

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**PRODUCCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN FUNCIONAL DE β -
GLUCANOS PRODUCIDOS POR LA CEPA MUTANTE BMA2 DE *Ustilago*
maydis (ARÉCHIGA-CARVAJAL & RUIZ-HERRERA, 2005): UN ENFOQUE
INTEGRAL.**

POR

CRISTINA LIZBETH SIFUENTES ESTRADA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA

2025

**PRODUCCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN FUNCIONAL DE β -GLUCANOS
PRODUCIDOS POR LA CEPA MUTANTE BMA2 DE *Ustilago maydis* (ARÉCHIGA-
CARVAJAL & RUIZ-HERRERA, 2005): UN ENFOQUE INTEGRAL.**

Comité de tesis



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Presidente



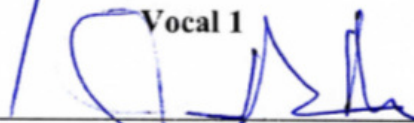
Dra. Susana de la Torre Zavala

Secretario



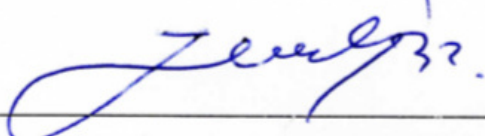
Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Vocal 1



MC. Juan Manuel Adame Rodríguez

Vocal 2



MC. Katia Jamileth González Lozano

Vocal 3



Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirector de Posgrado

**PRODUCCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN FUNCIONAL DE β -
GLUCANOS PRODUCIDOS POR LA CEPA MUTANTE BMA2 DE *Ustilago*
maydis (ARÉCHIGA-CARVAJAL & RUIZ-HERRERA, 2005): UN ENFOQUE
INTEGRAL.**

Dirección de Tesis



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
DIRECTORA

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de avanzar en mi carrera profesional. Al Departamento de Posgrado por su respaldo y orientación.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por su financiamiento a través de la beca proporcionada a lo largo del posgrado (CVU: 1234841).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por el don de la vida y por permitirme alcanzar mis objetivos. Por mostrarme que cada día es una bendición y una oportunidad de aprendizaje. Por llenar mi corazón de paz.

A mi familia. En especial a mis padres, Rigoberto y Cristina, por darme su apoyo, cuidado y amor incondicional. A mis hermanos, Rodrigo y Daniel por su cariño y por consentirme. A mis abuelitos, por preocuparse por mí y por su apoyo inigualable. Los quiero.

A mi mejor amigo y compañero de vida, Oscar: gracias por amarme, cuidarme y brindarme tú apoyo. La vida es más bonita a tu lado.

A mis amigas y amigos que, cerca o a la distancia, sé que están para mí como yo para ellas: gracias por escucharme y por su gran aprecio a lo largo de los años.

A las personas que, en alguna parte de mi vida, han sido inspiración para seguir adelante.

A la Dra. Elva, por confiar en mí desde que me conoció, por todas sus enseñanzas y, lo más importante, por permitirme ser parte de la Unidad de Manipulación Genética. Asimismo, a los miembros de UMGE: Katia, Mar, Debany, Juanjo, Sofí, Jordan y Álvaro: gracias por los buenos momentos y por estar ahí desde el inicio.

A mis compañeros y compañeras de generación, así como a las amistades formadas en el camino: gracias por los momentos compartidos a lo largo de estos dos años.

Al laboratorio de Nanotecnología, en especial al Dr. Sergio Galindo y M.C. Anahí Zamora por apoyarme facilitándome equipo y orientación para algunos análisis. Asimismo, al laboratorio de Inmunología y Virología, en especial a la Dra. Itza Eloísa y a la M.C. Mónica Garza por su guía en los experimentos *in vitro*. A los demás miembros de mi comité de tesis, la Dra. Susana de la Torre, M.C. Juan Manuel Adame y a la M.C. Katia González por su orientación y tiempo. Al la Unidad de formulación de Biológicos por su apoyo.

DEDICATORIAS

A Dios.

A mi familia.

A todos los que sueñan y trabajan por un mundo mejor.

A todos aquellos que me acompañaron en el proceso de este trabajo.

No es convincente la desconexión de los tiempos.

∞

ÍNDICE

ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	12
1. RESUMEN	14
2. ABSTRACT	15
3. INTRODUCCIÓN	16
4. ANTECEDENTES	18
4.1 ¿Qué son los β - glucanos?	18
4.2 Estructura y propiedades fisicoquímicas	18
4.2.1 Longitud de cadena y peso molecular	19
4.2.2 Puntos de ramificación	20
4.2.3 Conformación estructural	21
4.3 Propiedades biotecnológicas de los β -glucanos	24
4.3.1 Efectos de β -glucanos en la producción de citocinas, reducción de ROS y citotoxicidad	25
4.4 Producción de β -glucanos	26
4.4.1 Producción de β -glucanos en <i>Ustilago maydis</i>	28
4.6 Métodos de extracción de B-glucanos	29
4.8 Biosíntesis de β -glucanos y regulación metabólica	31
4.9 Importancia del mercado	32
7 OBJETIVO DEL TRABAJO	36
7.1 Objetivo general	36
7.2 Objetivos particulares	36
8 MATERIAL Y MÉTODOS	37
8.1 Ubicación	37
8.2 Cepas utilizadas	37
8.3 Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de la mutante de <i>Ustilago maydis</i>	37
8.4 Producción de β -glucanos	38
8.5 Extracción de β -glucanos	39
8.6 Identificación de β -glucanos	39

8.7 Análisis de la ruta de biosíntesis de β -glucanos	40
8.8 Evaluación funcional de β -glucanos	41
8.9 Análisis de citocinas proinflamatorias con ensayos basados en perlas de citometría de flujo	42
8.10 Análisis de datos	43
09 RESULTADOS	44
9.1 Evaluación de la Producción de β -glucanos	44
9.2 Análisis de la expresión génica durante la producción de β -glucanos	46
9.3 Extracción e Identificación de β -glucanos	53
9.2 Evaluación de la citotoxicidad del β -glucano en líneas celulares humanas	57
9.5 Efecto del β -glucano en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células tratadas	58
9.6 Análisis de citocinas proinflamatorias con ensayos basados en perlas de citometría de flujo	60
10 DISCUSIÓN	61
11 CONCLUSIONES	70
12 PERSPECTIVAS	71
13 BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Título	Página
1	Características físicas de β -glucanos producidos por diversas especies	19
2	Propiedades funcionales de β -glucanos según su origen	24
3	Patentes de β -glucanos: origen, producción, purificación y procesamiento	27
4	Comparación de ventajas y desventajas del método de extracción única	29
5	Cantidad de β -glucano de la cepa BMA2 a diferentes horas de cultivo	45
6	Proteínas que son codificadas por los genes enriquecidos en el metabolismo de polisacáridos (GO:0005976)	50
7	Rendimiento de β -glucano de la cepa BMA2 con diferentes métodos de extracción	53
8	Evaluación de citocinas en células HUVEC tratadas con β -glucano	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	Estructura del lentinano y paramylon	18
2	Conformaciones estructurales de diferentes polisacáridos	22
3	Perfil cinético de crecimiento de la cepa BMA2 de <i>U. maydis</i> en medio mínimo modificado	44
4	Cinética de la Demanda Bioquímica de Oxígeno de la mutante BMA2 de <i>U. maydis</i> en medio mínimo modificado y medio mínimo	46
5	Análisis de genes diferencialmente expresados	47
6	Análisis de enriquecimiento realizado en genes de regulación descendente y regulación ascendente	48
7	Esquema de las principales proteínas sobreexpresadas en la biosíntesis de β -glucano en la cepa mutante BMA2 de <i>U. maydis</i>	52
8	Comparación de Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de β -glucano extraído por cuatro métodos diferentes	54
9	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de β -glucano extraído de la cepa BMA2 de <i>U. maydis</i> mediante el método de extracción agua fría (CWE)	55
10	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de β -glucano extraído de la cepa BMA2 de <i>U. maydis</i> mediante el método de extracción agua a presión (SPE)	55
11	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de β -glucano extraído de la cepa BMA2 de <i>U. maydis</i> mediante el método de extracción agua fría (HWE)	56
12	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de β -glucano extraído de la cepa BMA2 de <i>U. maydis</i> mediante el método de extracción alcalina (EAL)	57
13	Resultados de las pruebas de citotoxicidad mediante un ensayo MTT	58
14	Resultados del efecto del β -glucano en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	59

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados Celsius
% v/v	Porcentaje volumen-volumen
%	Porcentaje
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza unidireccional
ARN	Ácido ribonucleico
ATPS	Sistema acuoso de dos fases
Atm	Atmosferas
ATR	Celda de reflectancia total atenuada
BBG	β-glucano de cebada
β-GS	β-glucano sintetasa
BMA2	Cepa mutante de <i>Ustilago maydis</i>
CC ₅₀	Concentración citotóxica media
CWE	Extracción agua fría
CO ₂	Dióxido de carbono
CuSO ₄ ·5(H ₂ O)	Sulfato de cobre pentahidratado
Da	Dalton
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DEG	Gen diferencialmente expresado
d	Día
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPJW	Agua de jugo de papa desproteinado
EAL	Extracción alcalina
EAM	Método de extracción asistida por enzimas
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
FB2	Cepa silvestre de <i>Ustilago maydis</i>
FeCl ₃ · 6(H ₂ O)	Férrico cloruro hexahidratado
FKS	β-1,3-glucano sintasa
FT-IR	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier
G	Gravedad
g/L	Gramos por litro
g/mol	Gramos por mol
GBLP	Polisacárido de <i>Ginkgo biloba</i>
GPC	Cromatografía de permeación en gel
h	Hora
H ₂ O	Agua
H ₃ BO ₃	Ácido trioxobórico
HK	Histidina quinasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HR	Humedad relativa
HUVEC	Célula endotelial de la vena umbilical humana
HWE	Extracción agua fría
kDa	Kilodalton
KCl	Cloruro de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico

L	Litro
LCMS-QTOF	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo por cuadrupolo
M	Molaridad
MAE	Extracción asistida por microondas
MC	Medio completo
min	Minutos
MgSO₄	Sulfato de magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Medio mínimo
MnCl₂ 4(H₂O)	Cloruro de manganeso (II) tetrahidrato
MTT	Ensayo colorimétrico para medir actividad metabólica
N	Normalidad
No.	Número
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Nm	Nanómetro
P	Valor p, valor de probabilidad
pH	Potencial de hidrógeno
PKC	GTPasa Rho1 activa
Psi	Libras por pulgada cuadrada
µg	Microgramo
µg/ mL¹	Microgramo por mililitro
µL	Microlitro
UDPG	Glucosa de difosfato de uridina
R²	Coeficiente de determinación
Rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSM	Metodología de superficie de respuesta
SPE	Extracción agua a presión
W	Potencia
ZnCl₂	Cloruro de zinc

1. RESUMEN

Este estudio se centra en la identificación y evaluación exhaustiva de los β -glucanos producidos por la mutante BMA2 de *Ustilago maydis*, con el objetivo de comprender aspectos funcionales. Los β -glucanos son homopolisacáridos de glucosa, producidos mediante fermentación por la mutante BMA2 (FB2 Δ rim101) de *U. maydis*. Se determinó que el rendimiento de β -glucano aumenta durante la fase de crecimiento exponencial, alcanzando hasta 16.12 g/L a las 36 h de cultivo. Se evaluaron diferentes métodos de extracción, sin diferencias significativas en el rendimiento, pero con variaciones en sus perfiles espectrales obtenidos mediante FT.IR. En el análisis de expresión génica, se identificaron 572 genes diferencialmente expresados entre la cepa BMA2 y FB2. Entre los genes regulados positivamente, se encontraron principalmente asociados a membrana celular, transporte y al metabolismo de carbohidratos. En las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), la concentración que reduce a la mitad la viabilidad celular (CC₅₀) fue 291.76 μ g/mL, indicando que el β -glucano tiene un efecto moderado sobre la viabilidad celular, con un efecto dependiente de la concentración. Además, al evaluar el impacto sobre especies reactivas de oxígeno (ROS), se observó una disminución en la producción de ROS conforme se aumenta la concentración de β -glucano, sugiriendo propiedades antioxidantes. Al investigar el efecto del glucano sobre la producción de citoquinas proinflamatorias, se determinó un aumento leve en niveles de los niveles de IL-17B e IFN- γ , sugiriendo un potencial efecto inmunomodulador. Estos resultados generan una comprensión más profunda de los β -glucanos producidos por la mutante BMA2, permitiendo abrir nuevas perspectivas en su aplicación.

2. ABSTRACT

This study focuses on the identification and comprehensive evaluation of β -glucans produced by the BMA2 mutant of *Ustilago maydis*, with the aim of understanding functional aspects. β -glucans are glucose homopolysaccharides, produced by fermentation for the BMA2 mutant (FB2 Δ rim101) of *U. maydis*. It was determined that β -glucan yield increases during the exponential growth phase, reaching up to 16.12 g/L after 36 h of culture. Different extraction methods were evaluated, showing no significant differences in yield, but with variations in their FT-IR spectral profiles. In the gene expression analysis, 572 differentially expressed genes were identified between the BMA2 and FB2 strains. Among the upregulated genes, those mainly associated with cell membrane, transport, and carbohydrate metabolism were found. In human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), the concentration to reduce cell viability by 50% (CC₅₀) was 291.76 μ g/mL, indicating that β -glucan has a moderate effect on cell viability, with a concentration-dependent effect. Furthermore, when assessing the impact on reactive oxygen species (ROS), a reduction in ROS production was observed as the β -glucan concentration increased, suggesting antioxidant properties. When investigating the effect of glucan on the production of proinflammatory cytokines, a slight increase in the levels of IL-17B and IFN- γ was determined, suggesting a potential immunomodulatory effect. These results provide a deeper understanding of the β -glucans produced by the BMA2 mutant, opening new perspectives in its application.

3. INTRODUCCIÓN

Los β -glucanos son polisacáridos compuestos por unidades de glucosa mediante enlaces β -glucosídicos, y son producidos por una variedad de organismos, incluyendo bacterias, hongos, plantas y algas. Estos polisacáridos tienen una amplia variedad estructural, presentándose en formas lineales o ramificados, además que varían ampliamente en su peso molecular. Existen diferentes propiedades que se les atribuyen a los β -glucanos, como actividad anticancerígena, antioxidante e inmunoestimulante, entre otras, muchas de las cuales está siendo objeto de estudio continuo (Ahmad *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2016).

Actualmente, existen múltiples reportes de caracterizaciones de diversos β -glucanos, en su mayoría de los provenientes en cereales y hongos. Se sabe, por ejemplo, que la mutante BMA2 de *Ustilago maydis* tiene un aumento en la producción de un polisacárido reportado como un β -glucano (Fonseca-García *et al.*, 2011). Además de ello cuenta con un rendimiento competitivo a comparación de otros organismos que también se han utilizado para producir β -glucanos, en algunos casos de una forma comercial (Sánchez-Castillo, 2023). Los hongos pueden ser una fuente importante para obtención de biomoléculas, ya que muchas de ellas se encuentran en su pared celular y suelen estar reguladas por diferentes factores, entre ellos cambios en condiciones de estrés relacionadas al pH, fuentes de carbono o por estimulación con sustancias químicas (Tada *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2020).

