el cual 1 es me disgusta mucho y 5 me gusta mucho.

2.3.7 Evaluación reológica

Por medio del reómetro Kinexus Pro con una geometría de plato cono 4°/40 mm se tomó una muestra de 17 ml para la caracterización del módulo de almacenamiento o elástico (G') y de pérdida o viscoso (G''), el ángulo de desfase ($\tan \delta = G''/ G'$), mediante un barrido de amplitud y frecuencia a una temperatura de 4°C.

Se realizó un barrido de deformación entre 0,1-1% a una frecuencia de 1Hz, para establecer la región viscoelástica lineal. Adicionalmente, se llevó a cabo un barrido de frecuencia entre 0,1 y 10Hz, con el fin de observar el comportamiento reológico de las muestras evaluadas.

Para el barrido de amplitud se aplicaron las siguientes condiciones:

- Tiempo de ensayo: 5 minutos
- Rango de trabajo: Inicio 0.1%-1%
- Frecuencia: 1 Hz
- Progresión: Logarítmica

Para el barrido de frecuencia se aplicaron las siguientes condiciones:

- Tiempo de ensayo: 11 minutos
- Rango de trabajo: Inicio 0.1 Hz – 10 Hz
- Deformación: 0.5%
- Progresión: Logarítmica

2.3.8 Evaluación microbiológica

La evaluación microbiológica del producto se enfocó en evaluar la concentración de las cepas probióticas. Estas se evaluaron en tres tiempos: tiempo 1 (inicio), tiempo 2 (10 días) y tiempo 3 (21 días). Se empleó la técnica de recuento de bacterias ácido lácticas homofermentadoras y heterofermentadoras diseñada por McDonald et al. (1987). [48]

El medio de cultivo utilizado para la siembra fue HHD agar, preparado de acuerdo a McDonald et al. (1987). [48]

Para la siembra de la muestra se pesaron 10 g de muestra, y se procedió a hidratarla con 90 mL de agua Tryptona sal. Se realizaron diluciones decimales seriadas (-5, -6) partiendo de una concentración inicial del cultivo de 9×10^{12} , para luego tomar de cada dilución 0,1 uL de esta y se inoculó en el medio de cultivo HHD agar temperado anteriormente, con un asa de Drigalski se esparció el inoculó en todo el medio hasta que la superficie quede totalmente seca, se incubaron las placas boca abajo, a 37 ± 1 °C por 72 horas en campana de anaerobiosis junto con un indicador (MiKrobiologieAnaerotest marca MERK) y un anaerogen (AtmosphereGenerationSystem marca OXOID).

La cuenta de las colonias se realizó distinguiendo las distintas especies según la morfología y color de las colonias observadas a ojo desnudo y con microscopio estereoscópico.

2.3.9 Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se empleó un análisis de varianza (ANOVA), empleando el paquete estadístico SAS 9.2. Se consideró el efecto principal de los factores en cada una de las variables por separado, en caso de encontrar un nivel de significancia estadística inferior o igual a 0.05 ($P < 0.05$) entre los diferentes niveles de los factores se realizaron comparaciones mediante la prueba de Tukey con el fin de determinar a cual o cuales tratamientos se les atribuye la diferencia.

2.4 Resultados y Discusión

2.4.1 Análisis Proximal

2.4.1.1 Carbohidratos

La Figura 8 evidencia que el contenido de carbohidratos en las diferentes muestras demostró variación dependiente de la concentración adicionada de los β -glucanos y del momento en el que se adicionó durante el proceso, siendo el inicio previo a la pasteurización y el final tras la fermentación.

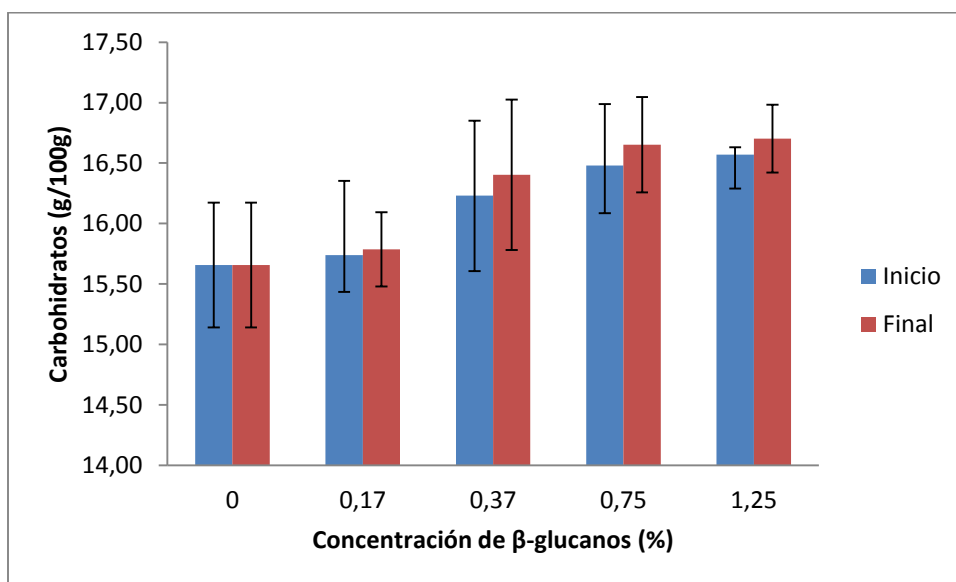


Figura 8. Contenido de carbohidratos en las muestras

Entre las concentraciones y momentos de adición de los β -glucanos se evidenciaron diferencias en el contenido de carbohidratos, no obstante, sólo se dan diferencias estadísticamente significativas al comparar las concentraciones de 0% con 1.25% (p 0.046), lo que quiere decir que en la concentración más alta de β -glucanos se presentaría mayor aporte de carbohidratos. Pero, para el resto de concentraciones empleadas, en comparación con el control, no hay una diferencia significativa.

En general, para todas las muestras el adicionar el β -glucano al final de la fermentación mostraron un mayor aporte de carbohidratos frente al inicio, pero la diferencia no fue significativa. (p 0.473)

Un yogur presenta cerca de 13.5% de carbohidratos (tabla composición de alimentos colombianos)[49], el análisis de diferentes yogures comerciales saborizados y/o con pulpas de fruta reportó entre 13.6-14.6% de carbohidratos totales [50], y en el presente estudio el promedio en el yogur control fue 15%, y en las muestras experimentales fue 16%. Como se observa en la Figura 8, la cantidad de carbohidratos fue aumentando proporcionalmente a la concentración de β -glucanos adicionados. Lo anterior se podría justificar en la composición del ingrediente, dado que datos bromatológicos demuestran una composición de más del 70% de carbohidratos, compuesto por β -glucanos de *Ganoderma lucidum*, y adicionalmente, durante el proceso de secado se usan como vehículos la maltodextrina y polidextrosa.

Por otra parte, el análisis detallado de los carbohidratos en el ingrediente ha evidenciado a la glucosa como el monosacárido presente más abundante (> 90%), además de detectar manosa, ramnosa, fucosa, xilosa y galactosa. De esta forma, los carbohidratos provenientes del ingrediente más los que tiene el yogur (galactosa, glucosa y lactosa), que están presentes cerca de un 8.58%, [51] podrían explicar el aumento de los mismos proporcional a la concentración de β -glucanos adicionados.

En la formulación empleada para esta investigación se usó 10% de azúcar adicionada, esta diferencia de 6% porcentuales frente al análisis de carbohidratos totales, estaría justificada por la presencia de otros como la galactosa y los β -glucanos. Y, también debe considerarse que el uso de leche en polvo para la elaboración del yogurt podría incidir directamente en el aporte de carbohidratos, debido principalmente a su alto contenido de lactosa. Sin embargo, un 16% de carbohidratos totales es inferior si se compara con la cantidad presente en yogures sin grasa endulzados con miel (17.9%) o sabor fresa (23.3%) [52], en los que muy posiblemente se usa algún tipo de carbohidrato complejo como reemplazante de la grasa.

2.4.1.2 Grasa

En la Figura 9 se observan valores similares en el contenido de grasa de las diferentes muestras, y, al realizar el análisis estadístico no hubo diferencias estadísticas entre las mismas. De esta forma se tiene que la concentración de β -glucanos y el momento de adición no alteren esta variable del yogur.

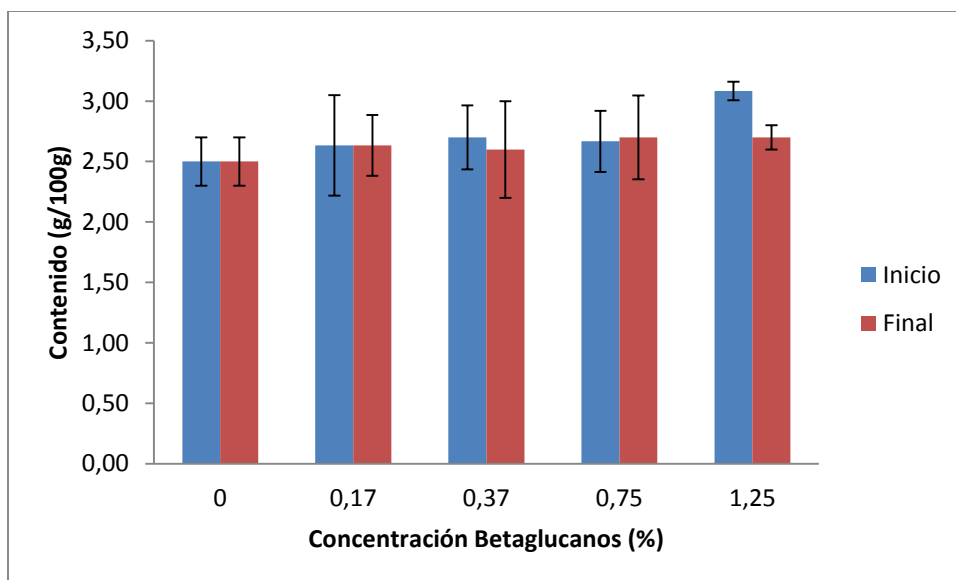


Figura 9. Contenido de grasa en las muestras

El contenido de grasa en las muestras varió entre 2.5 y 3.0%, valor que es de esperarse para un yogur entero [49], y similar a lo encontrado en yogures control de estudios con reemplazantes de grasa (2.6-2.6%) [53, 54]. En el desarrollo reciente de alimentos funcionales se ha buscado el reemplazo de la grasa láctea con compuestos como fibras u otros tipos de carbohidratos que permitan mantener la consistencia y sabor del yogur pero con menor aporte de grasa. Algunos estudios han evaluado el efecto de almidones modificados, inulina y fructanos en yogures reducidos en grasa (1.2-1.3%). [53, 54] En el presente estudio no se evaluó el reemplazo de grasa láctea con los β -glucanos del *Ganoderma lucidum*, pero, podría ser objeto de estudio en un futuro; ya que al no impactar el aporte de grasas y contribuir a mantener una adecuada consistencia podría ser una buena alternativa.

2.4.1.3 Proteína

En la Figura 10 se observan variaciones en el contenido de proteína, en especial, diferencias por el momento de adición para las concentraciones 0.37%, 0.75% y 1.25%. Pero, al realizar el análisis estadístico no hubo diferencia significativa, por lo cual se infiere que la concentración de β -glucanos y el momento de adición no afectan el contenido de proteína del yogur.