Es esencial comprender las propiedades de los β -glucanos por sus múltiples aplicaciones. Por lo cual el objetivo de esta investigación es caracterizar de manera integral los β -glucanos producidos por la mutante BMA2 de *Ustilago maydis*, con el fin de conocer sus propiedades funcionales. Para lograrlo, se evaluó la producción de β -glucanos en condiciones previamente optimizadas (Sánchez-Castillo, 2023), se compararon diferentes métodos de extracción de β -glucanos, y se llevó a cabo su identificación por Espectroscopía de Infrarrojo. Además, se realizaron ensayos de citotoxicidad en la línea de células endoteliales

de vena umbilical humana (HUVEC) y determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Como parte del estudio, adicionalmente se realizó el análisis de la expresión génica durante la producción de β -glucanos, examinando los datos de un microarreglo de la cepa mutante y la cepa silvestre para identificar y enriquecer la ruta de biosíntesis de los β -glucanos (Franco-Frias, 2014).

4. ANTECEDENTES

4.1 ¿Qué son los β - glucanos?

Los β -glucanos son polisacáridos que pueden ser producidos por una gran gama de organismos: hongos, bacterias, plantas, algas e incluso arqueas. Además, se utilizan en gran medida tanto en industrias alimentarias como en la farmacéutica, por mencionar algunas; poseen una excelente lista de propiedades y versatilidad para su uso (Cerletti *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2016). Los β -glucanos están integrados por monómeros de glucosa, los cuales pueden variar en su tamaño. Dentro de los enlaces químicos que integran sus posibles conformaciones, se dividen en dos categorías principalmente, ramificados y lineales. Los β -glucanos a su vez se pueden diferenciar por el tipo de enlace que integra cada unidad de glucosa, algunos con enlace β -(1 $\rightarrow$ 3) y algunos otros con β -(1 $\rightarrow$ 4) o β -(1 $\rightarrow$ 6), lo que resulta en diferentes propiedades (se abordará más adelante) (Caruso *et al.*, 2022).

4.2 Estructura y propiedades fisicoquímicas

Diferentes β -glucanos han sido caracterizados en cuanto a su estructura química; ejemplos de los más estudiados son el lentinano, el curdlan, el esquizofilano y el paramylon. Se pueden clasificar en dos tipos: β -glucanos lineales y β -glucanos ramificados (Figura 1). Por lo tanto, se argumenta que, aunque todos los β -glucanos son similares en el tipo de enlace glicosídico que conecta las moléculas de glucosa, la conformación estructural de los β -glucanos difiere en la longitud de la cadena, la posición de los enlaces glicosídicos, el grado de ramificación y la estructura tridimensional (Cerletti *et al.*, 2021).

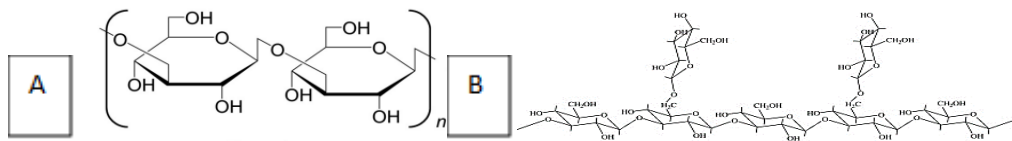


Figura 1. Estructura del lentinano y paramylon. A) Estructura del paramylon un β -(1 $\rightarrow$ 3) lineal aislado de *Euglena gracilix*. B) Estructura del lentinano un β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucano ramificado mediante enlaces β -(1 $\rightarrow$ 6) aislado de *Lentinus edodes* (Gan *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2011).

Las diversas formas estructurales de los β -glucanos determinan las propiedades físicas que presentan lo cual es aprovechado por diversas industrias. A continuación, se presentan algunas de las propiedades físicas más estudiadas hasta la actualidad (Tabla 1).

Tabla 1. Características físicas de β -glucanos producidos por diversas especies.

Fuente (especie)	Nombre y tipo de enlace	Peso molecular y método de determinación	Solubilidad	Ramificaciones	Referencia
<i>Agrobacterium sp.</i>	Curdlan β -(1 $\rightarrow$ 3)	160 kDa Cromatografía de permeación en gel (GPC)	Insoluble	-	(Shih <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aureobasidium pollulas</i>	β -(1 $\rightarrow$ 3)	100 kDa -	Insoluble	Si, β -(1 $\rightarrow$ 6)	(Tada <i>et al.</i> , 2008)
<i>Auricularia polytricha</i>	1,3- β -glucano, 1,4- α -glucano y 1,3- α -glucano	1.20 x 10 ⁶ Da Cromatografía de filtración en gel	-	-	(Song & Du, 2012)
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Botryosphaeran β -(1 $\rightarrow$ 3)	4850 kDa -	Escasamente soluble	Si, β -(1 $\rightarrow$ 6)	(Selbmann <i>et al.</i> , 2003)
<i>Eisenia bicyclis</i>	Laminaria β -(1 $\rightarrow$ 3) y 1, 6	12.6 kDa Cromatografía de filtración en gel	-	Algunas ramificadas	(Kim & Park, 2006).
<i>Euglena gracilix</i>	Paramylon β -(1 $\rightarrow$ 3)	500 kDa -	Insoluble	Lineal	(Bhattad <i>et al.</i> , 2021)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Gl-1 β -(1 $\rightarrow$ 3)	9.3 kDa Cromatografía en columna	Insoluble	Lineal	(Han <i>et al.</i> , 2008)
<i>Lentinula edodes</i>	Lentinano β -(1 $\rightarrow$ 3)	500 kDa (LCMS-QTOF)	Soluble	Si, β -(1 $\rightarrow$ 3) y 1, 6	(Mohd-Jamil <i>et al.</i> , 2013)
<i>Schizopohyllum commune</i>	Esquizofilano β -(1 $\rightarrow$ 3) y 1, 6	37 x 10 ⁴ g/mol Cromatografía en columna en gel	Soluble	Si	(Mohammadi <i>et al.</i> , 2018)

4.2.1 Longitud de cadena y peso molecular

Los β -glucanos son polisacáridos que pueden variar significativamente en cuanto a su peso molecular, lo cual está estrechamente relacionado con la longitud de cadena de glucosa. Diversas investigaciones se han enfocado a determinar el peso molecular, lo cual es una forma de extrapolar a las unidades de glucosa, por lo general tienen un rango que se encuentra desde los 10 Daltons (Da) hasta >1100

kiloDaltons (kDa) (Abd-El-Ghany *et al.*, 2016; Karficsonyi & Kuniak, 1994). Lo cual nos refleja amplias diferencias entre ellas.

Aunque los métodos para determinar el peso molecular en las moléculas de β -glucano han sido variados, la mayoría son cromatografía de permeación en gel, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (Song & Du, 2010; Song & Du, 2012; Shih *et al.*, 2009).

Además, se sabe que el peso molecular puede ser influido por diversos factores, entre ellos, los métodos de extracción utilizados. Esto se debe a que las cadenas de los β -glucanos pueden alterarse, disminuyendo la cantidad de unidades de glucosa. Como señala Izydorczyk y colaboradores (2000), se realizan constantemente investigaciones para analizarlas. En sus investigaciones, la introducción de enzimas (proteasa y esterasa) durante la extracción y/o la aplicación de tratamientos físicos demostraron aumentar la extractabilidad y mejorar sustancialmente en su peso molecular.

Por lo cual, al evaluar y comparar valores de peso molecular, todos estos factores se deben tomar en cuenta. Sin embargo, como señaló Vetter (2023) en su revisión sobre el estudio de β -glucanos, el efecto biológico de los glucanos con mayor peso molecular suele ser mayor. Además de que se ha observado que existen diferencias significativas en la solubilidad de los β -glucanos según el método de extracción utilizado (Liu *et al.*, 2021).

4.2.2 Puntos de ramificación

La mayoría de los β -glucanos tienen una cadena base que contiene unidades de glucosa unidos mediante enlaces β -(1 $\rightarrow$ 3), sin embargo, también existen con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4) y β -(1 $\rightarrow$ 6). Es esencial comprender la estructura de los β -glucanos, ya que esta característica afecta directamente en su actividad inmunomoduladora (Pérez-Bassart *et al.*, 2023).

Las ramificaciones de los β -glucanos suelen estar presentes mediante enlaces de tipo β -(1 $\rightarrow$ 6) que contienen cadenas laterales unidas a la cadena base. Se tienen reportes de β -glucanos que cuentan con este tipo de ramificaciones, un ejemplo

muy conocido es botrysphaeran que es producido por *Botryosphaeria rhodina* el cual se ha observado que contiene ramificaciones mediante enlaces β -(1 $\rightarrow$ 6), no obstante, algunas de las cepas también producen β -glucano de tipo lineal (Giese *et al.*, 2008). Otros ejemplos de β -glucano con ramificaciones en el β -(1 $\rightarrow$ 6) es *Aureobasidium pollulas* y *Auricularia polytricha* (Song & Du, 2010; Tada *et al.*, 2008).

También existen reportes de polisacáridos compuestos por glucosa unidas por enlaces β -(1 $\rightarrow$ 6) con ramificaciones β -(1 $\rightarrow$ 4) producidos por *Calocybe gambosa* que además se ha demostrado que exhiben una conformación helicoidal de triple hebra (Villares, 2013).

En resumen, la presencia y ubicación de los puntos de ramificación son características cruciales que influyen en su actividad biológica y sus propiedades funcionales, como se mencionará más adelante. Por lo tanto, es esencial comprender la estructura molecular de los β -glucanos que se deseen estudiar, para así explorar su potencial biológico y sus aplicaciones.

4.2.3 Conformación estructural

Los β -glucanos pueden exhibir diferentes conformaciones estructurales, entre ellas espirales aleatorias, formas similares a varilla, agregados y hélices simples, dobles y triples, como se ha revisado anteriormente (Du *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2023; Kaur *et al.*, 2020).

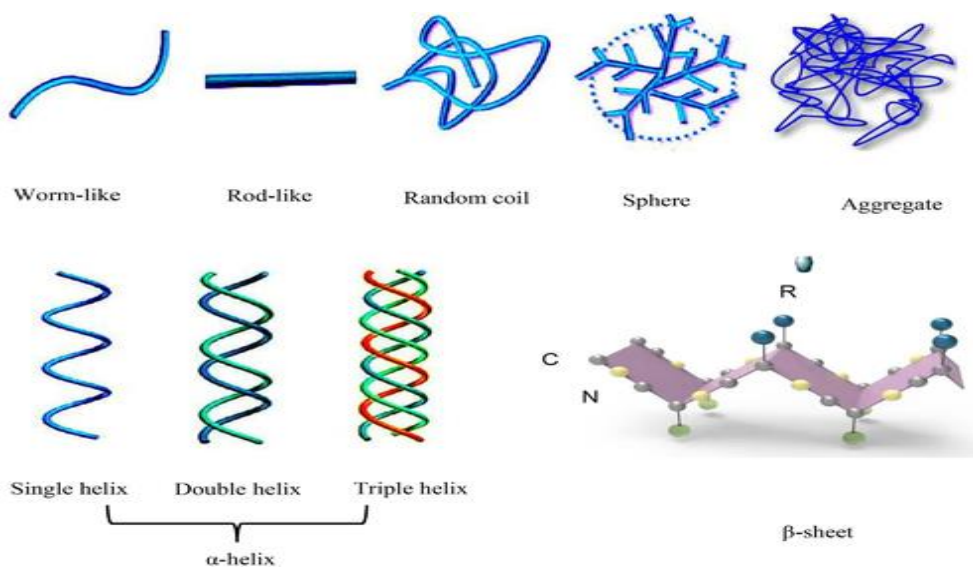


Figura 2. Conformaciones estructurales de diferentes polisacáridos. Obtenida de Du *et al.*, 2020.

Desde la década de 1970 se estudian las conformaciones de los β -glucanos, Saitô y colaboradores (1979) examinaron la estructura de los lentinano y esquizofilano (β -glucanos ramificados) utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C . Y encontraron que estos β -glucanos presentan una mayor reticulación en comparación con los lineales, la reticulación se da los polímeros cuando sus cadenas tridimensionales se unen y forman una red. La transición de gel con hidróxido de sodio condujo a la conversión de formas helicoidales a espirales aleatorias, rompiendo los enlaces cruzados físicos. También hay numerosos informes que respaldan la existencia de diferentes conformaciones moleculares en los β -glucanos (Falch *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2017).

Hay transiciones según el medio en que se disuelva, uno de ellos estudiando el β -(1 $\rightarrow$ 3)-d-glucano con ramificaciones β -(1 $\rightarrow$ 6) de *Aurebasidium pollulans* se descubrió que forma una triple hélice en agua y una estructura aleatoria en DMSO. Esta transición es reversible en mezclas DMSO con más del 30% de H_2O , además de que comprobaron que la frecuencia de la cadena lateral β -(1 $\rightarrow$ 6) impacta la estabilidad y estructura de los β -glucanos (Kono *et al.*, 2020).

Asimismo, se ha destacado la importancia de determinar la conformación molecular en los polímeros, en el estudio realizado por Zang y colaboradores (2005) revela que el lentinano de *Lentinus edodes* adopta una estructura de triple hélice en soluciones acuosas de NaCl, lo cual encontraron que se correlaciona significativamente con el aumento de su actividad antitumoral probado *in vivo* e *in vitro*. De manera similar Hematian-Sourki y Hesarinejad (2023) evaluaron las propiedades de soluciones diluidas de β -glucano de cebada (BBG) en presencia de varios factores, incluyendo temperatura, pH, sales solubles y sacarosa. Se descubrió que la estructura de BBG permanece estable en soluciones diluidas y se ajusta aproximadamente a una conformación de espiral aleatoria. Los resultados muestran que el BBG tiene un alto grado de flexibilidad en diversas condiciones ambientales, lo que lo convierte en un espesante natural adecuado para alimentos líquidos.

4.2.4 Solubilidad

El término solubilidad se utiliza para expresar cuando una sustancia tiene la capacidad para disolverse en otra, a menudo llamada disolvente. El β -glucano puede ser soluble o insoluble en agua. Los estudios muestran que la solubilidad del β -glucano está significativamente relacionada con la longitud de la cadena de glucosa y el número de ramas en la estructura molecular.

Estudios anteriores informaron que el β -glucano de avena con un peso molecular entre 2.42×10^5 g/mol y 1.61×10^5 g/mol tiene la mayor solubilidad en agua, a comparación de los β -glucano con alto peso molecular (6.87×10^5 g/mol) (Kim y White, 2011). Los β -glucanos con cadenas más largas y ramificadas tienden a ser menos solubles en agua porque estas propiedades hacen que las moléculas se peguen en una estructura más compacta y les resulte más difícil entrar en contacto con el agua. Estas ramas interfieren con la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua el β -glucano, reduciendo así la solubilidad de la molécula.

Además, se ha reportado que la modificación química del β -glucano, por ejemplo, la sulfatación, la cual combina grupos iónicos fragmentando el β -

glucano provoca una disminución del peso molecular de 130.000 a 68.000 g/mol y un aumento de la solubilidad (Chang *et al.*, 2006).

4.3 Propiedades biotecnológicas de los β -glucanos

Los β -glucanos han demostrado ser importantes biotecnológicamente tanto por sus propiedades fisicoquímicas como por sus propiedades biológicas, las cuales han sido documentadas a lo largo del tiempo (Tabla 2). Esto ha dado lugar a muchas aplicaciones diferentes en industrias como la alimentaria y la farmacéutica. Dentro de la industria alimentaria, en particular, se aprovechan sus propiedades gelificantes, utilizándolos como hidrocoloides, para aumentar la viscosidad de soluciones o gelificante en procesos alimentarios (Izydorczyk & Dexter, 2008).

Tabla 2. Propiedades funcionales de los β -glucanos según su origen.

Origen	Tipo de β -glucano	Propiedades funcionales	Referencia
Hongos	Cadena principal β -(1 $\rightarrow$ 3) con ramificaciones en el β -(1 $\rightarrow$ 6) (otros en el β -(1 $\rightarrow$ 4)) Algunos lineales*	Actividades anticancerígenas e inmunostimulantes, material gelificante, principalmente	Vannucci <i>et al.</i> , 2017
Cereales	Lineales con la cadena unida mediante β -(1 $\rightarrow$ 3/4)	Reductor de niveles de glucosa y colesterol en sangre, prevención de enfermedades coronarias y diabetes.	Lazaridou & Biliaderis, 2007
Bacteria	Lineales con la cadena unida mediante β -(1 $\rightarrow$ 3)	Actividad antimicrobiana, antioxidante, material gelificante y vehículo de fármacos.	Abd-El-Ghany <i>et al.</i> 2016; Shih <i>et al.</i> , 2009

En cuanto a lo relacionado con la medicina se conoce una amplia gama de beneficios por parte de los β -glucanos, posee principalmente propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas. Diversos estudios han mostrado como al evaluar los efectos de la suplementación con β -glucano tiene efectos positivos en la salud (Basso *et al.*, 2020; Fuller *et al.*, 2017; Jang *et al.*, 2023; Jenny *et al.*, 2014; Majtan & Jesenak, 2018; Novak & Vetvicka, 2009; Richter *et al.*, 2015). En el mercado ya se encuentran disponibles productos a

base de β -glucanos como por ejemplo el producto alimenticio Yestimun®, que es un β -glucano ramificado β -> 1,3/ 1,6 obtenido de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Stier *et al.*, 2014).

En estudios como el de Junior y colaboradores (2024) se ha informado el uso exitoso de BionutriAR1®, mostrando mejoras significativas en el estado nutricional de los pacientes durante tratamientos. Este nutracéutico fermentado, rico en β -glucanos con enlaces β -> 1,3/ 1,6, aminoácidos, vitaminas y minerales se presenta como una prometedora opción de suplemento. Por otro lado, se destaca la importancia de profundizar en el mecanismo de acción de los β -glucanos, así como realizar ensayos que aborden la seguridad del consumo de estos productos, según lo señalado por Markovina y colaboradores (2020).

4.3.1 Efectos de β -glucanos en la producción de citocinas, reducción de ROS y citotoxicidad

Los β -glucanos proporcionan efectos biológicos variados como se ha mencionado antes. Esto debido a que son capaces de activar la inmunidad innata, por medio de receptores específicos de β -glucano (Batbayar *et al.*, 2012). Dentro de los efectos biológicos más estudiados se encuentra la producción de citocinas, las cuales son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares y mediadores críticos de la comunicación del sistema inmunológico (O'Shea *et al.*, 2019).

Se ha descrito que el β -glucano de *S. cerevisiae* es un antioxidante en células RAW264.7, aumentando la regulación negativa de la hemooxigenasa intracelular, la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Yu *et al.*, 2021). Se ha determinado en múltiples estudios la capacidad significativa de eliminación de radicales libres por parte de los β -glucanos (Khan *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2017; Reyes-Becerril *et al.*, 2020).

A menudo se busca que moléculas como los β -glucanos sean seguros de administrar, para lo cual en muchas ocasiones se realizan ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad. Por ejemplos, el β -glucano de *S. cerevisiae* en células

CHO-k1 y CHO-xrs5 demostró que no tiene un efecto genotóxico, ni antigénico; en las pruebas de viabilidad celular se determinó que el glucano preserva la viabilidad celular (Oliveira *et al.*, 2007).

Los β -glucanos también tienen un papel importante en la inhibición de la proliferación tumoral. El β -glucano de avena (de bajo peso molecular) en dos líneas celulares de cáncer de pulmón (A549 y H69AR) causó una ligera disminución en la viabilidad celular (~80%), mientras que en células HaCaT normales no demostró efecto citotóxico (Choromanska *et al.*, 2018). Un β -glucano de avena de baja masa molecular afectó la autofagia y la apoptosis en las primeras etapas de la carcinogénesis colorrectal inducida en ratas (Kopiasz *et al.*, 2024). Es así como se ha reportado actividad anticancerígena para diferentes tipos de cáncer y ninguna toxicidad al menos para queratinocitos humanos normales; la mayoría de los estudios se basan en ensayos MTT que se usa para medir la actividad metabólica celular como indicador de viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular (Choromanska *et al.*, 2015).

4.4 Producción de β -glucanos

Desde la década de 1940 se inició con los estudios acerca de los β -glucanos. Las primeras producciones comerciales se llevaron a cabo a partir del cultivo de hongos, bacterias, levaduras y plantas. Muchos de estos productos están patentados en sus procesos de fabricación (ver Tabla 3), mientras que otros ejemplos se encuentran documentados solo en artículos de investigación (Qu *et al.*, 2021; Tekin-Cakmak *et al.*, 2024; Ungureanu-Iuga y Avrămia, 2024; Wan y Xu, 2018). Cabe destacar que actualmente el interés por este tipo de biomoléculas está aumentando, lo que lleva a que se busquen mejores rendimientos en su producción, así como procesos optimizados para la extracción y su purificación.

Tabla 3. Patentes de β -Glucanos: origen, producción, purificación y procesamiento.

B-glucano	Organismo	Patente
Curdlan	<i>Agrobacterium spp.</i>	毛自朝 <i>et al.</i> , 2012.
Lentinano	<i>Lentinus edodes</i>	Wieser <i>et al.</i> , 2016.
Schizophylano	<i>Schizophyllum commune</i>	Velebný <i>et al.</i> , 2008.
GI-I	<i>Ganoderma lucidum</i>	张佳婵 <i>et al.</i> , 2020.
Paramylon	<i>Euglena gracilix</i>	Ruppel <i>et al.</i> , 2000.

Existen diversas bacterias que se han considerado productoras de β -glucanos, una de las más estudiadas es *Agrobacterium spp.* la cual produce curdlan, un β -glucano con enlace en su cadena principal β -(1 $\rightarrow$ 3) (Li *et al.*, 2023; Shih *et al.*, 2009). En términos del método de producción más prevalente, se emplea fermentación sumergida, logrando rendimientos de hasta 5.02 g/L, destacando que la relevancia de esta producción tiende a ocurrir en condiciones de limitaciones de oxígeno (Aquinas *et al.*, 2022; Shih *et al.*, 2009). Otra especie que también produce un β -glucano de tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) es *Pediococcus parvulus*, el cual tiene una estructura de hélice y su producción se da a un pH óptimo de 6 (AbdEl-Ghany *et al.*, 2016). La mayoría de las bacterias que producen glucanos son con enlaces de tipo β , sin embargo, especies como *Rhizobium punsense*, produce una combinación de glucanos con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 3) y α -(1 $\rightarrow$ 3) los cuales son de alto peso molecular (~750 kDa) (Zhang *et al.*, 2022).

Los β -glucanos producidos por hongos tienen una marcada predominancia, ya que se encuentran en abundancia en la pared celular. Además de las numerosas especies mencionadas, se destacan *Candida albicans*, *Eisenia bicyclis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune*, entre otras (Vetter, 2023). Algunos de ellos son producidos mediante fermentador de tanque agitado y air-lift, como el caso de *G. lucidum* con rendimientos de ~4 g/L a un pH óptimo de 4.5 (Han *et al.*, 2008). En otros casos, se emplea el cultivo sumergido o en estado sólido, con ocurre en la fermentación de *S. commune* con rendimientos de 9.97 g/L (Mohammadi *et al.*, 2018).

Los medios de cultivo utilizados para las fermentaciones varían sustancialmente en el pH del medio, lo cual puede influir en los rendimientos. La suplementación con ciertos compuestos puede aumentar la producción de β -glucanos en algunas especies. Por ejemplo, en la fermentación de *A. pollulas*, cuando al medio se le agrega sulfato de zinc se dio la producción máxima (Tada *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2020).

Por otro lado, se ha intentado producir β -glucano de forma sostenible a partir de residuos industriales. Bzducha-Wróbel y colaboradores (2015) informaron que el agua de jugo de papa desproteinado (DPJW) junto con glicerol promovieron la biosíntesis de β -glucano de pared celular en *Candida utilis* ATCC 9950, observando un aumento de β -glucanos (aproximadamente del 44- 45%). Asimismo, existen revisiones que investigan cómo se pueden aprovechar los residuos para producir β -glucanos de manera sostenible (Murphy *et al.*, 2023).

4.4.1 Producción de β -glucanos en *Ustilago maydis*

Se tienen registros de una larga lista de hongos utilizados en la producción de β -glucanos, que varían principalmente en el rendimiento del biopolímero (Han *et al.*, 2008; Kim & Park, 2006; Smiderle *et al.*, 2006; Tada *et al.*, 2008). *U. maydis* es un hongo biotrófico y dimórfico que pertenece a los Basidiomycota, algo destacable es su dimorfismo de transición de levadura a filamento durante su ciclo de vida o debido a cambios en las condiciones de laboratorio como el contenido del medio y el pH (Olicón-Hernández *et al.*, 2019). Ha sido modelo de diversas investigaciones biotecnológicas debido a sus características particulares y su capacidad para producir metabolitos de interés.

Desde hace algunos años se reportó la cepa BMA2 de *U. maydis*, con una mutación nula del gen rim101 presentaba un fenotipo anormal en varios sentidos, por ejemplo, en la morfología celular, en la secreción de proteínas, hipersensibilidad a algunos iones y al incremento en la secreción de polisacáridos (Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005). Posteriormente, se descubrió que el polisacárido que es secretado por la cepa BMA2 de *U. maydis* es un β -glucano (Fonseca-García *et al.*, 2011).

En el grupo de trabajo recientemente se buscó optimizar la producción del biopolímero, reportando producciones de 16 mg/mL cuando se modificó la fuente de nitrógeno a urea y la fuente de carbono a dextrosa a un pH6 (Sánchez-Castillo, 2023). Comparado con otras fuentes de β -glucano, se cuenta con rendimientos competitivos (Mohammadi *et al.*, 2018).

En este contexto, el estudio de la producción de β -glucanos en *U. maydis* adquiere relevancia, además se abre la puerta a aplicaciones innovadoras en diversos campos, desde la medicina hasta la industria. Por lo tanto, la evaluación continua de la producción de β -glucanos en *U. maydis* representa un paso crucial hacia el aprovechamiento máximo de su potencial biotecnológico.

4.6 Métodos de extracción de B-glucanos

Existen diversos métodos de extracción de β -glucanos, entre los más utilizados son la extracción con agua caliente, extracción con hidróxido de sodio y extracción con ácido. Exhibiendo ventajas según el método utilizado, como mayor rendimiento de polisacáridos, tiempos más cortos, entre otras (Ver Tabla 4) (Tang y Huang, 2022).

Tabla 4. Comparación de ventajas y desventajas del método de extracción única (adaptado de Wang *et al.*, 2023).

Método	Ventaja	Desventaja
Extracción con agua caliente (HWE)	Simple y conveniente, no necesita otros equipos auxiliares, materiales fáciles de transportar, etc.	Fácil de verse afectado por el tiempo de extracción, la temperatura y la proporción de agua a materias primas. El tiempo de extracción es largo y requiere muchas veces, y la precipitación del polisacárido crudo requiere una gran cantidad de etanol (4 a 10 veces). Solo puede extraer polisacáridos extracelulares, no puede destruir la pared celular de la planta ni la membrana plasmática. Baja tasa de extracción: a alta temperatura, el polisacárido se degrada fácilmente, lo que

		resulta en una eficiencia de extracción deficiente.
Método de extracción asistida por enzimas (EAM)	Las enzimas se caracterizan por su especificidad y selectividad. Alta eficiencia de extracción, separación y purificación simples, mayor actividad de polisacárido, alta compatibilidad de reacción y condiciones de reacción suaves. Fácil de operar, protección ambiental ecológica, reduce el uso de reactivos químicos, propicio para la utilización de recursos y mejora ambiental, bajo costo de inversión y consumo de energía.	El alto precio de la enzima limita su aplicación a gran escala. Varios factores, como la concentración de enzimas, la temperatura de extracción y el valor del pH, también afectan la función biológica de los polisacáridos.
Extracción asistida por microondas (MAE)	Tiene las características de alta permeabilidad y selectividad, menos tiempo, pequeña demanda de solvente y bajo consumo de energía. Económico y factible, ahorra tiempo, protección del medio ambiente.	El consumo de energía es grande, la potencia del microondas es ligeramente mayor y es fácil producir carbonización y destruir la estructura de los polisacáridos.
Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)	Mejora la permeabilidad y el efecto capilar. El tiempo de extracción de los polisacáridos se puede acortar significativamente con menos impurezas, lo que significa los pasos posteriores al procesamiento. Se producirá un efecto de calor en el procesamiento en el ultrasonido, aumentando la solubilidad de los ingredientes activos.	La estructura y el peso molecular de los polisacáridos se vieron afectados, lo que provocó un cambio en la actividad biológica.

Con el auge de las investigaciones de β -glucanos se han propuesto métodos de extracción más avanzados, como la extracción asistida por ultrasonido, extracción enzimática, extracción con membranas de ultrafiltración, microondas, etcétera.

Se ha buscado optimizar las metodologías de extracción de polisacáridos con el fin de mejorar rendimientos. Li y colaboradores (2023b) aplicaron la metodología de superficie de respuesta (RSM) para optimizar la extracción asistida por ultrasonido del polisacárido de *Ginkgo biloba* (GBLP), las condiciones óptimas fueron una proporción líquido-material de 30 mL/g, potencia ultrasónica de 340 W y tiempo de extracción de 50 min, obteniendo un rendimiento del 5,37 % de GBLP.

Asimismo, se puede utilizar una combinación de métodos de extracción con el fin de mejorar los resultados en muchos estudios. En algunos casos, los polisacáridos se extraen combinando la extracción asistida por ultrasonido y la extracción asistida por microondas (Wang *et al.*, 2023).