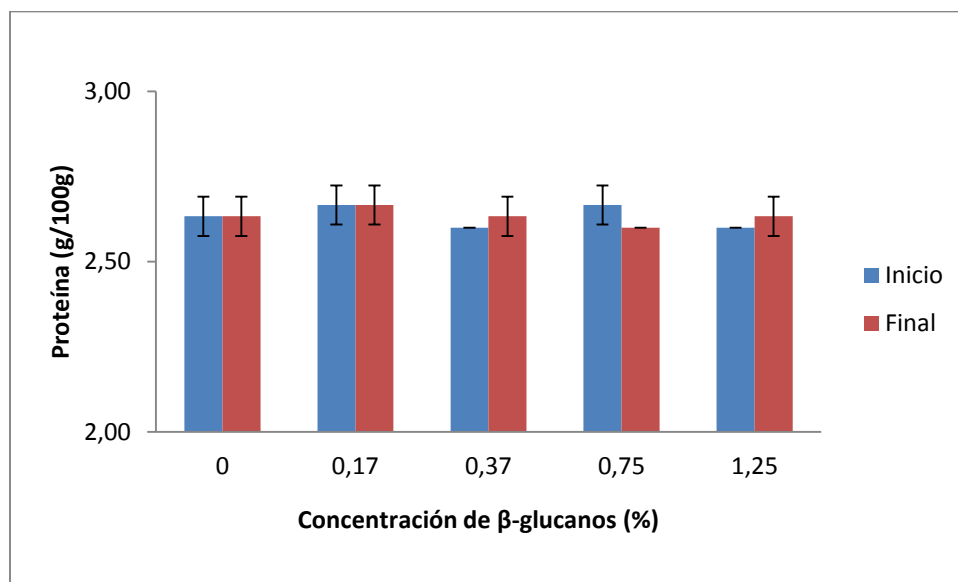


Figura 10. Contenido de proteína en las muestras

El aporte de proteína estuvo cercano al 2.6% para todas las muestras, valor inferior al yogur que comúnmente presenta valores cerca al 2.9%. [49] El análisis de proteína en el ingrediente fue menor al 2%, con lo que con las cantidades adicionadas no se esperaba que los β -glucanos no afectaran significativamente el contenido de proteína del yogur, no obstante, como este tipo de compuestos frecuentemente están ligados a proteoglicanos existía la posibilidad de alguna diferencia. Estudios en los que se ha realizado reemplazo de grasa en yogures han presentado 3.2 – 3.6% de proteína, estos son productos en los que generalmente el aporte proteico es mayor frente a un yogur estándar con un 2.7%, valor similar al obtenido en esta investigación. [53, 54]

2.4.1.4 Sólidos totales

En la figura 11 se denotan diferencias del contenido de sólidos totales dadas por la concentración de β -glucanos y por el momento de adición. No obstante, solo se dan diferencias significativas dadas por la concentración adicionada ($p < 0,00$).

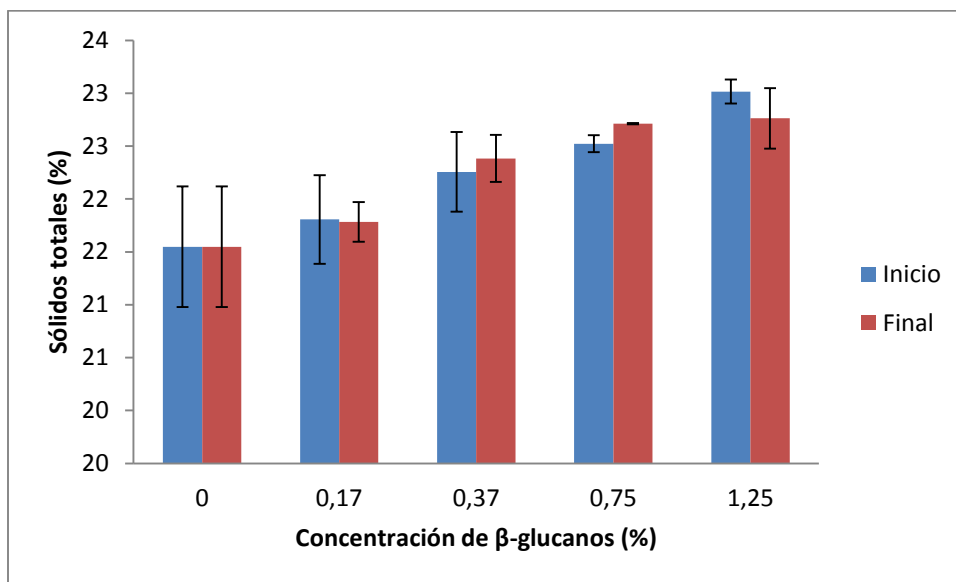


Figura 11. Contenido de sólidos totales en las muestras

Lo anterior quiere decir que la concentración de β -glucanos afectó los sólidos totales, y consecuentemente la humedad total del producto, ya que se encontró que para todas las concentraciones se afecta el porcentaje de sólidos totales, siendo superiores frente al control. Esta diferencia es más significativa al aumentar la concentración, entonces, sería consistente inferir que en las muestras a mayor adición de β -glucanos más sólidos totales y menor humedad.

Estos resultados son comparables con ensayos que incluyeron diferentes tipos de carbohidratos complejos en yogures, en los cuales se encontraba que con la adición de carbohidratos como inulina o fructanos había mayor contenido de sólidos totales (18.3-22.6%) que el control con 17.4% [53], para el presente estudio se encontraron valores entre 21.8% al 23% en sólidos totales, siendo

mayores para las concentraciones más altas de β -glucanos, independientemente del momento de adición. Por otra parte, los valores encontrados son mayores a los sólidos totales encontrados en yogures con leche de soya que adicionaron inulina (12.5-16.5%) [55] y, a los observados en yogures comunes sin modificación o adición en sus ingredientes tienen sólidos entre el 13-14% [56, 57].

2.4.1.5 Cenizas

La figura 12 evidencia que los factores de concentración de β -glucanos y momento de adición no influyeron de manera significativa en la variable cenizas con un nivel de significancia de 0,05.

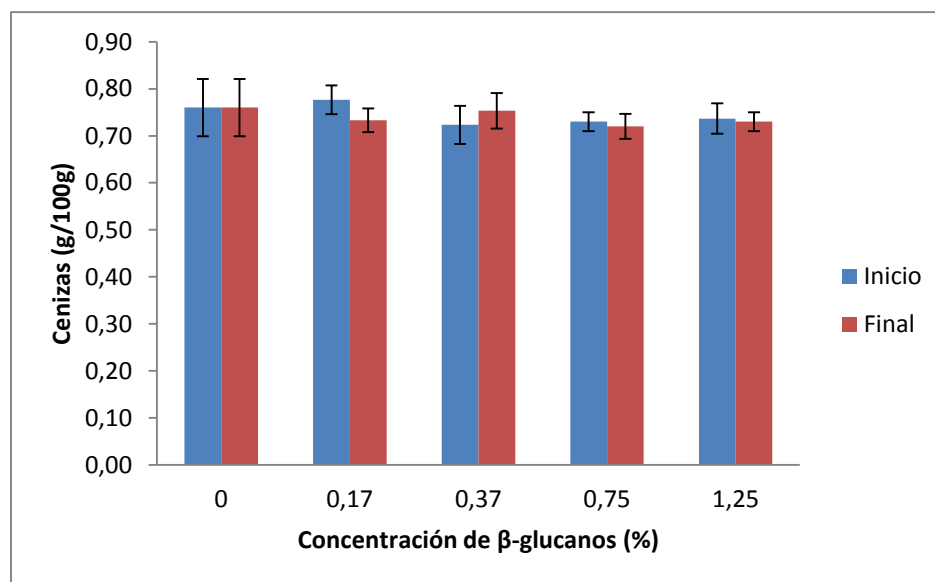


Figura 12. Contenido de cenizas en las muestras

El contenido de cenizas en los alimentos están representados por el contenido de minerales, para las muestras analizadas estuvo entre el 0.70-0.80%, valor inferior a lo obtenido en otros estudios de yogur que presentaron $\geq 0.9\%$ de cenizas [55, 58, 59]

El análisis bromatológico del ingrediente demostró un aporte de 0.35% de cenizas, 0.65 mg/100 g de hierro, 85.89 mg/100 g de sodio, y, esto junto con el calcio, fósforo, zinc,

magnesio y otros minerales presentes en el yogur, constituyen la sumatoria total de las cenizas. El bajo aporte de minerales del ingrediente adicionado contribuyó a que esta variable no se afectara en ninguno de los experimentos frente al control.

2.4.2 Determinación de β -glucanos de *Ganoderma lucidum*

A continuación se pueden observar los cambios en la concentración de β -glucanos a lo largo del tiempo de vida útil del yogur, tanto de los que se adicionaron al inicio como al final del proceso. Asimismo, se percibe el descenso de la concentración con el paso del tiempo de vida útil, siendo mayor a los 20 días de producción del yogur.

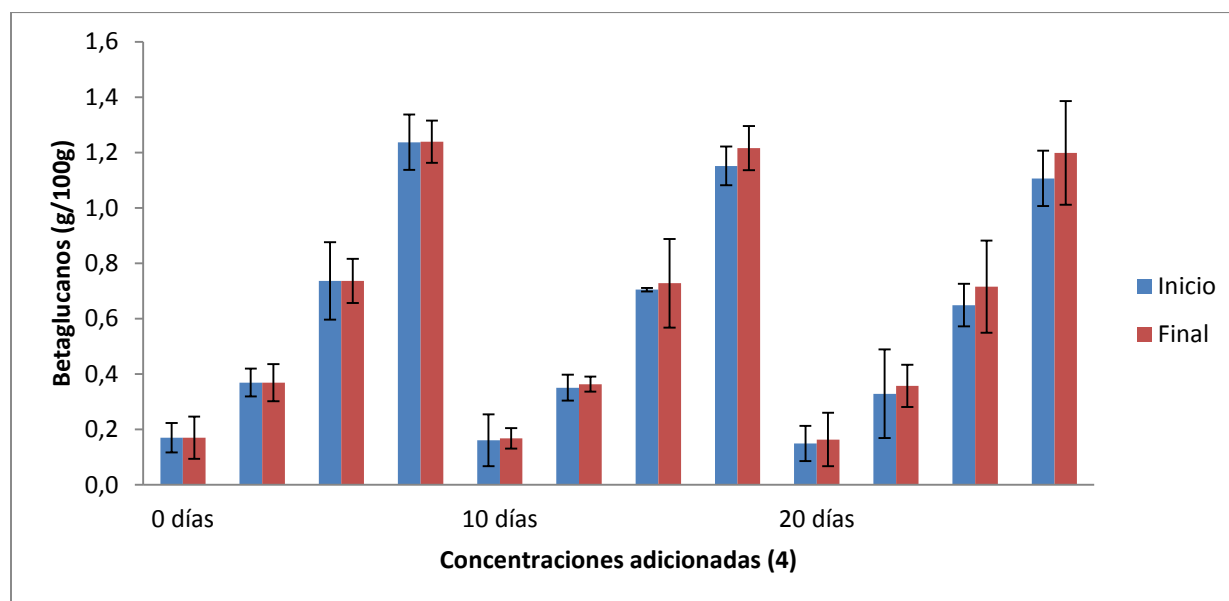


Figura 13. Variación de los β -glucanos en el tiempo

Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras adicionadas al inicio o al final, para los análisis a los 10 y 20 días, manteniéndose en mayor cantidad en las muestras a las que se adicionó al final. Esto demuestra una posible afectación de los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* por la pasteurización.