Igualmente se ha buscado la extracción de polisacáridos en general, se ha presentado un método novedoso para la extracción de polisacáridos sulfatados utilizando un sistema acuoso de dos fases (ATPS). Empleando una fase rica en polímero para extraer los polisacáridos sulfatados de una mezcla de polisacáridos modelo y luego se utilizó otro ATPS para retroextraerlos a una fase salina. Se lograron eficiencias de extracción y retroextracción significativas, especialmente con el ATPS de tartrato de sodio/PEG1000 (Du *et al.*, 2018).

4.8 Biosíntesis de β -glucanos y regulación metabólica

Los β -glucanos se encuentran de forma natural en la pared celular de bacterias, hongos y algunas plantas, la biosíntesis del glucano a nivel molecular se conoce que se ve involucrada principalmente la β -glucano sintetasa (β -GS). El conocimiento de la ruta de biosíntesis de β -glucano aún se sigue estudiando, sumándole todas las diferencias que existen en las características estructurales. En el reino fungí se ha reportado que el principal precursor de los β -glucanos es la glucosa de difosfato de uridina (UDPG) (Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2003). La proteína encargada de la síntesis es la β -1,3-glucano sintasa FKS (FKS) que transfiere glucosa de la UDP-glucosa donante a la cadena en crecimiento de glucano a través de enlaces β -1,3-glucosídicos y transloca el β -1,3-glucano polimerizado al espacio extracelular (Hu *et al.*, 2023).

Además, se tiene reporte que intervienen GTPasas como reguladores, por ejemplo, en *Sacharomyces cerevisiae* la GTPasa Rho1 activa (PKC) es primordial para que la FKS funcione (Wagener *et al.*, 2020). A su vez se ven involucrados factores externos, entre ellos el estrés, que en muchos hongos y bacterias se conoce que está regulado por *quorum sensing* (Padder *et al.*, 2018).

Como se ha reportado con anterioridad por Jendretzki y colaboradores (2011) diversas vías de señalización que son específicas para la integridad de la pared celular y por ende se encargan de remodelar la pared celular cuando se requiere (por ejemplo, condiciones de estrés); esta señalización inicia con los receptores de membrana de tipo Wsc y Mid que luego activan una cascada de señalización mediada por las MAPK quinasas.

También se han encontrado homólogos de Rho en muchas especies de hongos, por ejemplo, en *U. maydis*, relacionándolo de igual manera con el crecimiento, integridad de la pared celular y biosíntesis de polisacáridos. Las histidinas quinasa (HK) funcionan como parte de un mecanismo de transducción de señales, en *Paracoccidioides brasiliensis* se tiene registro que una HK denominada DRK1 modula la expresión de componentes de la pared celular, por ejemplo, el α -glucano y el β -glucano que le asegura al organismo la supervivencia fúngica en el entorno del huésped (Navarro *et al.*, 2021). Aún queda mucho por conocer acerca de la ruta que se da para la biosíntesis de β -glucanos.

4.9 Importancia del mercado

Debido a todas las propiedades físicas como a los efectos biológicos que pueden tener los β -glucanos, es notorio que existen muchas ventajas nutricionales y reológicas a la industria alimentaria y a la industria de la salud (Brennan & Cleary, 2005). Por lo cual no existe duda que tengan importancia en el mercado, de hecho, el interés relacionado a ellos no solo está basado en las propiedades nutricionales sino en la optimización del procesamiento de alimentos, significando un valor agregado a los que los contienen (Brennan & Cleary, 2005).

En cuanto a la industria del área médica han surgido múltiples estudios de su uso en tratamiento a enfermedades o como suplemento. Aunque algunas de las propiedades más mencionadas son la capacidad anticancerígena y antioxidante, existen muchas más por lo que los β -glucanos se postulan como sustancias prometedoras de las cuales se requerirá mayor producción.

Están surgiendo estudios de pacientes sometidos a quimioterapia que reciben dosis de β -glucanos y tienen resultados favorables (Mantovani *et al.*, 2008). Existen otros aspectos a destacar que no se mencionan con frecuencia como su posible futuro uso para estimular la respuesta de defensa de las plantas. Se comprobó que con el uso de un β -glucano se presentó fortalecimiento del suelo residual y una reducción en el impacto ambiental ofreciendo así una competitividad económica sobre otros tratamientos de cemento ordinarios (Chang & Cho, 2012). Mordor intelligence (2024) reporta un volumen de 602.54 millones de dólares para el 2024 y una aproximación para el 2029 de 881.64 millones de dólares, por lo tanto, se sugiere a los β -glucanos como una línea prometedora para desarrollar en mercado.

5 JUSTIFICACIÓN

Es importante la caracterización integral del β -glucano secretado por la mutante BMA2 de *U. maydis* para comprender sus propiedades funcionales. Los β -glucanos son polisacáridos con una gran variedad de estructuras y características de importancia en muchas industrias. Dada la necesidad de fuentes eficientes de producción de glucanos, se busca analizar como plataforma de producción a la mutante BMA2, principalmente por su extraordinaria producción en g/L de polisacárido. A su vez el análisis de la regulación genómica y algunas de las tantas propiedades funcionales del β -glucano, permitió establecer un estudio integral para así sentar bases de una posible plataforma de producción comercial a futuro.

6 HIPÓTESIS

Se postula que la mutante BMA2 de *Ustilago maydis* puede producir β -glucanos con propiedades funcionales beneficiosas que afectan procesos biológicos como la inmunoregulación y la reducción del estrés oxidativo. Se esperan diferencias al comparar los métodos de extracción en cuanto al rendimiento del β -glucano.

7 OBJETIVO DEL TRABAJO

7.1 Objetivo general

Producir, identificar y evaluar funcionalmente β -glucanos de la cepa BMA2 de *U. maydis*.

7.2 Objetivos particulares

- Determinar la tasa de producción de β -glucanos en la mutante BMA2 de *U. maydis* en condiciones controladas y estudiar la expresión génica asociada durante el proceso de producción.
- Identificar los β -glucanos producidos por la mutante BMA2 por medio de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).
- Identificar y comparar los β -glucanos obtenidos de diferentes métodos de extracción: agua fría, agua caliente, a presión y alcalina.
- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* del β -glucano a diferentes concentraciones.
- Investigar el efecto *in vitro* del β -glucano en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) para evaluar su capacidad antioxidante y para reducir el estrés oxidativo.
- Realizar análisis *in vitro* de citocinas proinflamatorias con ensayos basados en perlas de citometría de flujo a partir del tratamiento de β -glucano.

8 MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Ubicación

El proyecto se llevó a cabo en la Unidad de Manipulación Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

8.2 Cepas utilizadas

En este estudio se utilizaron las siguientes cepas: *Ustilago maydis* cepa tipo mutante BMA2 [a2b2 Δ rim101::hyg (Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005)] y la cepa silvestre FB2(Bannuet & Herskowitz, 1989). Proporcionadas por la Unidad de Manipulación Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las cepas fueron conservadas en glicerol al 50% (v/v) a -70°C, cuando se utilizaron fueron activadas en medios completos (MC) (ver más adelante) (Holliday, 1961).

8.3 Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de la mutante de *Ustilago maydis*

8.3.1 Elementos traza de *U. maydis* (Holliday, 1961)

Los elementos traza de *U. maydis* se prepararon con 60 mg de H₃BO₃, 140 mg de MnCl₂ 4(H₂O), 400 mg de ZnCl₂, 40 mg de Na₂MoO₄ 2(H₂O), 100 mg de FeCl₃ 6(H₂O), 400 mg de CuSO₄ 5(H₂O). Todo ello disuelto en 1 L de agua destilada y esterilizado en autoclave.

8.3.2 Solución de sales de *U. maydis* (Holliday, 1961)

Se preparó con 16 g de KH₂PO₄, 4 g de NaSO₄, 8 g de KCl, 2 g de MgSO₄, 1 g de CaCl₂ y 8 mL de elementos traza. Disuelto en 1 L de agua destilada y esterilizado en autoclave.

8.3.3 Medio completo (MC) (Holliday, 1961)

Se preparó con 2.5 g de caseína hidrolizada, 10 g de extracto de levadura, 1.5 g de nitrato de amonio, 62.5 mL de solución de sales de *U. maydis*, se llevó el pH a 7 y a un volumen total de 500 mL con agua destilada. En 500 mL de agua

destilada se esterilizaron 10 g de glucosa. Ambas soluciones por separado se ingresaron a la autoclave y luego se mezclaron antes de utilizarse.

8.3.4 Medio Mínimo pH7 (MM7)

Se preparó con 10 g de glucosa, 3 g de nitrato de potasio, 62.5 mL de solución de sales de *U. maydis*; agua destilada, hasta 1 L. El pH se llevó a 7.2 con NaOH 2N.

8.3.5 Medio Mínimo Modificado 1L (Sánchez-Castillo, 2023).

Se preparó con 1.78 g de urea, 62.5 mL de solución de sales y 10 g de dextrosa, para 1L de agua destilada todo ajustado a pH 6.2 y esterilizado en autoclave.

8.4 Producción de β -glucanos

8.4.1 Cultivo del inóculo

Se cultivó la cepa BMA2 de *U. maydis* en Medio Completo durante 12 h a 28° C a 180 rpm. Previo a la inoculación, se sometieron las células a estrés nutritivo, para lo cual se realizaron dos lavados con agua centrifugando a 5000 rmp durante 10 min, al final se resuspendieron las células en agua desionizada estéril y se incubaron a 28°C durante 1.5 h. La concentración del inóculo se determinó contando el número de células en una cámara de Neubauer. Se utilizó una concentración de 1×10^5 células/mL, para inocular en medio mínimo modificado.

8.4.2 Producción de β -glucano nivel matraz

En matraz Erlenmeyer de 250 mL se prepararon 50 mL de medio mínimo modificado, y fueron inoculados posteriormente utilizando una concentración de 1×10^5 células/mL. Las condiciones de cultivo fueron mantenidas constantes a 28° C a 180 rmp durante 2 d. Para la cinética de crecimiento se tomaron alícuotas cada dos horas, partiendo de la hora cero y fue determinada la absorbancia de los cultivos por medio de un espectrofotómetro (BioMate™ 3 UV-Visible, Thermo Electron Scientific Instrument Corporation). Durante la cinética se comprobó por medio de microscopia que los cultivos no estuvieran contaminados. A su vez se conservaron 600 μ L cada 8 h para determinar la concentración de β -glucano.

8.4.3 Cuantificación de β -glucano y glucosa por métodos colorimétricos

A todas las muestras se les realizó extracción de β -glucano mediante una centrifugación a 5000 rpm para eliminar las células y una precipitación con 3:1 volúmenes de etanol absoluto: agua durante toda la noche. Luego se recuperó el precipitado y fue secado en la estufa a 60°C hasta obtener pesos constantes.

8.5 Extracción de β -glucanos

Para la extracción de β -glucanos se utilizaron los siguientes métodos posterior a descartar las células por medio de centrifugación del medio a 6000 rpm durante 20 min.

8.5.1 Extracción con agua caliente (modificado de Benito-Román *et al.*, 2013).

Se mantienen en baño de agua a 100°C durante 60 min, todo se agita rigurosamente a los 15, 30, 45 y 60 min.

8.5.2 Extracción a presión con vapor (Sakdasri *et al.*, 2022).

Se someten las muestras a 120°C durante 15 min a 1 atm (15 psi).

8.5.3 Extracción con álcali (modificado de Zechner-Krpan *et al.*, 2010).

Al sobrenadante se le agrega una solución de hidróxido de sodio al 1M en una relación 1: 3 v/v y se mantiene a 55°C durante 2.5 h. Posteriormente después de aplicar los tratamientos se precipita con etanol absoluto con una relación 1: 3 v/v durante 24 h y se centrifuga durante 20 min a 6000 rpm, luego se descartó el sobrenadante y fue secado en el horno a 35°C hasta obtener un peso constante.

8.6 Identificación de β -glucanos

8.6.1 Estructura

8.6.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo

Las muestras se analizaron utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo modelo Frontier (FT-IR) equipado con una celda de reflectancia total atenuada (ATR) de la firma Perkin Elmer. Los espectros se generaron en un rango de números de onda de 4000- 600 cm^{-1} en 64 escaneos con una resolución de 4 cm^{-1} . Los datos

generados fueron corregidos en su línea base, suavizados y normalizados. Como estándar se utilizó β -D-glucano $\geq 95\%$ (HPLC) (SIGMA-ALDRICH, No. de catálogo: G6513).

8.7 Análisis de la ruta de biosíntesis de β -glucanos

8.7.1 Datos

Los datos utilizados fueron proporcionados de un estudio previo del mismo grupo de trabajo. Citando a Franco-Frias (2014), los datos fueron generados a partir del procesamiento de una muestra de ARN extraída de la cepa silvestre FB2 y la cepa mutante BMA2 de *U. maydis*. Se cultivo en medio mínimo a pH 7, las células se prepararon utilizando un método de miceliación (para más detalles revisar la cita). Posteriormente de la preparación se realizó la extracción de ARN, se digirió con DNAsas para eliminar contaminación. Para las micromatrices se usó el servicio externo de Nimblegene Technologies de Roche, los datos los analizaron con el programa Arraystar V.5. A partir de estos datos se realizó la metodología que se explica a continuación.

8.7.2 Perfiles de expresión génica

8.7.2.1 Identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs)

8.7.2.2 Análisis de vías biológicas

El análisis de las Vías Biológicas fue realizado en g:Profiler (Kolberg *et al.*, 2020), en el cual se realizó el enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados que tenían un Foldchange >2 . El Foldchange es una medida que se utiliza para comparar la expresión génica en dos grupos diferentes (o condiciones), con lo cual se indica si la expresión de x gen es mayor, menor o igual en el grupo 1 con respecto al grupo 2 (ejemplo FB2 vs. BMA2). Se realizó un enriquecimiento en términos de biología, vías, funciones y ontologías.

8.7.3 Predicción de la ubicación subcelular

Se realizó enDeepLoc - 2.1 de los servicios y herramientas bioinformáticas de Danmarks Tekniske Universitet (Thumhuri *et al.*, 2022), prediciendo la

ubicación subcelular de las proteínas que están involucradas en el metabolismo de polisacáridos que estaban sobreexpresados.

8.8 Evaluación funcional de β -glucanos

8.8.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico-antimicótico (anti-anti, 100X) (Gibco Life Technologies, No. de catálogo 11320033) Las células se mantuvieron en una incubadora con 5% de CO₂, 50% de humedad relativa (HR) y 37 °C (incubadora de CO₂, Forma™ Steri-CultIM, Thermo Fisher Scientific).