Pese a que los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* son un ingrediente muy estable, durante la vida útil podría darse una biotransformación por parte de determinados microorganismos contenidos en el yogur. Si bien varias cepas de microorganismos no tendrían las enzimas para digerir este tipo de compuestos. En el presente estudio se usó el cultivo YF L-811 YoFlex® de Chr Hansen, el cual contiene *Streptococcus thermophilus*

y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que como microorganismos iniciadores podrían llegar a usar los β -glucanos con el paso del tiempo a la vez que la lactosa llegue al límite durante la fermentación. [36]

Adicionalmente, como cultivos probióticos se usaron cepas de *Lactobacillus acidophilus* junto con diferentes especies de Bifidobacterias, microorganismos que a su vez podrían hacer uso de este tipo de carbohidratos, ya que en la literatura se ha reportado que el *Bifidobacterium bifidum* podría consumir este tipo de β -glucanos [38]

La pureza del ingrediente es del 70%, siendo similar a los β -glucanos de avena usados en yogur, en el que adicionaron 2% siendo la concentración de 1.4% en el producto final.[60] Los resultados aquí se presentan en contenido neto final de β -glucanos. A los 20 días se encontraron concentraciones entre el 0.15-1.20% de los 0.17-1.25% que se habían adicionado inicialmente, siendo mayor la disminución en los adicionados al inicio frente a los del final del proceso del yogur.

Pese a que estos β -glucanos se mantengan en el tiempo de vida útil del yogur, se deben evaluar en detalle sus interacciones con las propiedades fisicoquímicas, ya que en un estudio se observó la separación de las micelas de caseína al adicionarlos debido a su floculación por la no adsorción de los β -glucanos de avena. También se recomienda el uso de β -glucanos de bajo peso molecular para evitar este fenómeno, pero, debe tenerse en consideración la variabilidad que también podría darse en el efecto fisiológico.[34]

Un estudio evaluó los β -glucanos en bebidas fermentadas con hojuelas de avena, encontrando que al usar 25% p/p de hojuelas obtenían 4 - 4.3% de β -glucanos fermentándolas 8 o 12 horas a 30°C respectivamente, frente al control con 2.81% que fue una bebida sin fermentar. Estos valores finales de β -glucanos son superiores a los encontrados, lo que se esperaría por el alto porcentaje de avena utilizado en el proceso. Sin embargo, esto confirma la interacción microbiológica que podría darse con determinados microorganismos que promuevan o disminuyan la concentración de β -glucanos en un producto fermentado. [38]

2.4.3 Evaluación de las características fisicoquímicas

2.4.3.1 pH

En la tabla 4 se aprecia la variación del pH para los yogures con β -glucanos durante el período de vida útil. Es de esperarse que en estos productos se den descensos del pH por los procesos fermentativos que llevan a cabo los microorganismos sobre los azúcares presentes (lactosa).

Tabla 4. Valores de pH y acidez durante la vida útil

Momento de Adición	Concentración β -glucanos	0 días		10 días		20 días	
		pH	Acidez	pH	Acidez	pH	Acidez
NA	0	4.62 \pm 0.06 a	0.71 \pm 0.01	4.51 \pm 0.02 a	0.72 \pm 0.05	4.49 \pm 0.06 a	0.76 \pm 0.06
Inicio	0.17	4.56 \pm 0.02 ab	0.73 \pm 0.03	4.47 \pm 0.09 ab	0.76 \pm 0.03	4.44 \pm 0.05 ab	0.81 \pm 0.03
	0.37	4.64 \pm 0.04 a	0.72 \pm 0.04	4.51 \pm 0.05 a	0.75 \pm 0.01	4.49 \pm 0.03 a	0.76 \pm 0.02
	0.75	4.57 \pm 0.05 a	0.71 \pm 0.04	4.56 \pm 0.12 a	0.75 \pm 0.02	4.52 \pm 0.06 a	0.76 \pm 0.05
	1.25	4.75 \pm 0.12 ac	0.69 \pm 0.05	4.58 \pm 0.02 ac	0.72 \pm 0.01	4.60 \pm 0.06 acd	0.74 \pm 0.03
Final	0.17	4.60 \pm 0.12 de	0.75 \pm 0.03	4.48 \pm 0.04 de	0.76 \pm 0.06	4.46 \pm 0.06 a	0.78 \pm 0.02
	0.37	4.59 \pm 0.10 d	0.72 \pm 0.04	4.51 \pm 0.10 d	0.75 \pm 0.02	4.46 \pm 0.08 a	0.78 \pm 0.07
	0.75	4.57 \pm 0.04 d	0.68 \pm 0.08	4.48 \pm 0.02 d	0.79 \pm 0.06	4.44 \pm 0.04 ae	0.79 \pm 0.02
	1.25	4.56 \pm 0.03 df	0.73 \pm 0.06	4.48 \pm 0.01 df	0.75 \pm 0.03	4.45 \pm 0.02 af	0.77 \pm 0.01

abcdef Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencia significativa de acuerdo al Test de Tukey ($p < 0,05$)

Para esta importante variable se encontraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la concentración ($p < 0,01$). Al comparar las diferentes concentraciones entre ellas se encuentra mayor diferencia a la mayor concentración (1.25%).

Asimismo, se presentó afectación significativa del pH en ambos momentos de adición frente al control ($p < 0,01$). Al comparar los dos momentos de adición no se encuentra diferencia entre ellos, pero sí de todas las muestras frente al control sin β -glucanos.

2.4.3.2 Acidez

La tabla 4 presenta la variación del porcentaje de acidez para las muestras de yogures. Este cambio durante el tiempo es coherente con el pH, y durante el proceso de

fermentación. Pero, para este parámetro, en relación con la concentración y momento de adición de los β -glucanos no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,1$).

Los cambios en la acidez, como es de esperarse, fueron significativos en cada tiempo de medición, siendo progresivo a los 10 y 20 días. El aumento entre el tiempo 2 y 3 no fue significativo, el mayor incremento del porcentaje de acidez se dio desde el inicio a los 10 días.

Los valores de acidez estuvieron entre 0.71 y 0.81, con lo que los valores reportados en el tiempo 2 y 3 son inferiores a lo reportado por estudios similares que alcanzaron valores mayores a 1% de ácido láctico [54, 61].

En la siguiente figura se muestran resultados fundamentales para tener en cuenta en el procesamiento a mayor escala ya que se evidencia la cinética de fermentación con o sin betaglucanos.

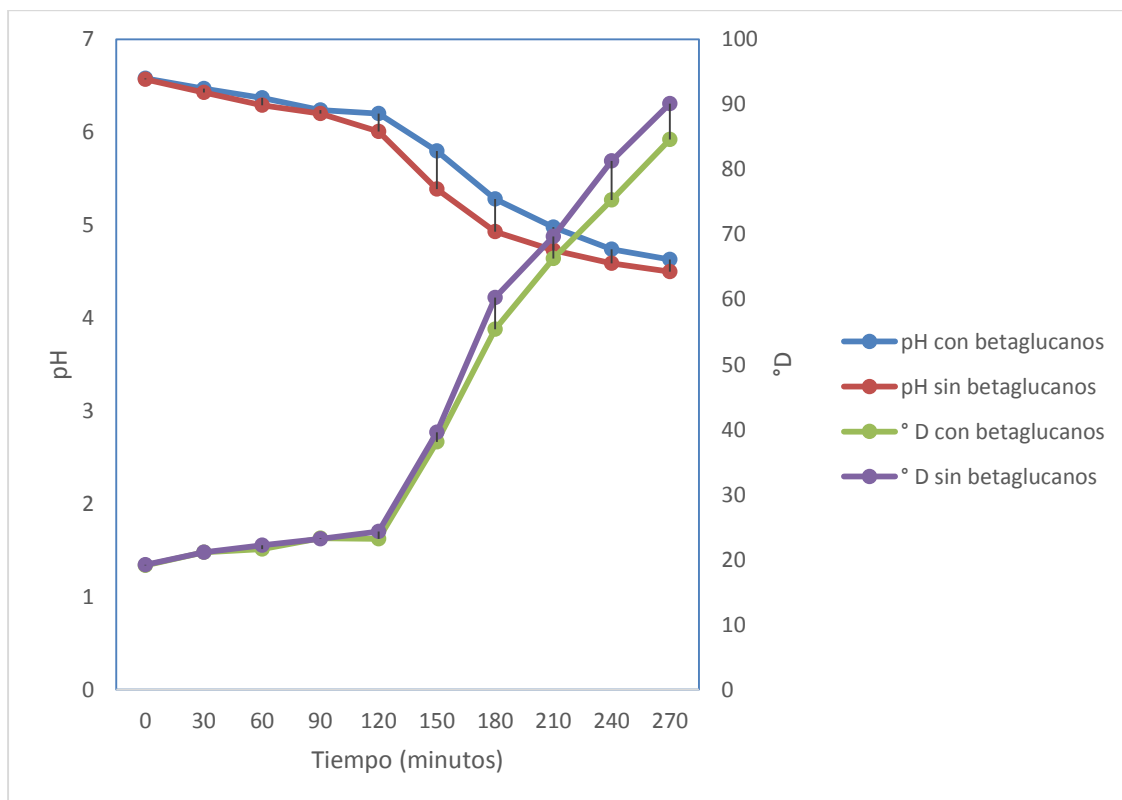


Figura 14. Cinética de fermentación con o sin el ingrediente

El pH y la acidez fueron menores durante la vida útil en las muestras con betaglucanos, pero, el proceso de fermentación para alcanzar un pH de 4.6 y la acidez deseada ($^{\circ}$ D) fue un poco más largo para las muestras con betaglucanos. Podría pensarse que la presencia de otros carbohidratos complejos como los β -glucanos, actúe como limitante inicial para el metabolismo de la lactosa por parte de los microorganismos iniciadores y por ende la acidificación de la leche. Esto sería justificado en que este tipo de carbohidratos también suelen actuar como protectores de los microorganismos en yogur que son sometidos a condiciones extremas.[35] Entonces, la adición de β -glucanos podría conllevar a una cinética de fermentación de mayor duración frente a un yogur sin los mismos.

2.4.3.3 Sinéresis

En la siguiente figura anterior se representa el porcentaje de sinéresis para todas las muestras. Los valores del grado de sinéresis obtenidos en este estudio oscilan entre 29 y 33%.