8.8.2 Pruebas de citotoxicidad *in vitro* (modificado de Romero-Jiménez, 2023).

Se evaluó el efecto tóxico del β -glucano a diferentes concentraciones utilizando la línea celular HUVEC. En una placa de 96 pocillos, se sembraron 5 x 10³ células/100 μ l de medio por pocillo. Después de 24 h, el medio se reemplazó con medio nuevo y se agregaron diferentes concentraciones de β -glucano (50, 75, 100, 150 y 200 μ g/mL). Se incluyeron pozos controles de células. Posteriormente se incubó durante 24 h. Después de ello se realizó la prueba de MTT (Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio), incubando durante 1 h en las condiciones. La reacción se detuvo con dimetilsulfóxido (DMSO) y la absorbancia de la microplaca se midió a 540 nm usando un lector de ELISA (lector de microplacas multimodo Varioskan™ LUX, Thermo Fisher Scientific). Como control uno de los grupos no se le aplicó β -glucano. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de células tratadas con respecto a las células de control no tratadas (100% de viabilidad celular), utilizando la siguiente fórmula para calcular la viabilidad relativa:

$$Viabilidad\ celular = \frac{Absorbancia\ del\ tratamiento}{Absorbancia\ del\ control} \times 100$$

Para la determinación de la concentración citotóxica media (CC_{50}) se realizó una regresión lineal con un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0.92.

8.8.3 Producción de ROS

En una placa de 96 pocillos, se sembraron 5×10^3 células/100 μ L de medio por pocillo. Después de 24 h, el medio se reemplazó con medio fresco y se agregaron diferentes concentraciones de β -glucano (50, 75, 100, 150 y 200 μ g/mL), seguido de una incubación de 24 h (5% de CO_2 , 50% de HR y 37 °C). Posteriormente, se eliminó el medio y se agregaron 100 μ L de medio de suero reducido Opti-MEM™ suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de antibiótico-antimicótico (anti-anti, 100X) (Gibco Life Technologies, No. de catálogo 31985070). Se añadieron 150 μ L de diacetato de 5(6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) con PBS 0,01 mM y se incubaron durante 30 min a 37°C. La microplaca se centrifugó a 200 X g durante 4 min. Se eliminó el reactivo y se realizó un lavado con 200 μ L de medio de suero reducido Opti-MEM™. Se añadieron 100 μ L del mismo y posteriormente se realizaron lecturas a las 0, 0,5, 1, 1.5 y 2 h. Las lecturas se realizaron en un lector de ELISA (lector de microplacas multimodo Varioskan™ LUX, Thermo Fisher Scientific), leyendo excitación a 485 nm y emisión a 530. Como control positivo se utilizaron 150 μ L de peróxido de hidrogeno grado laboratorio.

8.9 Análisis de citocinas proinflamatorias con ensayos basados en perlas de citometría de flujo

En una placa de seis pocillos, se sembraron 1.5×10^5 células/pocillo. La producción de citocinas proinflamatorias se investigó en la línea celular HUVEC no tratadas o tratadas con β -glucano ($CC_{50} = 291.76$ μ g/mL, 24 h) con ensayos de perlas de citometría de flujo. Se utilizó el Kit de citocinas Th1/Th2/Th17 humanas Cytometric Bead Array (CBA) BD™ (Número de catálogo 560484). Fue preparado el mix de las perlas de captura de acuerdo con el número de ensayos utilizados. En tubos eppendorf de 1.5 mL se agregaron 50 μ L de sobrenadante de cada muestra fue agregado 50 μ L del mix de perlas de captura y 300 μ L de reactivo de detección; todo fue incubado durante 3 h a temperatura

ambiente en ausencia de luz. Posteriormente se agregó 1 mL de buffer de lavado y fue centrifugado a 200 g durante 5 min. Se descarto el sobrenadante de cada tubo y fue agregado 300 μ L de buffer de lavado para resuspender el pellet para su posterior análisis de citometría de flujo. Los resultados fueron analizados por el software FCAP Array v3.0.

8.10 Análisis de datos

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, utilizando diseño al azar y los datos obtenidos en cada ensayo se evaluaron con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Se probó normalidad y homogeneidad de las varianzas entre los grupos y los resultados se sometieron a un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

09 RESULTADOS

La caracterización de los β -glucanos producidos por la mutante de *Ustilago maydis* BMA2, permite identificar y comprender sus propiedades estructurales y funcionales, para así realizar una integración de datos sobre el polisacárido. En esta sección se presentan los resultados de la evaluación de la producción de β -glucanos de la cepa BMA2 de *U. maydis* mediante la determinación de la DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno) y la cuantificación de su producción.

9.1 Evaluación de la Producción de β -glucanos

Monitoreando el crecimiento de la mutante BMA2 de *U. maydis*, se encontró que su fase de latencia se da en las primeras 8 h de su cultivo, posteriormente se sugiere que se inicia la fase exponencial a la hora 9, concluyendo aproximadamente a las 36 h. Después se alcanza una fase estacionaria, la cual se monitoreo hasta alcanzar las 48 h (Figura 3).

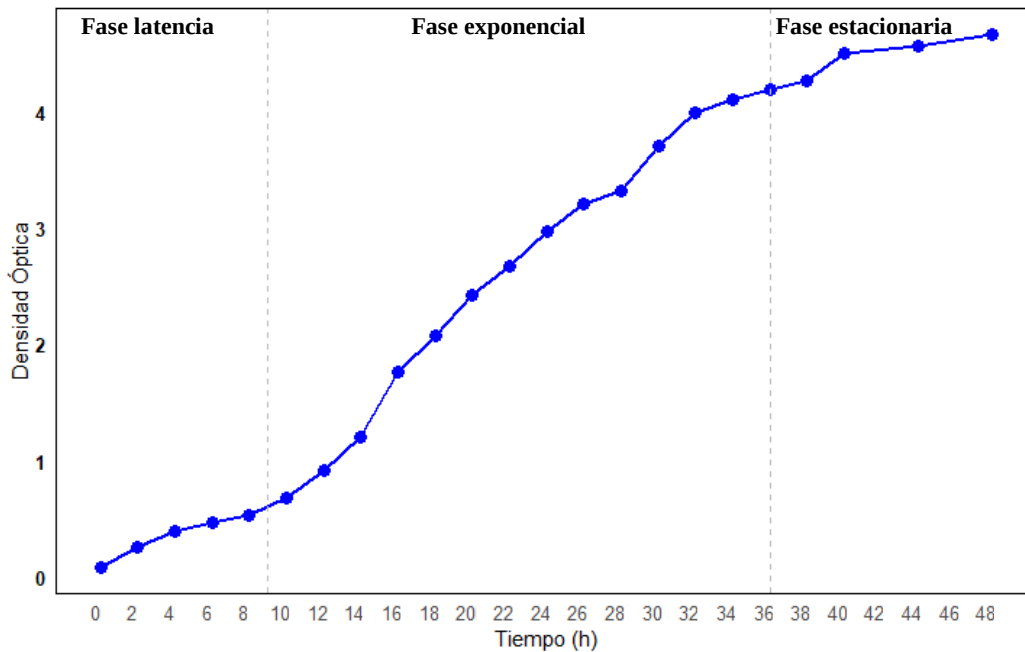


Figura 3. Perfil cinético de crecimiento de la cepa BMA2 de *U. maydis* en medio mínimo modificado.

Con el propósito de determinar el punto óptimo para la producción de los β -glucanos, se recuperaron alícuotas a lo largo de todo el análisis de la cinética de crecimiento. Se determinó que la producción de β -glucanos se ve aumentada en la fase exponencial, obteniendo una producción de 16.12 g/L utilizando la dextrosa como fuente de carbono y la urea como fuente de nitrógeno (Tabla 5).

Tabla 5. Cantidad de β -glucano de la cepa BMA2 a diferentes horas de cultivo.

Tiempo (h)	β-glucano peso seco (g/L)
0	2.99 $\pm$ 1.2
8	6.86 $\pm$ 1.75
16	10.24 $\pm$ 0.88
24	11.15 $\pm$ 1.02
32	16.12 $\pm$ 0.89
40	15.54 $\pm$ 1.06
48	14.12 $\pm$ 2.40

En la figura 4 se puede observar la cinética de la demanda bioquímica de oxígeno de la cepa BMA2 cuando se encuentra utilizando medio mínimo con una fuente de carbono de glucosa y como fuente nitrógeno el nitrato de potasio (línea naranja, verde y azul rey); utilizando medio mínimo modificado (línea amarilla, azul y gris). Se observa que al finalizar el día uno sufre una caída la demanda de oxígeno (BOD), posteriormente se da un aumento exponencial de la BOD desde el día uno hasta el día tres, sugiriendo que esto es debido a que el endosimbionte de *U. maydis* en este punto es el responsable de tal aumento, ya que debido a las condiciones de agitación de los respirómetros es muy baja para mantener a *U. maydis* en división celular.

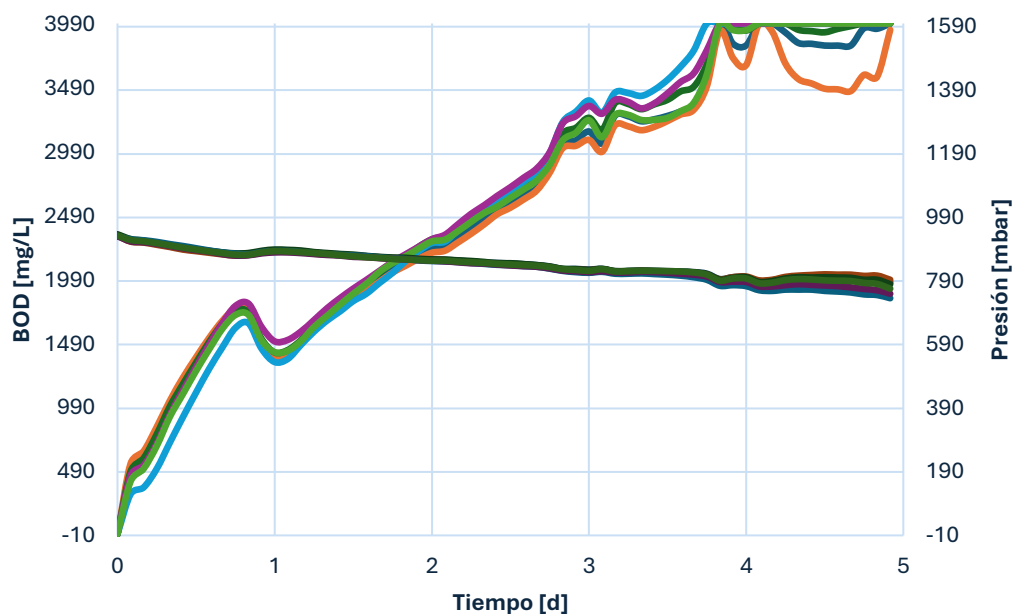


Figura 4. Cinética de la Demanda Bioquímica de Oxígeno de la mutante BMA2 de *U. maydis* en medio mínimo modificado y medio mínimo.

9.2 Análisis de la expresión génica durante la producción de β -glucanos.

La cepa silvestre FB2 no tiene una producción significativa de β -glucanos, mientras que la cepa mutante BMA2 sí. Por lo cual fueron analizados los datos correspondientes a la expresión génica durante la producción de β -glucanos, utilizando los niveles de expresión de la cepa silvestre FB2 y los de la mutante BMA2. Con el fin de comparar la expresión de genes y obtener un análisis de los genes desregulados y que posiblemente estén involucrados en tal fenotipo. Los resultados del análisis de los datos se encuentran a continuación, inicialmente se presenta la identificación de genes diferencialmente expresados (DEG); luego el enriquecimiento en las vías biológicas y funcionales; y por último la predicción de la ubicación subcelular de las proteínas correspondientes a los genes enriquecidos y relacionados a la síntesis de β -glucanos.

9.2.1. Identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs)

Explorando los genes diferencialmente expresados (DEG) entre la cepa mutante BMA2 y la cepa salvaje FB2, se identificaron un total de 572 DEG, en lo cual se incluyen 297 genes regulados negativamente y 275 genes regulados positivamente (Figura 5). Todos los genes fueron considerados DEG con un foldchange igual o mayor a 2 y con un valor de $P < 0.05$.

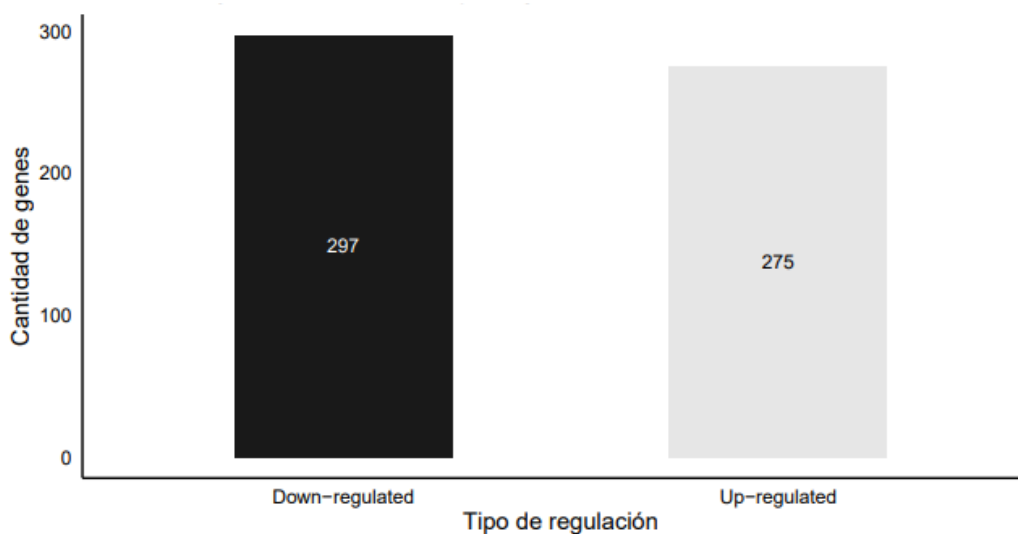


Figura 5. Análisis de genes diferencialmente expresados. Número de genes que están diferencialmente expresados en la cepa BMA2 a pH 7.

9.2.2 Análisis de las vías biológicas

Los genes enriquecidos en las vías biológicas se presentan a continuación. Se destacan 13 vías biológicas para los genes regulados positivamente y 7 vías reguladas negativamente (Figura 6). Entre las vías reguladas positivamente se encuentra “proceso metabólico de carbohidratos” con 20 genes; “periferia celular” con 23 genes; “biogénesis celular y organización celular” con 11 genes; “importadores de glucosa” con 5 genes; “actividad hidrolasa- actividad en enlaces glicosil” con 13 genes; “hidrolisis de compuestos O-glicosilado” con 13 genes; “membrana” con 88 genes; “proceso metabólico de polisacáridos” con 14 genes, “actividad de simportador de cationes monoatómicos” con 6 genes, “actividad de simportador de protones” con 6 genes, transportador transmembrana con 34, actividad de transporte transmembrana con 33 genes y actividad transportadora con 33 genes.