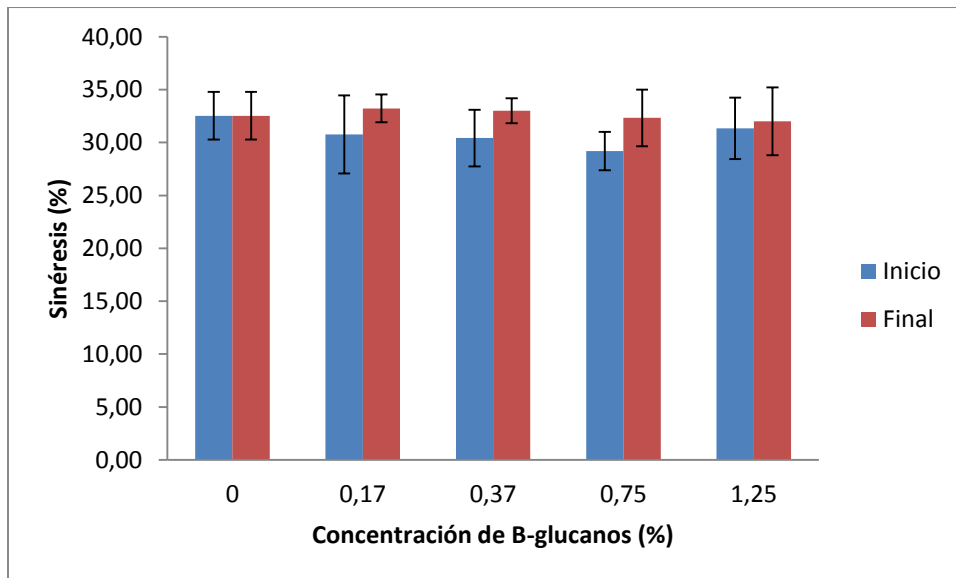


Figura 15. Porcentaje de sinéresis de acuerdo a la concentración de β -glucanos y su momento de adición

No se presentaron diferencias significativas en el grado de sinéresis para las diferentes concentraciones (p 0,820); pero, si se encontraron diferencias significativas por el momento de adición de los β -glucanos (p 0,036), siendo mayor la sinéresis al hacerlo al final. Para todas las muestras el grado de sinéresis corresponde a una estructura adecuada de gel, ya que son inferiores al 42%, resultado positivo para este tipo de β -glucanos, ya que normalmente la adición de los mismos en lácteos suele ocasionar mayor sinéresis. [7]

La sinéresis representa la capacidad de retención de agua, la cual puede variar de acuerdo al tipo de yogur, en especial en cuanto a su proceso de elaboración y los ingredientes adicionados como fibras o minerales que suelen aumentarla. En esta investigación se elaboró un yogur batido, en el que se esperan estos menores valores de sinéresis porque se da un rompimiento del gel, a diferencia de los que son asentados que pueden tener sinéresis mayor al 60%. Debido a que la sinéresis es un parámetro importante en la calidad de un yogur, estos datos son muy valiosos para demostrar que este tipo de ingrediente genera o no defectos en el mismo.

Frecuentemente la adición de fibras influye en el porcentaje de sinéresis ya que afectan la estabilidad del yogurt al interactuar y dependiendo de su capacidad de retención de agua pueden hacerlo en menor o mayor medida. Los betaglucanos de *Ganoderma lucidum* empleados no se consideran fibra puesto que su análisis bromatológico solo evidenció 0.9% de fibra total, siendo en mayor parte soluble.

Estos resultados son coherentes con yogures a los que se han adicionado diferentes tipos de carbohidratos y/o fibras. Un estudio que evaluó la adición de 1% de fibra del yacón evidenció que la sinéresis fue menor frente al control (15.4% vs 23.3%) [62], otra investigación estudió el uso de almidones modificados desde el maíz y para todos los experimentos la sinéresis del control fue mayor [54], Ladjevardi et al. evaluaron diferentes adiciones de psyllium (0.08-0.128%) encontrando sinéresis del 32 al 48% [63]. Incluso, en yogures comerciales se han encontrado porcentajes similares de sinéresis (32-34%) [64]. En otro estudio la adición del orujo de uva como fibra dietaria antioxidante a muestras de yogur, dio como resultado una sinéresis del 16 al 33% [65] y, de igual forma, la adición de 1% de fibra de naranja al yogur redujo la sinéresis [66].

Una investigación muy útil para comparar la presente, es en la que Yu- Zhi et al estudiaron la aplicación de polisacáridos hidrosolubles extraídos desde la trufa china (un tipo de hongo) en yogur, encontrando que la adición de los mismos disminuyó la sinéresis atribuyéndose a la capacidad de ligar agua por parte de este tipo de carbohidratos. [67]

Todo esto también se puede explicar porque al adicionar más sólidos totales al yogur se contribuye a una textura más fuerte y con menor posibilidad de separación del suero. La disminución de la sinéresis es más notable con la adición de sólidos proteicos frente a sólidos de carbohidratos, así lo demostró Zare et al al estudiar la adición de harina de lenteja. [68] Por otra parte, a mayor acidez mayor sinéresis, entonces, como este parámetro tampoco se afectó significativamente en los yogures con betaglucanos, con lo que se justifica la poca afectación en la estabilidad del gel.

Para todas las muestras el grado de sinéresis fue menor en los yogures con los β -glucanos adicionados al inicio frente a los adicionados al final. Las diferencias significativas de acuerdo al momento de adición se esperaban, ya que en los yogures a los que se adicionaron los betaglucanos después de la incubación se afecta más la sinéresis por cuanto hay un rompimiento prematuro del gel. Además, estos resultados se podrían relacionar con la mejor incorporación de los β -glucanos a alta temperatura que a baja, ya que durante el experimento se visualizaba formación de grumos y difícil disolución a menor temperatura. El momento de adición de los β -glucanos está directamente relacionado con la temperatura, ya que al inicio se manejó una temperatura cercana a los 70°C, y al final menor a 25°C.

Estos resultados sugieren que el uso de los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* sería mejor incorporándolos a alta temperatura, y que las concentraciones empleadas hasta el 1,25% no afectan la sinéresis del yogur, demostrando posiblemente una alta capacidad de retención de agua, contrario a estudios en los que se ha encontrado que la adición de algunos carbohidratos complejos producen un mayor grado de sinéresis (45-65%). [61] Independientemente de la concentración, los yogures con β -glucanos presentaron menos sinéresis, lo que demuestra la capacidad de estos polisacáridos para ligar el agua, por lo que frente al yogur control este se podría considerar como un efecto positivo.

2.4.4 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial realizada por adultos fue hecha a las nueve formulaciones de yogurt, agrupados en dos sesiones: la primera sesión se evaluaron las cuatro formulaciones del yogurt al que se le adicionaron los β -glucanos previo a la pasteurización junto con el control, y en la segunda sesión se evaluaron las otras cuatro formulaciones del yogurt al que se le adicionaron los β -glucanos al final de la fermentación.

En la tabla 5 se presentan los valores de rango de medias para cada uno de los parámetros de la evaluación sensorial, donde se detectan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las muestras en relación a los atributos evaluados.

Tabla 5. Medias de las pruebas hedónicas realizadas a los yogures

Tratamiento	Sabor	Aroma	Textura	Aceptación general
0	77 ^a	70 ^a	72 ^a	78 ^a
0.17 Inicio	79 ^a	73 ^a	81 ^a	79 ^a
0.37 Inicio	79 ^a	78 ^a	75 ^a	81 ^a
0.75 Inicio	72 ^a	67 ^a	68 ^a	72 ^a
1.25 Inicio	71 ^a	68 ^a	74 ^a	73 ^a
0.17 Final	73 ^a	66 ^a	48 ^b	63 ^a
0.37 Final	72 ^a	65 ^a	69 ^a	73 ^a
0.75 Final	67 ^a	70 ^a	46 ^b	54 ^b
1.25 Final	73 ^a	65 ^a	73 ^a	73 ^a

^{ab} Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencia significativa de acuerdo al Test de Tukey ($p < 0,05$)

Los anteriores valores se obtuvieron a partir de la transformación de los puntajes asignados a las diferentes características. El análisis estadístico demostró diferencia significativa en la valoración de textura para las muestras con 0.17% y 0.75% de β -glucanos adicionados al final del proceso, lo cual se refleja también en la aceptación general, para los que tuvieron menor porcentaje de aceptación frente a las otras muestras. En general, las muestras de yogurt a las que se les adicionaron los β -glucanos al finalizar la fermentación tuvieron menor calificación para los atributos sensoriales, ello podría deberse a que durante el ensayo se dificultó la disolución de los mismos en esta

etapa, cuando la temperatura era menor y la consistencia mayor. Las opiniones expresadas por los panelistas estuvieron enfocadas en la percepción de algunos grumos en las muestras a las que se les adicionaron los β -glucanos al final. La información en la literatura sobre la aceptación de alimentos que contienen compuestos de *Ganoderma lucidum* es escasa para tener un parámetro de comparación.

En la figura 15 se demuestran los resultados de la evaluación sensorial aplicada en niños de 3 a 5 años, público objetivo para este alimento funcional que será usado en un estudio clínico para evaluar efectos sobre el sistema inmune. Se evaluó la aceptación general del yogur con 0.17% de β -glucanos adicionados previa a la pasterización, tratamiento seleccionado por la dosis incorporada, y, basándose en las variables fisicoquímicas observadas. Se encontró que el 80% de los consumidores demostraron buena aceptación del yogur con calificaciones entre me gusta y me gusta muchísimo.

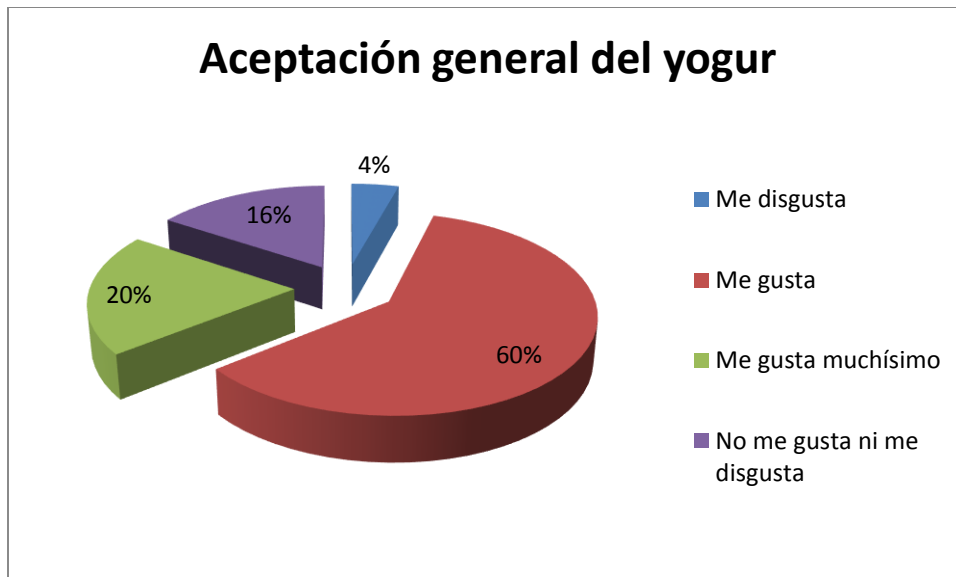


Figura 16. Aceptación general del yogur por parte de los niños.