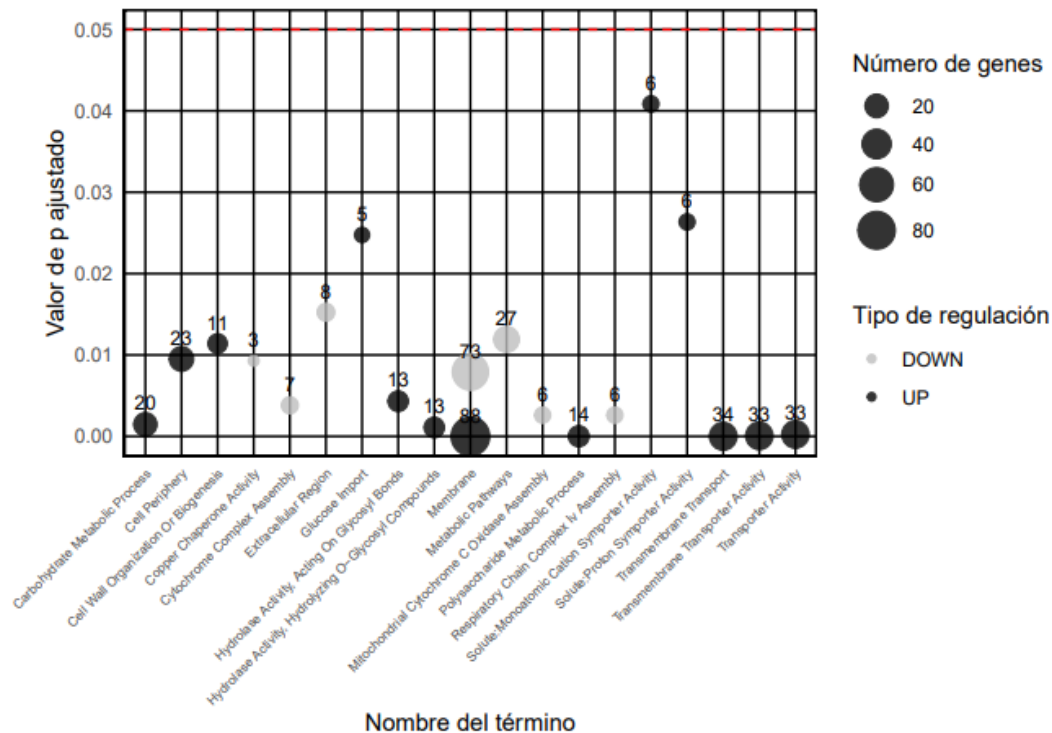


Figura 6. Análisis de enriquecimiento realizado en genes de regulación descendente y regulación ascendente. Realizado en g:Profiler mostrando los términos principales, todos los términos fueron considerando un foldchange mayor a 2 y menor a -2, con un $P < 0.05$.

Por otro lado, de los 297 genes regulados negativamente se lograron enriquecer 7 vías biológicas, entre ellas la de Membrana con 77 genes; Vías metabólicas con 27 genes; Región extracelular con 8 genes, Complejo de ensamble del Citocromo 7 genes; ensamble del citocromo mitocondrial C oxidasa con 6 genes; Ensamble de la cadena respiratoria del complejo IV con 6 genes; y la actividad chaperona con 3 genes.

La Figura 6 muestra el análisis de enriquecimiento de vías biológicas para genes regulados positiva y negativamente. Cada punto en el gráfico representa una vía biológica enriquecida y su altura representa el nivel de significación estadística definido por un valor p ajustado $<0,05$ (línea roja). Se observó que los genes regulados positivamente desempeñan un papel importante en varias vías biológicas, especialmente en vías relacionadas con procesos metabólicos y estructura celular, como el metabolismo de los carbohidratos, la periferia y la biogénesis celulares. La vía de la membrana también mostró una gran

importancia y mostró una regulación positiva significativa de los genes asociados a la membrana en relación con el análisis. Por otro lado, para los genes regulados negativamente, aunque se enriquecieron menos vías biológicas en comparación con los genes regulados positivamente, aún se observó significación estadística en varias vías, incluidas las membranas, las vías metabólicas y la formación de complejos como los citocromos y la cadena respiratoria del complejo IV.

Es importante destacar que la regulación diferencial de estas vías biológicas puede tener importantes consecuencias funcionales para los procesos celulares y fisiológicos. Aunque bien el factor de transcripción RIM101 ejerció una regulación predominantemente negativa al momento de enriquecer las vías se determinó que hay una mayor cantidad de vías en los genes regulados positivamente, posiblemente una de las razones es que para muchos de los genes aún no se determina su función, lo cual será discutido más adelante.

En general esta información proporciona una imagen detallada de la compleja red de interacciones genéticas subyacentes a los fenotipos observados en nuestro estudio por parte de la mutante BMA2, a causa de la mutación del factor de transcripción RIM101.

9.2.3 Predicción de la ubicación subcelular

La ubicación subcelular fue determinada con la finalidad de identificar la dinámica celular de las proteínas que son codificadas por los genes enriquecidos en el metabolismo de polisacáridos. Las proteínas fueron ubicadas en diferentes puntos celulares, entre ellos el retículo endoplasmático, membrana celular, membrana mitocondrial, aparato de Golgi y extracelular.

Las proteínas ubicadas en el retículo endoplasmático reguladas positivamente en la cepa mutante BMA2 corresponden a la subunidad de síntesis de β -glucano (UMAG_05811), la proteína de unión al β -1,3-glucano (UMAG_02803) y una hidrolasa de la familia de glicosilhidrolasas 1 (UMAG_06133). Otra de las proteínas relacionadas a la subunidad de síntesis de β -glucano (UMAG_05809)

y una relacionada a la proteína de unión al β -1,3-glucano (UMAG_03122) también está ubicada en la membrana celular. Lo que podría apuntar a que la producción aumentada de β -glucano está llevándose a cabo en diferentes puntos celulares, y a su vez con foldchanges con valores de hasta 23, estadísticamente significativos ($p < 0.05$) (Ver Tabla 6). Por otro lado, también otra de las subunidades de síntesis de β -glucano (UMAG_10364) relacionada con KRE6 se predice su ubicación en el aparato de Golgi.

Tabla 6. Proteínas que son codificadas por los genes enriquecidos en el metabolismo de polisacáridos (GO:0005976). Se muestra su función, ubicación celular y valores de cambio (foldchange).

ID proteína	Función	Predicción de ubicación	Foldchange	p-value
UMAG_05811	Relacionado con KRE6: subunidad de síntesis de β -glucano	Retículo endoplasmático	17.05524445	NeuN
UMAG_02803	Relacionado con la proteína de unión al β -1,3-glucano	Retículo endoplasmático	11.75411224	2.06E-07
UMAG_05809	Relacionado con KRE6: subunidad de síntesis de β -glucano	Membrana celular	23.0140686	5.34E-13
UMAG_02758	Relacionado con el precursor de la quitinasa A	Membrana mitochondrial	3.156997681	2.57E-09
UMAG_03122	Relacionado con la proteína de unión al β -1,3-glucano	Membrana celular	2.789598942	0.00000203
UMAG_06336	Proteína no caracterizada	Membrana mitochondrial	2.665229321	3.20E-15
UMAG_10364	Relacionado con KRE6: subunidad de síntesis de β -glucano	Aparato de Golgi	2.413012981	2.82E-09
UMAG_06133	Glyco_hydro_1; Familia de glicosilhidrolasas 1	Retículo endoplasmático	2.382251263	3.42E-08
UMAG_00446	Putativa β -glucosidasa	Extracelular	2.360053778	3.13E-07
UMAG_06190	Relacionado con la Quitinasa	Extracelular	2.24286294	0.00667
UMAG_03605	Relacionado con la sucrasa-fosfato-6 hidrolasa	Membrana mitochondrial	2.10313797	5.56E-12
UMAG_04357	Relacionado con el precursor de la endo-1,6- β -D-glucanasa	Lisosoma/Vacuola, Membrana	2.055436611	0.000137
UMAG_04364	Presunto precursor de la exo-1,3- β -glucanasa	Extracelular	2.026955843	0.000137

Ademas la UMAG_00446 una proteína β -glucosidasa putativa, la UMAG_0619 relacionada con la quitinasa y la UMAG_04364 un presunto precursor de la exo-1,3- β -glucanasa todas relacionadas con el modelamiento de la pared celular estan activas en la cepa BMA2. Al predecir su ubicación se revela la región extracelular.

Por otro lado, la proteína UMAG_02758 relacionada con el precursor de la quitinasa A, la UMAG_03605 relacionada con la sucrasa-fosfato-6 hidrolasala y la UMAG_06336 una proteina no caracterizada, se encuentran ubicadas en la membrana mitocondrial.

Todas las proteínas estan relacionadas con el metabolismo de poliscáridos (GO:0005976), sin embargo se percibe sobre todo un aumento en la expresión en la cepa BMA2 de las encargadas de la síntesis y unión del β -glucano tanto en la membrana del reticulo endoplasmatico como en la membrana. Con lo cual se puede sugerir que la mutación del factor de trasncipción Rim101 afecto la respuesta al estrés, la morfología y la estabilidad celular; probablemente como mecanismo de defensa este promoviendose una sobreexpresión de los genes involucrados en la biosíntesis de β -glucano.

Asimismo investigando la ubicación de los genes en el genoma disponible en GenBank de *U. maydis* (No. de acceso GCA_000328475.2), se determino que al menos dos de ellos estan en cluster, UMAG_05809 y UMAG_05811, los cuales tienen valores de foldchange de 23.0140686 y de 17.05524445, respectivamente (ambos codifican a proteinas relacionados con KRE6: subunidad de síntesis de β -glucano) (Figura 7). Pero ya en cuanto a su prediccion de ubicación celular se encuentran en diferentes puntos, aunque bien ambos en algún tipo de membrana.

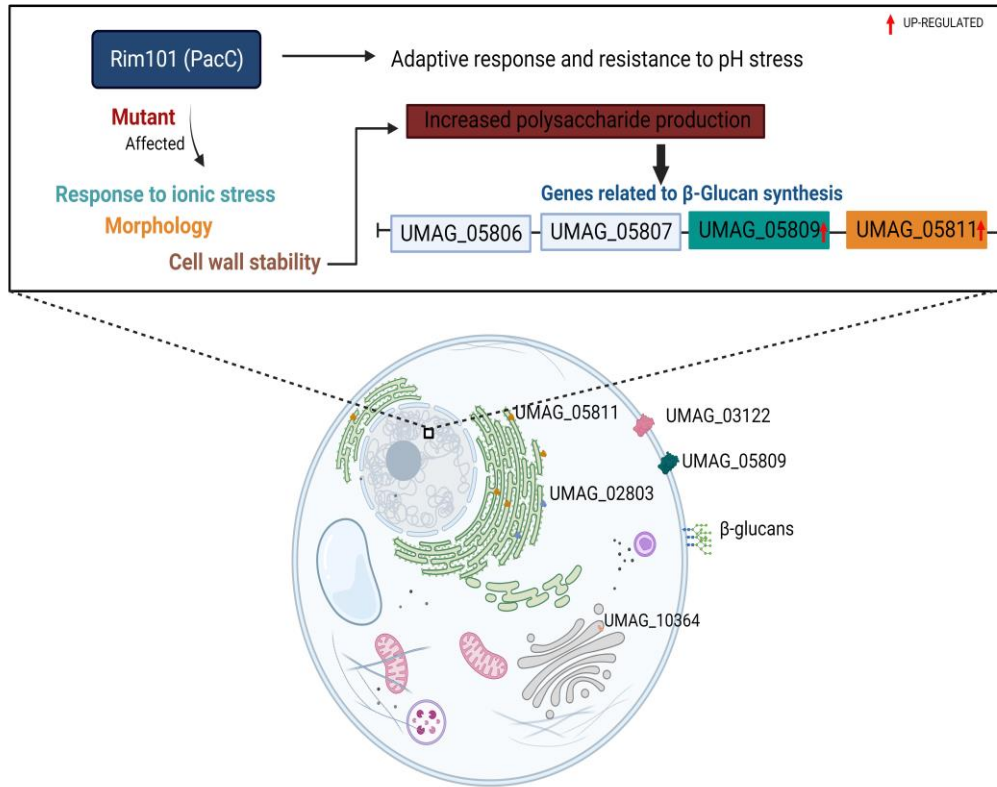


Figura 7. Esquema de las principales proteínas sobreexpresadas en la biosíntesis de β -glucano en la cepa mutante BMA2 de *U. maydis*. Genes destacados en la sección superior. La parte inferior muestra la ubicación de proteínas enriquecidas vinculadas a la β -glucano sintasa KRE6 y proteínas de unión al β -glucano.

9.3 Extracción e Identificación de β -glucanos

Existen diferentes métodos de extracción de β -glucanos, en el estudio se compararon cuatro métodos de extracción, extracción con agua caliente, extracción con agua fría, extracción a presión y extracción alcalina. El principal punto de comparación fue con los espectros de obtenidos por Espectroscopia Infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) (Figura 8) y comparando los rendimientos obtenidos en cada método de extracción (Tabla 7). Asimismo, el FT-IR permitió identificar el β -glucano, previo a todos los ensayos inmunológicos. La Tabla 6 muestra los rendimientos de β -glucano obtenidos a las 36 h de fermentación para los cuatro métodos de extracción evaluados. El análisis de varianza (ANOVA) utilizado para evaluar las diferencias en la producción de β -glucano entre los cuatro grupos mostró que los resultados no tienen diferencias significativas en la cantidad de β -glucano extraído por diferentes métodos. ($F(3, 1) = 0.685$, $p = 0.495$). Además, también se realizó la prueba de Tukey para comparaciones de múltiples grupos. Los resultados de esta prueba también mostraron que no hubo diferencias significativas en la extracción de β -glucano entre los grupos, indicando que sus medias eran estadísticamente similares ($\alpha 0.05$).

Tabla 7. Rendimiento de β -glucano de la cepa BMA2 con diferentes métodos de extracción.

Método de Extracción	Rendimiento (g/L)
Agua caliente (HWE)	14.73 $\pm$ 0.18
Agua a presión (SPE)	12.86 $\pm$ 0.07
Agua fría (CWE)	13.91 $\pm$ 0.08
Agua alcalina (EAL)	16.24 $\pm$ 0.09

Las principales bandas del estándar de β -glucano se identifican en las posiciones de 3300, 2883, 1366, 1025 y 570 cm^{-1} . La posición más frecuente, compartida con las muestras, es 1025 cm^{-1} , vinculada a las vibraciones de los enlaces glucosídicos.