2.4.5 Evaluación reológica

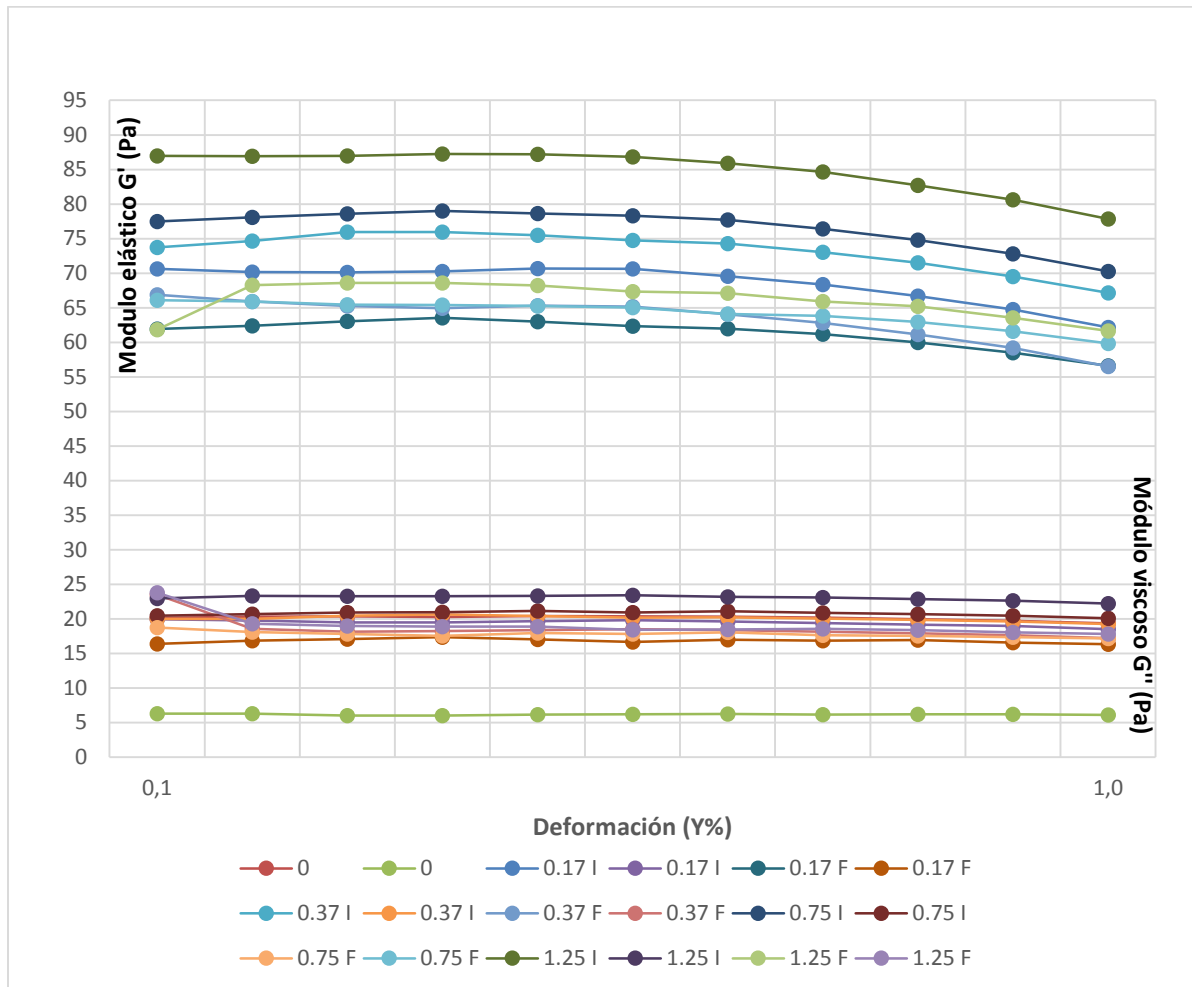


Figura 17. Barrido de amplitud (G' y G'') de las muestras de yogur

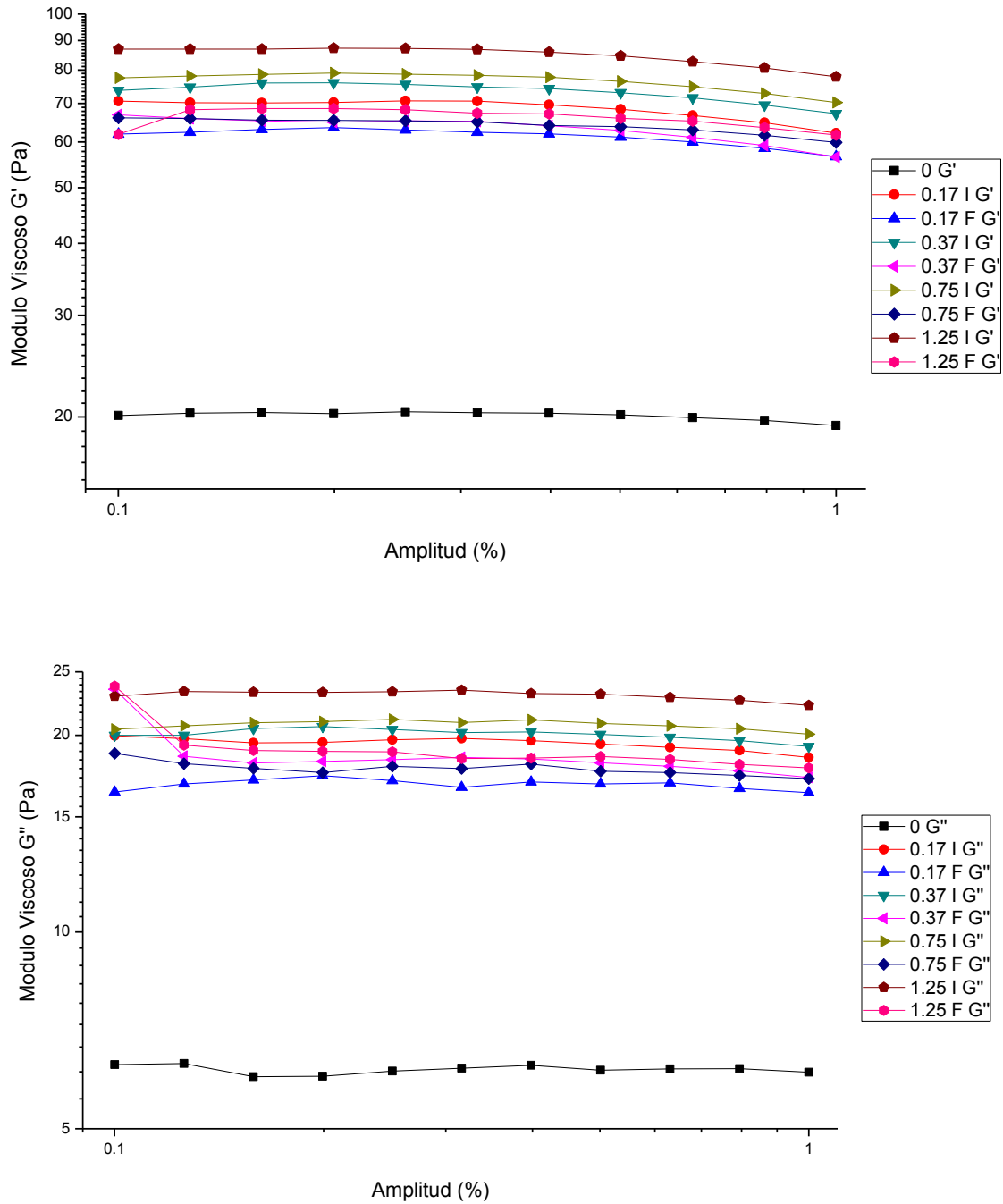


Figura 18. Barrido de amplitud (G' y G'') de las muestras de yogur

La figura anterior demuestra los resultados de la prueba del barrido de amplitud para determinar la región viscoelástica lineal (LVER). El comportamiento del módulo de elasticidad (G') permite observar la integridad estructural de las muestras. Como se observa en dicha gráfica la muestra control evidencia un comportamiento totalmente diferente a las muestras con β -glucanos.

De la misma forma, se evidencia el comportamiento diferente de la muestra control, lo cual evidencia al módulo viscoso (G'') con mayor extensión fuera de la región lineal.

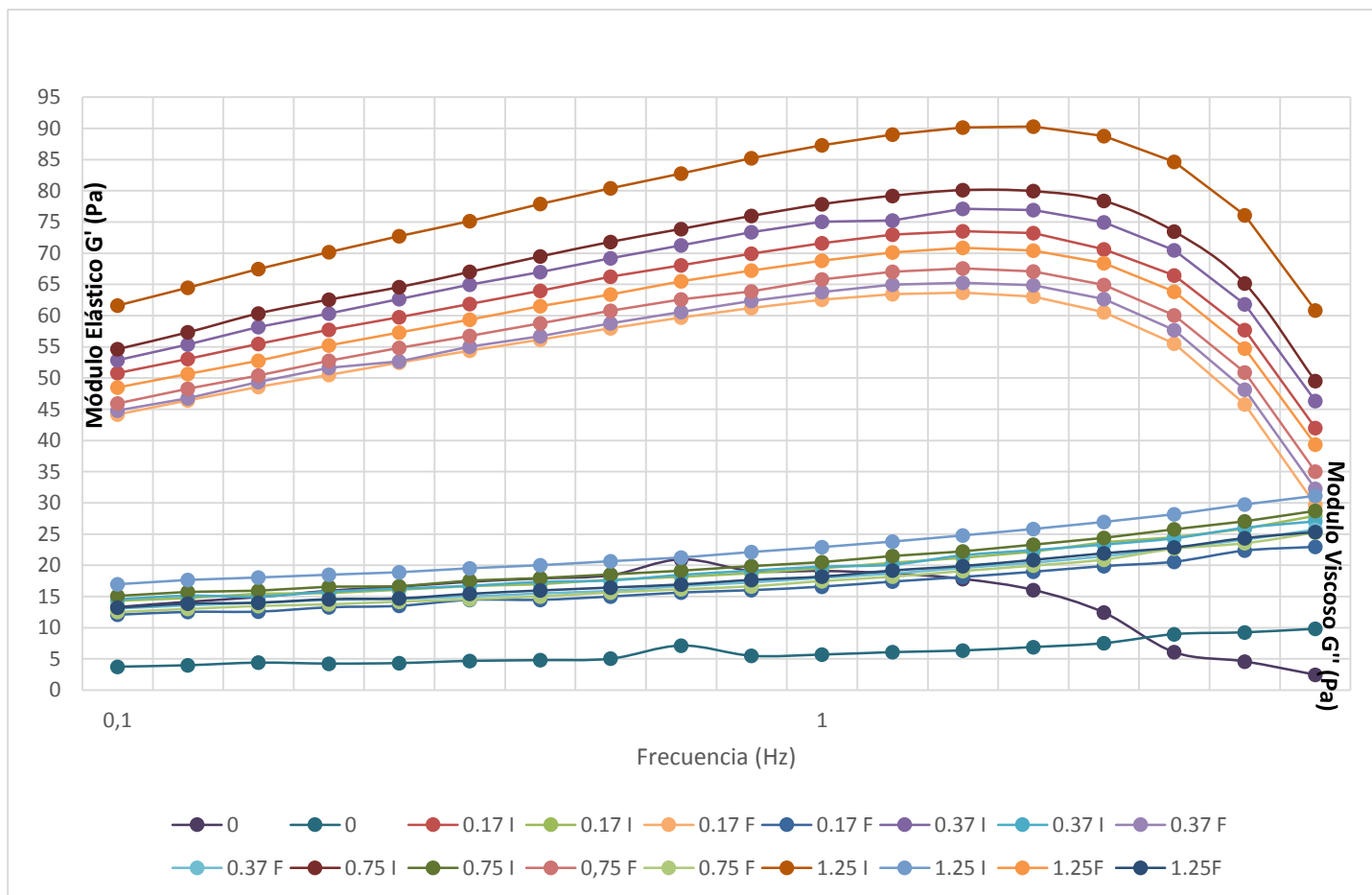


Figura 19. Barrido de frecuencia (G' y G'') de las muestras de yogur

La figura anterior demuestra el análisis de frecuencia, en el que se pueden observar las propiedades viscoelásticas en el tiempo, manteniendo un valor de estrés constante dentro de la región lineal viscoelástica. Allí se presentan los valores del módulo de almacenamiento y del módulo de pérdida a la temperatura de 4°C en función de la frecuencia para los yogures estudiados. Se puede observar que existen diferencias cuantitativas en el espectro para las magnitudes de los parámetros viscoelásticos de las diferentes muestras. También se aprecia el incremento del módulo viscoso (G''), y un descenso del módulo elástico (G') al ir aumentando la frecuencia siguiendo un comportamiento constante, por lo que todas las muestras se comportan como un gel en todo el rango de frecuencia estudiada.

Para la muestra control se observa menor variación entre los valores G' y G'' con la frecuencia, que para las muestras con β -glucano, teniendo estas últimas los mayores valores de los módulos G' y G'' , presentando una estructura que requiere de mayores esfuerzos cortantes, para su deformación, lo cual se podría explicar por la presencia de los β -glucanos como polisacáridos, los cuales se comportarían como la amilopectina, demostrando así que las muestras sin β -glucanos presentan formación de un gel más débil. Adicionalmente, para todas las muestras se denotó un comportamiento como fluido no newtoniano con un comportamiento tixotrópico, como es de esperarse para esta matriz láctea.

En la siguiente gráfica se muestra la viscosidad compleja,

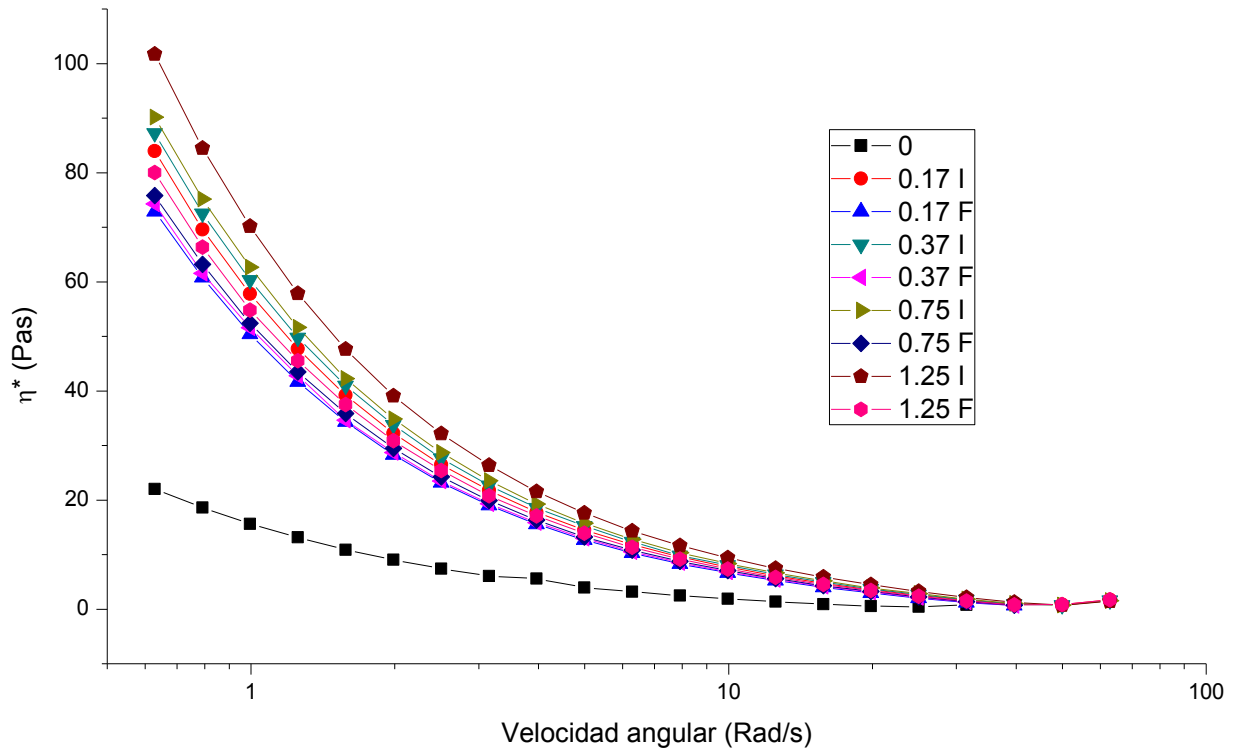


Figura 20. Viscosidad compleja de las muestras de yogur

Ya que no se realizaron variaciones en el contenido de grasa, sino solo para los carbohidratos, estos cambios reológicos se podrían correlacionar directamente con el mayor aporte de sólidos provenientes de los carbohidratos adicionados [69]. Además, las propiedades hidrocoloidales de los β -glucanos han sido descritas [70, 71] aquellos derivados del *Ganoderma lucidum* tienen alta capacidad viscoelástica relacionada directamente con la concentración utilizada, el tipo de cadena, peso molecular y enlaces presentes que pueden hacer al compuesto más o menos flexible (cadenas menos o más compactas) en su interacción con soluciones a diferentes temperaturas [72, 73]. Los β -glucanos como polisacáridos, generalmente tienen una estructura química compleja con bastantes grupos hidroxilo, alta capacidad para ligar agua y con ello al interactuar en matrices permitir una estructura de gel más compacta y firme [70, 71] Estas bajas

concentraciones de β -glucanos demostraron afectar el comportamiento reológico del yogur, con lo que se esperaría que formulaciones con mayor cantidad afectarían más la viscoelasticidad. De acuerdo a lo anterior, podría llegar a considerarse el uso de estos compuestos para funcionalidad tecnológica como mejorador de textura además de su funcionalidad fisiológica para el ser humano.

A continuación se presentan parámetros reológicos de todas las muestras:

Tabla 6. Parámetros reológicos G' G'' y $\text{Tan } \delta^\circ$

Yogur	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\text{Tan } \delta^\circ$
0	19.4 \pm 1.3 ^a	6.1 \pm 0.2 ^a	0.314 \pm 0.0 ^a
0.17 I	68.6 \pm 2.8 ^b	19.4 \pm 0.4 ^b	0.284 \pm 0.0 ^b
0.17 F	60.7 \pm 2.9 ^c	16.7 \pm 0.4 ^c	0.276 \pm 0.0 ^c
0.37 I	72.5 \pm 3.8 ^d	20.0 \pm 0.5 ^d	0.276 \pm 0.0 ^c
0.37 F	63.4 \pm 3.2 ^e	18.6 \pm 1.7 ^e	0.294 \pm 0.0 ^d
0.75 I	76.6 \pm 2.8 ^f	20.7 \pm 0.3 ^f	0.271 \pm 0.0 ^e
0.75 F	62.9 \pm 3.5 ^g	17.6 \pm 0.6 ^g	0.280 \pm 0.0 ^f
1.25 I	84.9 \pm 3.2 ^h	23.0 \pm 0.4 ^h	0.272 \pm 0.0 ^g
1.25 F	65.5 \pm 3.2 ⁱ	18.9 \pm 1.6 ⁱ	0.290 \pm 0.0 ^h

abcdefghi Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencia significativa de acuerdo al Test de Tukey ($p < 0,05$)

2.4.6 Evaluación microbiológica

Para la evaluación microbiológica, sólo se evaluó la concentración de probióticos en el tiempo para saber que se cumplía con los límites mínimos. Los resultados se presentan a continuación:

Figura 21. Viabilidad de microorganismos probióticos en las muestras de yogur durante el tiempo

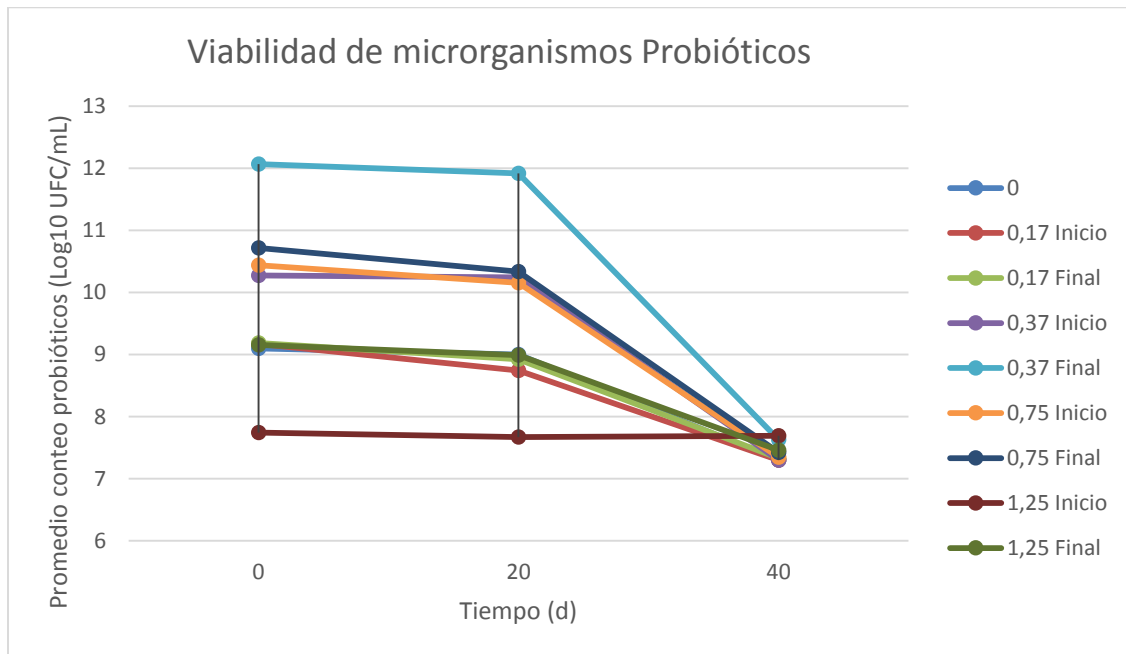


Tabla 7. Conteo de microorganismos probióticos de las muestras de yogur

Promedio de conteo celular (log 10 UFC/mL)									
Día	0	0,17 I	0,17 F	0,37 I	0,37 F	0,75 I	0,75 F	1,25 I	1,25 F
0	9,1	9,2	9,2	10,3	12,1	10,4	10,7	7,7	9,2
20	9	8,7	8,9	10,2	11,9	10,2	10,3	7,7	9,0
40	7,3	7,3	7,3	7,3	7,6	7,3	7,4	7,7	7,5

La anterior figura y tabla demuestran la disminución de los microorganismos probióticos en el tiempo, no obstante, estos se mantuvieron desde el inicio hasta el final de su vida útil dentro de las concentraciones requeridas para considerarse un yogur con probióticos (1×10^6 UFC/g).