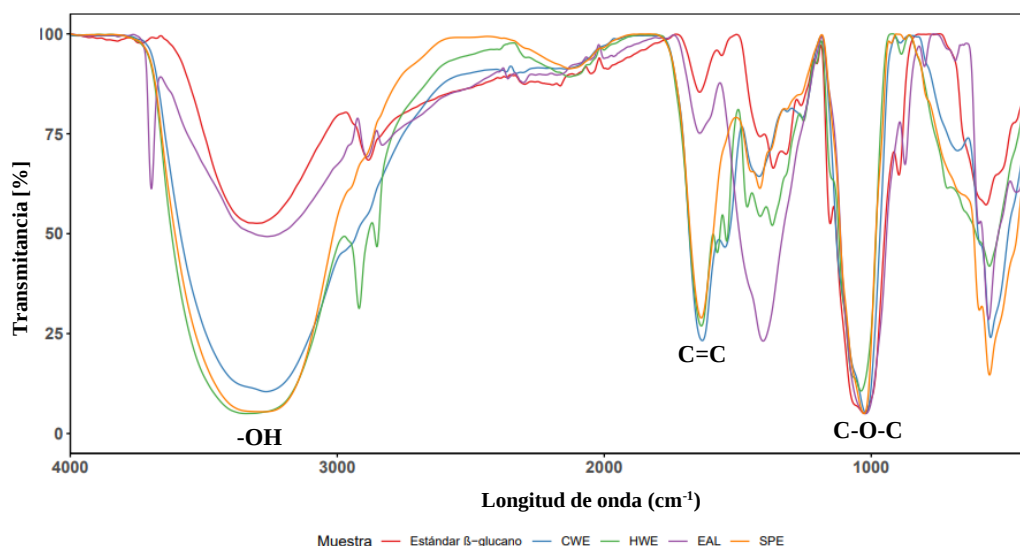


Figura 8. Comparación de Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de β -glucano extraído por cuatro métodos diferentes. El β -glucano fue extraído de la cepa mutante BMA2 de *U. maydis* mediante cuatro métodos: método de extracción agua fría (CWE), método de extracción agua caliente (HWE), método de extracción alcalina (EAL) y método de extracción a presión (SPE). Estándar: β -D-glucano (SIGMA-ALDRICH).

En el método de extracción de agua fría (CWE) y el de extracción con agua a presión (SPE) (Figura 9 y 10), se mostraron señales en el 594 cm^{-1} , 1026 cm^{-1} (estiramiento C-O-C), 1417 cm^{-1} (estiramiento -C-H (CH_2)), 1636 cm^{-1} (estiramiento C=O stretching) y 3275 cm^{-1} (estiramiento -OH). Se observa una señal de flexión de una amina C=O sin estiramiento C-N y sin deformación N-H, lo cual es diferente en el estándar.

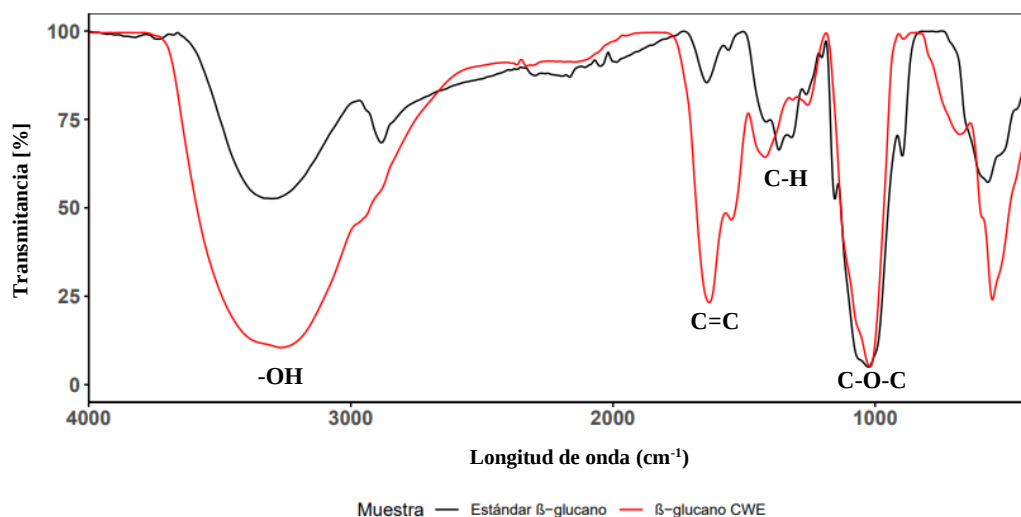


Figura 9. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de β -glucano extraído de la cepa BMA2 de *U. maydis* mediante el método de extracción agua fría (CWE). Estándar: β -D-glucano (SIGMA-ALDRICH).

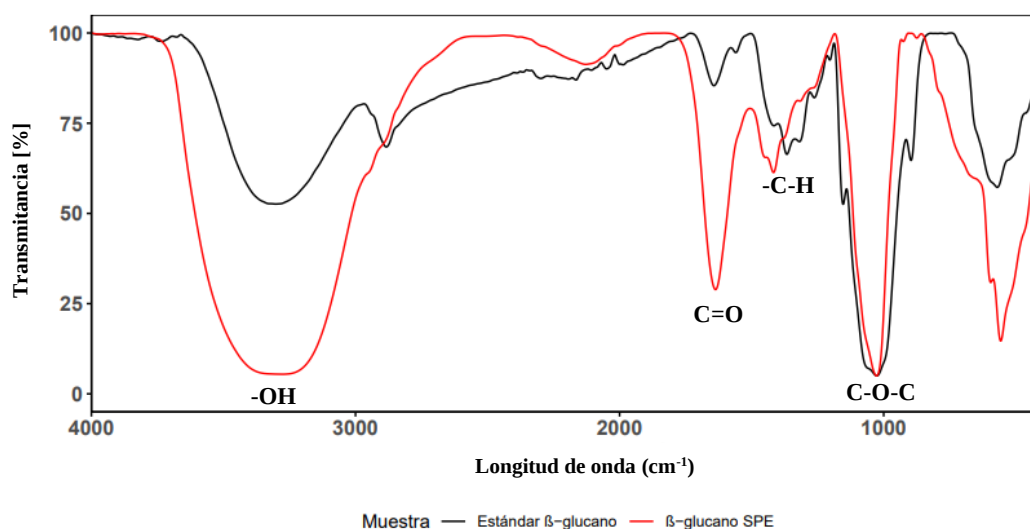


Figura 10. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de β -glucano extraído de la cepa BMA2 de *U. maydis* mediante el método de extracción agua a presión (SPE). Estándar: β -D-glucano (SIGMA-ALDRICH).

Utilizando el método de extracción con agua caliente (HWE) se identificaron señales en el 1038 cm^{-1} (estiramiento C-O-C) correspondiente al enlace glucosídico; 1253 y 1370 cm^{-1} (estiramiento -C-H (CH_3)); 1415 cm^{-1} (estiramiento =C-H (*cis*)) y 1464 cm^{-1} (estiramiento -C-H (CH_2); 1541 , 1576 y 1636 cm^{-1} (estiramiento -C=C-); 2851 y 2918 cm^{-1} (estiramiento -C-H (CH_2)); por último, la señal 3340 cm^{-1} (estiramiento -OH) (Figura 11). El perfil espectral

es similar al estándar, pero se observan diferencias principalmente en la presencia de señales indicativas de estiramiento simétrico ($-C-H$ (CH_2)) y una señal prominente en correspondiente a los vibraciones $-OH$.

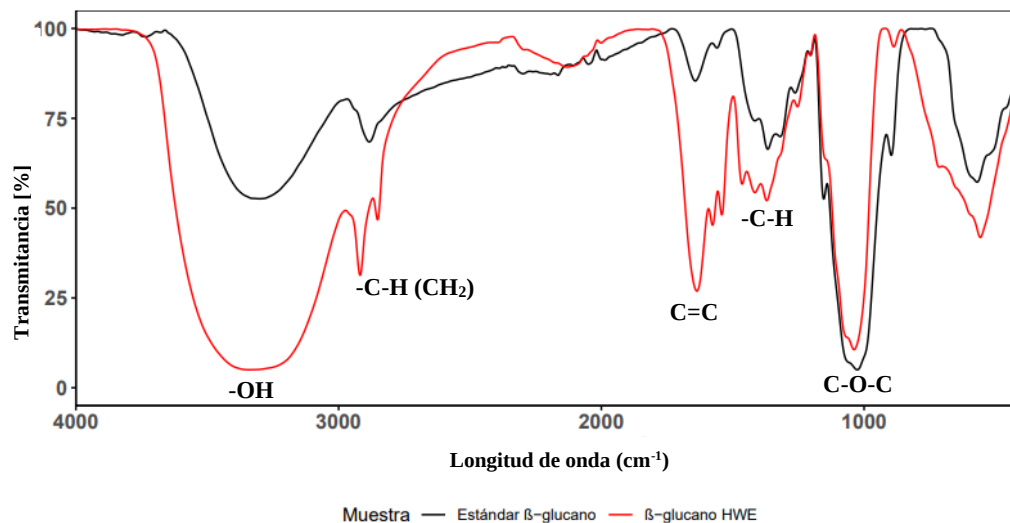


Figura 11. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de β -glucano extraído de la cepa BMA2 de *U. maydis* mediante el método de extracción agua fría (HWE). Estándar: β -D-glucano (SIGMA-ALDRICH).

El perfil espectral de la extracción alcalina (EAL) (Figura 12) presenta señales en el 456 cm^{-1} (estiramiento R-X), 559 cm^{-1} , 873 cm^{-1} (estiramiento $C=C$), 1021 cm^{-1} (estiramiento $C-O-C$), 1404 cm^{-1} (estiramiento $-C-H$ (CH_2)), 1642 cm^{-1} (estiramiento $C=O$), 2887 cm^{-1} (estiramiento $-COOH$), 3262 cm^{-1} (estiramiento $N-H$) y 3696 cm^{-1} .

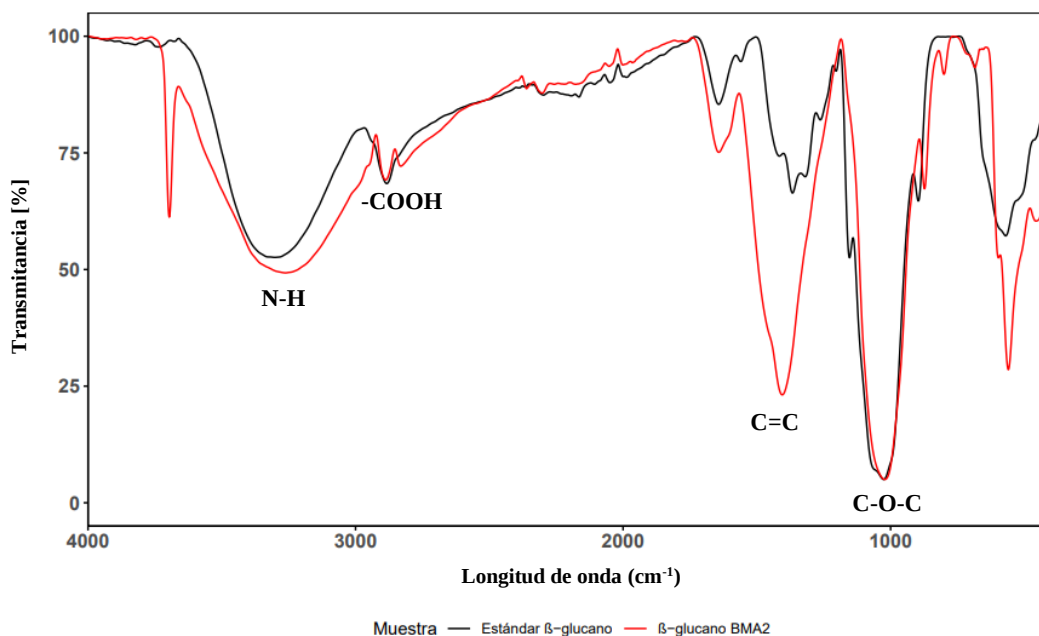


Figura 12. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de β -glucano extraído de la cepa BMA2 de *U. maydis* mediante el método de extracción alcalina (EAL). Estándar: β -D-glucano (SIGMA-ALDRICH).

9.2 Evaluación de la citotoxicidad del β -glucano en líneas celulares humanas.

La evaluación de la citotoxicidad del β -glucano fue realizada utilizando la línea de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), para lo cual se utilizaron concentraciones desde 50 μg a 200 μg de polisacárido. La Concentración Citotóxica Media (CC_{50}) en células HUVEC fue de 291.76 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucano.

Se observó una disminución en la viabilidad celular con relación al aumento de la concentración utilizada. Presentando diferencia significativa ($p < 0.001$) en cuanto al tratamiento de 0 $\mu\text{g/mL}$ comparándolo con los demás tratamientos utilizados (50, 75, 100, 150 y 200 μg). Asimismo, los tratamientos 50, 75 y 100 μg no presentaron diferencias significativas entre ellos, presentando en promedio porcentajes de viabilidad de 83.30%, 82.96% y 81.93%, respectivamente.

El tratamiento de 150 $\mu\text{g/mL}$ tiene una viabilidad celular de 76.30%, mostrando diferencia significativa con el tratamiento de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$); y con los

tratamientos 50 $\mu\text{g/mL}$ y 75 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.001$). Mientras que el tratamiento de 200 $\mu\text{g/mL}$ presento un 63.23 % de viabilidad celular, mostrando diferencias significativas con todos los otros tratamientos (50, 75, 100, 150 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 13).

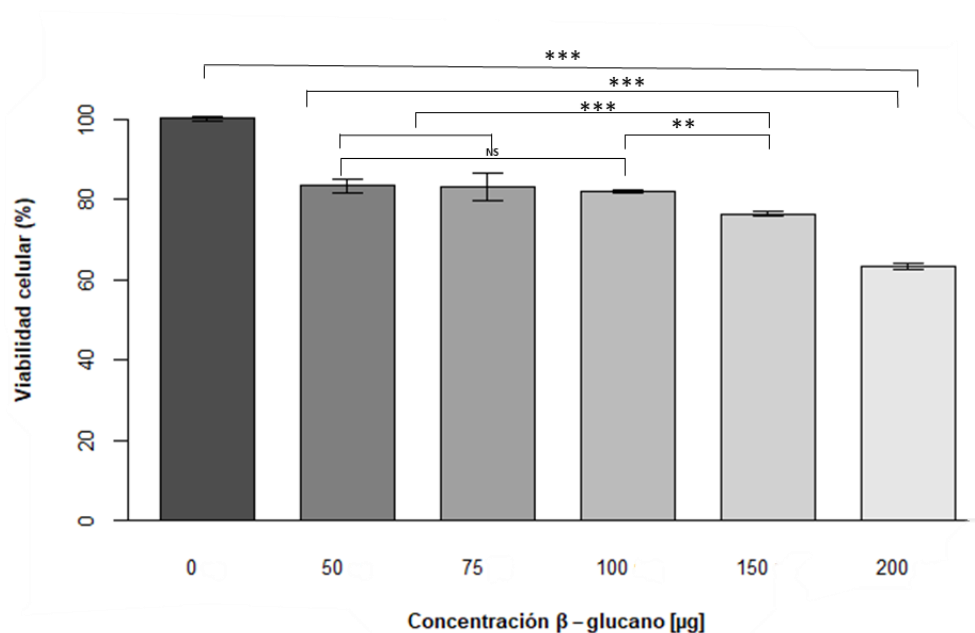


Figura 13. Resultados de las pruebas de citotoxicidad mediante un ensayo MTT. Los valores representan el porcentaje de viabilidad celular (medias $\pm$ DE, $n = 3$).