Estos resultados no concuerdan con un estudio en el que los β -glucanos tuvieron efecto protector en *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium breve* [35], además, de que en este caso se puede inferir que los microorganismos usados en el presente estudio (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis* B1, *Bifidobacterium breve* Bbr8 y *Bifidobacterium longum* BI 10) no poseen enzimas para digerir estos polisacáridos complejos. Lo anterior, permite concluir que la concentración de β -glucanos adicionados

desde el inicio no se perdería por metabolismo microbiológico de las cepas probióticas, lo que confirma lo encontrado por Martensson [37] donde tras el proceso de fermentación la concentración de β -glucanos se mantenía, siendo un efecto benéfico para garantizar determinada cantidad de estos compuestos. A su vez, las cepas probióticas no se verían afectadas por la presencia de los mismos, con lo que podría descartarse el uso de estos compuestos como prebióticos.

Relacionando estos análisis microbiológicos con los resultados de las propiedades fisicoquímicas, podría deducirse que en este caso, ni los cultivos iniciadores ni los cultivos probióticos consumen este tipo de β -glucanos sin afectar por esta vía la viscosidad y acidificación del producto final. Podría considerarse que se requiere un mayor tiempo para el proceso de fermentación por parte de los microorganismos, tal vez porque los β -glucanos pudieran actuar como barrera o encapsulantes de la lactosa presente.

2.5 Conclusiones

El análisis bromatológico demostró que la adición de β -glucanos de *Ganoderma lucidum* no afectó significativamente el contenido de grasa, proteína, y cenizas frente al yogur control. El contenido de carbohidratos y humedad si fue afectado como se esperaba con la adición de este tipo de polisacáridos. La diferencia se relacionó más con el factor concentración que con el momento de adición.

La concentración de β -glucanos disminuyó levemente en el tiempo, pero no de forma significativa. Estos compuestos se mantuvieron tanto los adicionados al previo a la pasteurización como posterior a la fermentación.

La variación del pH fue afectada por la adición de β -glucanos de *Ganoderma lucidum*, este efecto se presentó en todas las concentraciones evaluadas como en los dos momentos de adición frente al control.

La acidez no presentó diferencias significativas en las muestras frente al control, alcanzando todas las muestras hasta 0.71-0.81% de acidez, que frente a otros yogures (1%) es inferior. De lo que se infiere que el pH y acidez del yogur son afectados por la adición de β -glucanos de *Ganoderma lucidum*, con lo que se deben tener en cuenta estos resultados para evaluar en detalle una cinética de fermentación.

Los yogures con β -glucanos de *Ganoderma lucidum* presentaron menos sinéresis, efecto positivo que confirma su capacidad como ligador de agua.

La evaluación sensorial por escala hedónica para los atributos de aroma, sabor y textura fue positiva, siendo menor y con diferencia significativa para el atributo de textura en muestras con β -glucanos (0.17-0.75%) adicionados al final de la fermentación.

La aceptación general del yogur con 0.17% adicionado previo a la pasteurización, por parte del público objetivo fue del 80%. Considerándose un valor alto para la evaluación por parte de consumidor.

La evaluación reológica demostró diferencias significativas entre todas las muestras y en comparación frente al control. Estas diferencias en el comportamiento viscoelástico se relacionan directamente con las concentraciones empleadas. Estos resultados son importantes a considerar dentro de un proceso a escala industrial, ya que pese a que sensorialmente no se percibió de forma significativa, es un hecho que la adición de este tipo de polisacáridos puede afectar el comportamiento del yogur en mayor o menor medida.

La evaluación microbiológica de los microorganismos probióticos evidenció viabilidad de los mismos, pese a que en el tiempo de vida útil demuestran tendencia a disminuir, la cantidad mínima para considerarse un yogur con probióticos se garantiza. Demostrando esto que los β -glucanos no inciden ni positiva ni negativamente en este factor.

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1 Conclusiones

Los β -glucanos derivados de *Ganoderma lucidum* han sido evaluados ampliamente demostrando su efecto positivo como moduladores del sistema inmunológico, lo que los hace un ingrediente potencial para ser incluido en alimentos funcionales y productos farmacéuticos.

La inclusión de los β -glucanos derivados de *Ganoderma lucidum* en las concentraciones implementadas (0.17%-1.25%) no tuvo incidencia negativa dentro del proceso de elaboración, ni cuando se adicionaron previo a la pasteurización, ni al final de la fermentación.

De acuerdo a los resultados fisicoquímicos, microbiológicos, sensoriales y reológicos el momento más adecuado para incluir los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* sería previo a la pasteurización, en especial para garantizar una mejor disolución y evitar la formación de grumos que podrían percibirse sensorial y reológicamente.

La adición de β -glucanos de *Ganoderma lucidum* dio como resultado mayor aporte de carbohidratos y sólidos totales, sin considerarse un efecto significativo frente al control.

La sinéresis fue menor en los yogures con β -glucanos de *Ganoderma lucidum*, y el pH y acidez no se vieron afectados considerablemente. Efectos que permiten afirmar a estos polisacáridos como un ingrediente apto para usar en una matriz de yogur desde el punto de vista tecnológico.

La valoración de las características sensoriales de sabor, aroma y textura fue buena para todos los yogures; siendo mejor para aquellos en el que el momento de adición fue al inicio. Y, teniendo menor valoración en textura y aceptación general aquellos que en los que los β -glucanos se adicionaron al final de la fermentación.

La aceptación general del yogur con 0.17% de β -glucanos adicionados previo a la pasterización, y que sería el producto a evaluar en un estudio de intervención clínica en la población infantil fue bastante buena con un 80% calificándolo como me gusta y me gusta mucho.

La concentración de β -glucanos se mantuvo durante todo el tiempo de vida útil para todas las muestras evaluadas.

La estructura química de este tipo de β -glucanos incide directa y significativamente sobre las propiedades viscoelásticas del yogur, lo que dependiendo de la concentración adicionada y del tipo de yogur (bebible, cuchareable) podría ser desable o no.

3.2 Recomendaciones

Para una futura investigación sería interesante evaluar más ampliamente la cinética de fermentación que podría presentarse con la adición de estos compuestos. De igual forma, entrar en detalle a las interacciones de estos compuestos con los cultivos fermentadores. Además, de poder comparar el uso de estos β -glucanos derivados de *Ganoderma lucidum* frente a aquellos derivados de otras fuentes microbiológicas y de fuentes vegetales como la avena y la cebada.

Con estos resultados, podrían llegar a ampliarse las aplicaciones y futuras investigaciones en otras matrices alimenticias lácteas y no lácteas, que sirvan como base para ofrecer alimentos funcionales a la población.

Los efectos benéficos sobre el organismo humano deben ser validados mediante estudios de intervención con este tipo de alimentos que involucren a los β -glucanos de *Ganoderma lucidum* como compuestos bioactivos.

Además de la funcionalidad sobre el sistema inmune, y ya que a la concentración de 1.25% no se encontró efecto negativo sobre las propiedades del yogur, podría llegar a considerarse evaluar la funcionalidad sobre la salud cardiovascular.

Dada la potencialidad de los compuestos obtenidos biotecnológicamente desde el *Ganoderma lucidum*, en futuras investigaciones se podría evaluar la inclusión de otro tipo de compuesto, como los ácidos ganodéricos, en alimentos funcionales.

Anexo A: Formato de evaluación sensorial

Nombre: _____ Fecha: _____

Por favor califique con una x cada muestra en los siguientes aspectos:

No. Muestra _____

Atributo/Calificativo	No me gusta	Me gusta poco	Me es indiferente	Me gusta	Me gusta mucho
Sabor					
Aroma					
Textura (viscosidad)					
Aceptación general					

No. Muestra _____

Atributo/Calificativo	No me gusta	Me gusta poco	Me es indiferente	Me gusta	Me gusta mucho
Sabor					
Aroma					
Textura (viscosidad)					
Aceptación general					

No. Muestra _____

Atributo/Calificativo	No me gusta	Me gusta poco	Me es indiferente	Me gusta	Me gusta mucho
Sabor					
Aroma					
Textura (viscosidad)					
Aceptación general					

No. Muestra _____

Atributo/Calificativo	No me gusta	Me gusta poco	Me es indiferente	Me gusta	Me gusta mucho
Sabor					
Aroma					
Textura (viscosidad)					
Aceptación general					

No. Muestra _____

Atributo/Calificativo	No me gusta	Me gusta poco	Me es indiferente	Me gusta	Me gusta mucho
Sabor					
Aroma					
Textura (viscosidad)					
Aceptación general					

Observaciones:

Anexo B: Formato de aceptación sensorial en niños.

Nombre: _____ Fecha: _____

Por favor califique la muestra de acuerdo a la apreciación de la aceptación por parte del niño



No me gusta



Me gusta poco



Me es indiferente



Me gusta



Me gusta mucho

Observaciones:

Bibliografía

1. Pang, G., et al., *How functional foods play critical roles in human health*. Food Science and Human Wellness, 2012. **1**(1): p. 26-60.
2. Chi H.J. Kao, et al., *Anti-cancer activities of Ganoderma lucidum active ingredients and pathways*. Functional Foods in Health and Disease 2013. **3**(2): p. 48-65.
3. Dudhgaonkar, S., A. Thyagarajan, and D. Sliva, *Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom Ganoderma lucidum*. Int Immunopharmacol, 2009. **9**(11): p. 1272-80.
4. Shi, M., Z. Zhang, and Y. Yang, *Antioxidant and immunoregulatory activity of Ganoderma lucidum polysaccharide (GLP)*. Carbohydr Polym, 2013. **95**(1): p. 200-6.
5. Chan, G.C., W.K. Chan, and D.M. Sze, *The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells*. J Hematol Oncol, 2009. **2**: p. 25.
6. Annunziata, A. and R. Vecchio, *Functional foods development in the European market: A consumer perspective*. Journal of Functional Foods, 2011. **3**(3): p. 223-228.
7. Bangari, S., *Effects of Oat Beta Glucan on the Stability and Textural Properties of Beta glucan fortified milk beverage*, in Sciences. 2011, University of Wisconsin-Stout: <http://www2.uwstout.edu/content/lib/thesis/2011/2011bangaris.pdf>.
8. Keypour, S., et al., *Qualitative analysis of ganoderic acids in Ganoderma lucidum from Iran and China by RP-HPLC and electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS)*. Food Chemistry, 2010. **119**(4): p. 1704-1708.
9. Saltarelli, R., et al., *Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of Ganoderma lucidum from Central Italy*. Food Chemistry, 2009. **116**(1): p. 143-151.
10. Tan, B.K. and J. Vanitha, *Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional chinese medicinal herbs: a review*. Curr Med Chem, 2004. **11**(11): p. 1423-30.
11. Paterson, R.R., *Ganoderma - a therapeutic fungal biofactory*. Phytochemistry, 2006. **67**(18): p. 1985-2001.
12. Echeverri, S.A.M., *MARCO TEORICO USOS GANODERMA LUCIDUM FAO*. 2008.
13. Débora Figlasa, N.C., *Monografía sobre las propiedades medicinales del hongo REISHI (Ganoderma lucidum)*. 2006.

14. Chiu, S.W., et al., *Nutritional value of Ganoderma extract and assessment of its genotoxicity and anti-genotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes*. Food and Chemical Toxicology, 2000. **38**(2–3): p. 173-178.
15. Zhou, X., et al., *Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions*. Am J Chin Med, 2007. **35**(4): p. 559-74.
16. Villares A, M.-V.L., Guillamón E, *Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms Agriculture*, 2012. **2**: p. 452-471.
17. Askin, R., M. Sasaki, and M. Goto, *Recovery of water-soluble compounds from Ganoderma lucidum by hydrothermal treatment*. Food and Bioproducts Processing, 2010. **88**(2–3): p. 291-297.
18. Boh, B., et al., *Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds*, in *Biotechnology Annual Review*, M.R. El-Gewely, Editor. 2007, Elsevier. p. 265-301.
19. Lin, Z.B., *Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by Ganoderma lucidum*. J Pharmacol Sci, 2005. **99**(2): p. 144-53.
20. Shi, M., Z. Zhang, and Y. Yang, *Antioxidant and immunoregulatory activity of Ganoderma lucidum polysaccharide (GLP)*. Carbohydrate Polymers, 2013. **95**(1): p. 200-206.
21. Liu, W., et al., *Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of Ganoderma lucidum*. International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **46**(4): p. 451-457.
22. *AHP Reishi Mushroom*, in *American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium*, R.U. Herbalist, Editor. 2006.
23. Gao, Y. and S. Zhou, *Cancer Prevention and Treatment by Ganoderma, a Mushroom with Medicinal Properties*. Food Reviews International, 2003. **19**(3): p. 275-325.
24. Zhang, M., et al., *Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity*. Trends in Food Science & Technology, 2007. **18**(1): p. 4-19.
25. Wikipedia. *Chemical structure Betaglucan 2014* [cited 2014 Junio]; Available from: http://es.wikipedia.org/wiki/Beta_glucano.
26. FDA, *GRAS NOTICE (MUSHROOM BETA GLUCAN) 000413*. 2011.
27. Zhu, X.L., A.F. Chen, and Z.B. Lin, *Ganoderma lucidum polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice*. J Ethnopharmacol, 2007. **111**(2): p. 219-26.
28. Moradali, M.F., et al., *Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)*. Int Immunopharmacol, 2007. **7**(6): p. 701-24.
29. Cao, Q.Z. and Z.B. Lin, *Ganoderma lucidum polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell*. Life Sci, 2006. **78**(13): p. 1457-63.

30. Social, M.d.S.y.P., *Resolución 333 de 2011 Rotulado nutricional*, Colombia, Editor. 2011.
31. Havrlentová M., P.Z., Burgárová A., Gago F., Hlinková A., Šturdík E., *Cereal β -glucans and their Significance for the Preparation of Functional Foods*. Czech Journal of food sciences, 2011. **29**(1): p. 1-14.
32. Sahan, N., K. Yasar, and A.A. Hayaloglu, *Physical, chemical and flavour quality of non-fat yogurt as affected by a β -glucan hydrocolloidal composite during storage*. Food Hydrocolloids, 2008. **22**(7): p. 1291-1297.
33. Konuklar, G., et al., *Use of a β -glucan hydrocolloidal suspension in the manufacture of low-fat Cheddar cheeses: textural properties by instrumental methods and sensory panels*. Food Hydrocolloids, 2004. **18**(4): p. 535-545.
34. Repin, N., M.G. Scanlon, and R. Gary Fulcher, *Phase behaviour of casein micelles and barley beta-glucan polymer molecules in dietary fibre-enriched dairy systems*. Journal of Colloid and Interface Science, 2012. **377**(1): p. 7-12.
35. Rosburg, V., T. Boylston, and P. White, *Viability of bifidobacteria strains in yogurt with added oat beta-glucan and corn starch during cold storage*. J Food Sci, 2010. **75**(5): p. C439-44.
36. Gee, V.L., T. Vasanthan, and F. Temelli, *Viscosity of model yogurt systems enriched with barley β -glucan as influenced by starter cultures*. International Dairy Journal, 2007. **17**(9): p. 1083-1088.
37. Martensson, O., et al., *Formulation of an oat-based fermented product and its comparison with yogurt*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001. **81** p. 1314-1321.
38. Mårtensson, O., R. Öste, and O. Holst, *The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products*. Food Research International, 2002. **35**(8): p. 775-784.
39. Lambo, A.M., R. Öste, and M.E.G.L. Nyman, *Dietary fibre in fermented oat and barley β -glucan rich concentrates*. Food Chemistry, 2005. **89**(2): p. 283-293.
40. S. Heydari, A.M.M., M.R. Ehsani, M.A. Mohammadifar and H. Ezzatpanah, *Biochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic yogurt containing various prebiotic compounds*. Italian Journal Food Science, 2011. **23**: p. 153-163.
41. Domagala, J., et al., *The Influence of Storage Time on Rheological Properties and Texture of Yoghurts with the Addition of Oat-Maltodextrin as the Fat Substitute*. International Journal of Food Properties, 2005. **8**(2): p. 395-404.
42. Anna Piotrowska, B.W.-R., Franciszek Świdorski, *Possibility of beta-glucan from spent brewer's yeast addition to yoghurts*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2009. **59**(4): p. 299-302.
43. Volman, J.J., J.D. Ramakers, and J. Plat, *Dietary modulation of immune function by beta-glucans*. Physiol Behav, 2008. **94**(2): p. 276-84.

44. Bernadetta Hozová, L.K., Beáta Kelemenová, *Application of β -D-Glucans Isolated from Mushrooms Pleurotus ostreatus (Pleuran) and Lentinus edodes (Lentinan) for increasing the bioactivity of yoghurts*. Czech Journal of food sciences, 2004. **22**(6): p. 204-214.
45. Singh, M., S. Kim, and S.X. Liu, *Effect of purified oat beta-glucan on fermentation of set-style yogurt mix*. J Food Sci, 2012. **77**(8): p. E195-201.
46. Vasiljevic, T., T. Kealy, and V.K. Mishra, *Effects of beta-glucan addition to a probiotic containing yogurt*. J Food Sci, 2007. **72**(7): p. C405-11.
47. Lai, L.-S. and D.-H. Yang, *Rheological properties of the hot-water extracted polysaccharides in Ling-Zhi (Ganoderma lucidum)*. Food Hydrocolloids, 2007. **21**(5-6): p. 739-746.
48. McDonald LC, M.R., Daeschel MA, Fleming HP, *A Differential Medium for the Enumeration of Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid Bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 1987. **53**(6): p. 1382-1384.
49. Familiar, I.C.d.B. *Tabla de composición de alimentos colombianos*. 2014 [cited 2014 5/Septiembre/2014].
50. Vidal-Valverde, C., C. Martin-Villa, and J. Herranz, *Determination of Soluble Carbohydrates in Yogurts by High Performance Liquid Chromatography*. Journal of Dairy Science, 1984. **67**(4): p. 759-763.
51. Goodenough, E.R. and D.H. Kleyn, *Qualitative and Quantitative Changes in Carbohydrates During the Manufacture of Yogurt*. Journal of Dairy Science, 1976. **59**(1): p. 45-47.
52. El Khoury, D., et al., *Increasing the protein to carbohydrate ratio in yogurts consumed as a snack reduces post-consumption glycemia independent of insulin*. Clinical Nutrition, 2014. **33**(1): p. 29-38.
53. Crispin-Isidro, G., et al., *Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt*. LWT - Food Science and Technology, (0).
54. Lobato-Calleros, C., et al., *Impact of native and chemically modified starches addition as fat replacers in the viscoelasticity of reduced-fat stirred yogurt*. Journal of Food Engineering, 2014. **131**(0): p. 110-115.
55. Rinaldoni, A.N., M.E. Campderrós, and A. Pérez Padilla, *Physico-chemical and sensory properties of yogurt from ultrafiltered soy milk concentrate added with inulin*. LWT - Food Science and Technology, 2012. **45**(2): p. 142-147.
56. Aziznia, S., et al., *Whey Protein Concentrate and Gum Tragacanth as Fat Replacers in Nonfat Yogurt: Chemical, Physical, and Microstructural Properties*. Journal of Dairy Science, 2008. **91**(7): p. 2545-2552.
57. Guzel-Seydim, Z.B., E. Sezgin, and A.C. Seydim, *Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt*. Food Control, 2005. **16**(3): p. 205-209.

58. Kaaki, D., et al., *Preference mapping of commercial Labneh (strained yogurt) products in the Lebanese market*. Journal of Dairy Science, 2012. **95**(2): p. 521-532.
59. Ye, M., et al., *Quality characteristics and antioxidant activity of hickory-black soybean yogurt*. LWT - Food Science and Technology, 2013. **51**(1): p. 314-318.
60. Lazaridou, A., et al., *Structure development and acidification kinetics in fermented milk containing oat β -glucan, a yogurt culture and a probiotic strain*. Food Hydrocolloids, 2014. **39**(0): p. 204-214.
61. Díaz-Jiménez B, S.-M.M., Vélez-Ruiz JF, *Efecto de la adición de fibra y la disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogur*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 2004. **3**: p. 287-305.
62. Ramirez-Santiago, C., et al., *Enrichment of stirred yogurt with soluble dietary fiber from *Pachyrhizus erosus* L. Urban: Effect on syneresis, microstructure and rheological properties*. Journal of Food Engineering, 2010. **101**(3): p. 229-235.
63. Ladjevardi, Z.S., S.M.T. Gharibzahedi, and M. Mousavi, *Development of a stable low-fat yogurt gel using functionality of psyllium (*Plantago ovata* Forsk) husk gum*. Carbohydrate Polymers, (0).
64. Mani-López, E., E. Palou, and A. López-Malo, *Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria*. Journal of Dairy Science, 2014. **97**(5): p. 2578-2590.
65. Tseng, A. and Y. Zhao, *Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing*. Food Chemistry, 2013. **138**(1): p. 356-365.
66. Sendra, E., et al., *Viscoelastic properties of orange fiber enriched yogurt as a function of fiber dose, size and thermal treatment*. LWT - Food Science and Technology, 2010. **43**(4): p. 708-714.
67. Miao, Y.-Z., et al., *Extraction of water-soluble polysaccharides (WSPS) from Chinese truffle and its application in frozen yogurt*. Carbohydrate Polymers, 2011. **86**(2): p. 566-573.
68. Zare, F., et al., *Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour*. Food Research International, 2011. **44**(8): p. 2482-2488.
69. Shaker, R.R., R.Y. Jumah, and B. Abu-Jdayil, *Rheological properties of plain yogurt during coagulation process: impact of fat content and preheat treatment of milk*. Journal of Food Engineering, 2000. **44**(3): p. 175-180.
70. Stone, B.A., *Chapter 2.1 - Chemistry of β -Glucans*, in *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*, A.B.B.F.A. Stone, Editor. 2009, Academic Press: San Diego. p. 5-46.
71. Gidley, M.J. and K. Nishinari, *Chapter 2.2 - Physico-chemistry of (1,3)- β -Glucans*, in *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and*

- Related Polysaccharides*, A.B.B.F.A. Stone, Editor. 2009, Academic Press: San Diego. p. 47-118.
72. Wang, J., et al., *Structure and chain conformation of water-soluble heteropolysaccharides from Ganoderma lucidum*. Carbohydrate Polymers, 2011. **86**(2): p. 844-851.
73. Wang, J. and L. Zhang, *Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -d-glucan isolated from Ganoderma lucidum*. Carbohydrate Research, 2009. **344**(1): p. 105-112.