9.5 Efecto del β -glucano en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células tratadas

Para investigar el efecto del β -glucano en las células HUVEC se evaluó la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular. Los resultados mostraron que conforme aumenta la concentración de β -glucano en los tratamientos, se disminuye la producción de ROS (expresado en porcentaje de fluorescencia) (Figura 14).

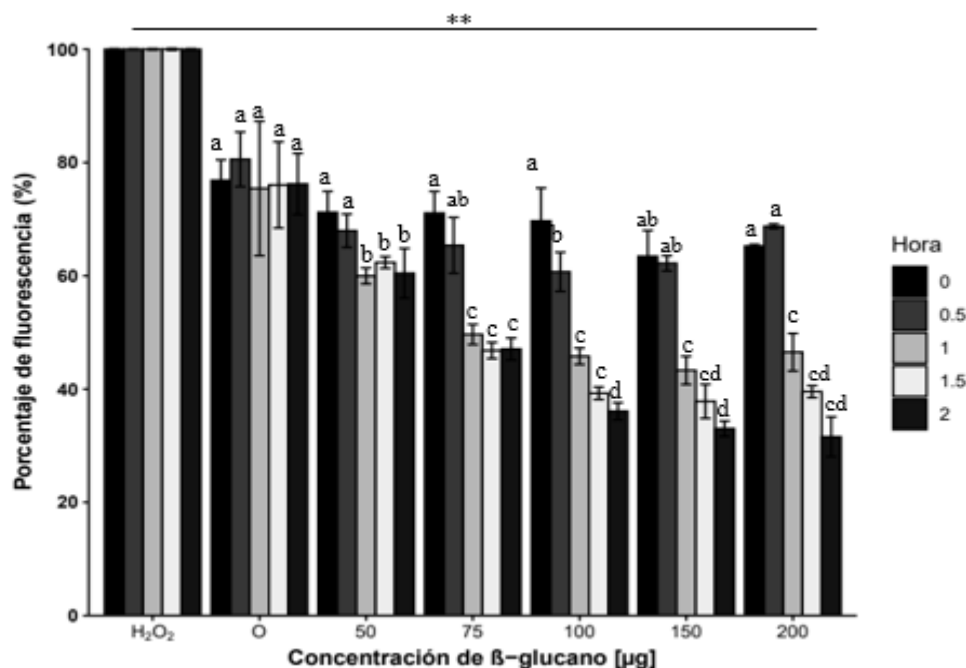


Figura 14. Resultados del efecto del β -glucano en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los valores representan el porcentaje de fluorescencia (medias $\pm$ DE, n = 3) en la hora 0, 0.5, 1, 1.5 y 2.

Se observó una tendencia similar para todos los tratamientos en la hora cero. Conforme avanza el tiempo se determinó una disminución de porcentaje de fluorescencia, que se interpreta como una menor cantidad de ROS extracelulares. En resumen, el efecto del β -glucano en células HUVEC mostró una relación dependiente entre la concentración de la goma y la disminución de la producción de ROS (expresado en porcentaje de fluorescencia). No se presentaron diferencias significativas en los tiempos de medición cuando no se aplicó tratamiento de β -glucano, demostrando que los cambios en el porcentaje de fluorescencia pueden relacionarse con los tratamientos aplicados de β -glucano. Además, se observó que los tratamientos con mayor concentración de β -glucano, fueron los que disminuyeron en mayor medida sus porcentajes de fluorescencia. Por lo tanto, el efecto de disminución de la cantidad de ROS en células HUVEC podría estar relacionado con propiedades antioxidantes reportadas para los β -glucanos.

9.6 Análisis de citocinas proinflamatorias con ensayos basados en perlas de citometría de flujo

Se observaron varios cambios en la producción de citoquinas en las células tratadas con β -glucano en comparación con el control. Se observó un ligero aumento en la concentración de IL-17B e IFN- γ humanos (Tabla 8), lo que concuerda con informes anteriores (Ali *et al.*, 2015).

Se ha informado que el β -glucano regula positivamente las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-8), incluida la IL-8, que ha sido mediada por el receptor Dectin-1 además de que implica la actividad de proteínas como SKY, MAPK y NF- κ B y factores de transcripción AP-1 (Ali *et al.*, 2015).

Tabla 8. Evaluación de citocinas en células HUVEC tratadas con β -glucano.

Citocina	Muestra	Concentración (pg/mL)	Diferencias
IL-17B	Control	83.69	Aumento
	B-glucano	88.20	
Human IFN- γ	Control	236.70	Aumento
	B-glucano	240.91	
Human TNF	Control	327.70	Disminuyo
	B-glucano	280.93	
IL-10	Control	1,559.02	Disminuyo
	B-glucano	1,339.16	
IL-4	Control	1,885.88	Disminuyo
	B-glucano	1,778.93	

10 DISCUSIÓN

Evaluación de la producción de β -glucanos

La búsqueda de plataformas de producción de β -glucano eficientes es algo primordial en las industrias que se encuentran desarrollando su producción eficiente. La principal razón es que en los últimos años se ha aumentado la demanda de β -glucano debido a las múltiples propiedades, como antioxidante, antidiabética, inmunoestimulante, hipoglicemiante (Afiati *et al.*, 2019; Garrido *et al.*, 2016; Sridhar y Kaur, 2023). La mutante BMA2 en medio mínimo modificado presento la mayor producción durante la fase de latencia, con la cantidad de 16.12 g/L; con lo cual coincide con lo reportado anteriormente por Sánchez Castillo (2023) quien había estandarizado el medio utilizado, obteniendo una producción de al menos 16 mg/mL al realizar la cuantificación del β -glucano en un medio con urea como fuente de nitrógeno y con dextrosa como fuente de carbono. Considerando que los β -glucanos forman parte de la pared celular de las células, una mayor cantidad de células indicaría mayor cantidad de β -glucanos. (Aimanianda *et al.*, 2009). Sin embargo, como *U. maydis* tiene una bacteria endosimbionte (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2021). (Ruiz-Herrera *et al.*, 2015); en este estudio se ha determinado que tiende a aparecer conforme *U. maydis* alcanza la fase estacionaria. Lo cual fue observado por medio de respirometría, una técnica que mide la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y está directamente proporcional a la cantidad de células (Christofi, 2005). Por lo tanto, se sugiere que la producción de β -glucanos se lleve a cabo en tiempos de fermentación de máximo 48 h, con al menos 160 rpm para asegurar la correcta aireación del sistema que suele ser uno de los principales inconvenientes a la hora de producir β -glucanos (Saeedian *et al.*, 2022). Además de los bajos tiempos de fermentación empleados en la producción del β -glucano, otra de las ventajas que demostró es el rendimiento que se alcanza por litro (>16 g/L), lo cual al compararse con otros organismos utilizados en plataformas de producción es competitivo. Por ejemplo, un estudio reciente de donde en un biorreactor de 5 L se cultivó *Schizophyllum commune* para producir esquizofilano (un β -glucano) en cinco días de fermentación se alcanzaron tan solo 21.3 g/L (Gou *et al.*, 2023).

Otro estudio que respalda la sugerencia de mantener tiempos de fermentación cortos para la mutante BMA2, es el de Lee y Ra (2022) ya que en su investigación acerca de la fermentación en estado líquido determinaron que la mayor producción de β -glucano fue a las 48 h, y que ocurrió una reducción en los rendimientos entre las 48 y 120 h, sugirieron que esto se pudo haber debido a la reducción del pH del medio; lo cual sería interesante analizarlo en un futuro (Lee y Ra 2022).

A diferencia de las bacterias, donde se ha observado que la producción de β -glucanos se da en la fase post-estacionaria cuando los niveles de nitrógeno comienzan a agotarse (Giordano, 2017). Se ha determinado que para *Xanthomonas campestris* y *Bacillus subtilis* variant *natto* lo óptimo es realizar la extracción a las 120 h de fermentación para alcanzar el peso máximo de β -glucano (Utama *et al.*, 2021). Esta comparación resalta la diversidad de los procesos de producción de β -glucano y destaca la importancia de comprender las características específicas de cada organismo para optimizar su producción.

Análisis de la ruta de B-glucano.

La importancia del estudio de dos genotipos distintos que tengan producciones de β -glucano desiguales, mejoraría la comprensión de los mecanismos para seguir optimizando los procesos de producción. Aunque este análisis es el primero realizado en *U. maydis* enfocándose a la biosíntesis de β -glucanos, investigaciones en otras especies, como lo *Hordeum vulgare* (cebada) ha permitido identificar genes asociados con la síntesis y acumulación del β -glucano durante el desarrollo (Geng *et al.*, 2022). El análisis de la expresión génica durante la producción de β -glucano identificó un total de 572 DEG entre la cepa mutante BMA2 y la cepa FB2 de tipo silvestre. En estudios previos de enriquecimiento con las cepas BMA2 y la FB2 a pH 9 se identificaron un mayor número de DEG (1425 genes) (Franco-Frias *et al.*, 2014) Este hallazgo contrasta fuertemente con los resultados del presente estudio, aunque los que reportamos se realizaron en condiciones de pH neutro y mostraron un total de 572 DEG. Esta diferencia sugiere que las condiciones ambientales, particularmente el pH, puede

influir significativamente en las vías reguladoras de los genes. A su vez esto es consistente con lo que menciona Cervantes-Montelongo y colaboradores (2016), quien menciona que la adaptación a un medio alcalino involucra otros mecanismos independientes de la vía Pal/Rim (Cervantes-Montelongo *et al.*, 2016). Por lo tanto, la diferencia entre los resultados de los estudios de pH alcalino y pH neutro resalta la capacidad de adaptarse a diferentes ambientes. Además de que este hallazgo resalta la importancia de considerar las condiciones ambientales al interpretar datos de expresión genética y comprender los mecanismos de producción de β -glucano.

Recapitulando a que Aréchiga-Carvajal y colaboradores (2005) fueron los primeros en observar en mutantes de Δ rim101 la secreción aumentada de polisacáridos, lo relacionaron con las alteraciones en la estructura de la pared celular. En el presente estudio se destaca el enriquecimiento funcional predominante corresponde a la membrana, con 88 genes regulados positivamente y 73 genes regulados negativamente. Asimismo, hay 23 genes regulados positivamente enriquecidos en la vía de la periferia celular. Por lo tanto, nuestro estudio proporciona evidencia adicional del papel de RIM101 en la regulación de vías biológicas que están asociadas con la respuesta al estrés celular. En este caso principalmente a vías de membrana y periferia celular, sugiriendo que la sobreexpresión de tales vías y la de polisacáridos sea una estrategia celular para compensar los cambios en la pared celular y así mantener la integridad y función celular en condiciones de estrés.

Sin embargo, estudios de *Ganoderma lucidum* mostraron resultados opuestos para los mutantes PacC, demostrando una reducción significativa en el contenido de β -glucano y una regulación negativa de la β -glucano sintasa (Hu *et al.*, 2020). Mientras que en *Aureobasidium pullulans*, la cepa mutante Δ Appacc redujo la producción de polulano (α -1, 4 -, α -1 ,6-glucano), pero la sobreexpresión del mismo factor de transcripción (Δ Appacc) mostró una mayor producción de polulano por litro (Zhang *et al.*, 2023).

Por lo tanto, se sugiere que los efectos de la mutación en el factor de transcripción Rim101/PacC pueden variar mucho entre especies, destacando la importancia de considerar las diferencias al interpretar los resultados.

Se ha propuesto que las vías metabólicas como el metabolismo del piruvato, propanoato, gluconeogénesis/glicolisis y biosíntesis de N-glucanos influyen en la producción de polisacáridos; además de influir en el crecimiento celular acelerado y la biosíntesis de polisacárido requiriendo un metabolismo activo (Tong *et al.*, 2022).

Este trabajo revela distintas distribuciones subcelulares de proteínas involucradas en el metabolismo de los polisacáridos, particularmente los β -glucanos, encontrando diferentes β -glucano sintasas en diferentes compartimentos celulares. Encontrando la presencia hipotética de proteínas relacionadas con la síntesis y unión de β -glucano en el retículo endoplasmático y la membrana celular, sugiriendo una regulación compleja de la biosíntesis de β -glucano. La función de algunos de estos genes está relacionada con KRE6, donde el producto del gen KRE6 es necesario para la síntesis de los β -glucanos, siendo una proteína sintasa de membrana (Kurita *et al.*, 2011; Roemer y Bussey, 1991).

Además de funciones del producto de los genes relacionados con la proteína de unión al β -1,3-glucano. La observación de que algunas de estas proteínas muestran valores de sobreexpresión significativos (de hasta 23, $p < 0.05$) resalta la importancia de estas proteínas en el contexto de la sobreproducción de β -glucano en la cepa BMA2.

El estudio de Kurita *et al.*, (2011) enriquece la interpretación de nuestros resultados, sugiriendo que el β -1,6-glucano puede sintetizarse intracelularmente a partir de UDP-glucosa y luego transportarse al exterior para su conjugación mediante transglicosilación. Esta información respalda la idea de que la producción de β -glucano puede ocurrir en diferentes compartimentos celulares y que la regulación de esta síntesis puede ser compleja y multifacética.

Además, se investigó la ubicación de los genes relacionados con la síntesis de β -glucano, y al menos para UMAG_05809 y UMAG_05811 (codifican a proteínas relacionadas con KRE6: subunidad de síntesis de β -glucano) se observó que están agrupados y mostraban una expresión coordinada a pesar de que los productos de los genes están ubicados en diferentes compartimentos celulares (retículo endoplasmático y membrana celular), lo que sugiere una posible coordinación en la regulación de estos genes, mecanismo que hasta el momento no ha sido reportado y sería interesante analizar.

En conjunto, nuestros resultados sugieren una regulación compleja de la biosíntesis de β -glucano en la cepa BMA2, que involucra múltiples compartimentos celulares y una posible coordinación en la expresión genética; además de considerar una síntesis de cadenas cortas de β -glucano. Con lo cual estos resultados contribuyen a una mejor comprensión de la respuesta adaptativa de la cepa Δ rim101 e implicaciones importantes para la biología celular y la ingeniería genética en la producción de β -glucano.

Comparación de diferentes métodos de extracción e identificación de β -glucanos

Existen múltiples métodos de extracción de β -glucanos, pero determinar cuál es el más adecuado para la fuente con la que se trabaja es crucial para tener calidad. En este estudio se evaluaron cuatro métodos de extracción: agua caliente, agua fría, agua a presión y álcali (Gen *et al.*, 2024; He *et al.*, 2018; Pengkumsri *et al.*, 2016).

La falta de diferencias significativas entre los grupos en el rendimiento de β -glucano puede atribuirse a varios factores, como la naturaleza de la muestra, pocas diferencias entre el procedimiento de cada método de extracción y a la sensibilidad para cuantificar el β -glucano. Estos resultados sugieren que, al menos bajo este conjunto de condiciones experimentales, los diferentes métodos de extracción evaluados pueden ser igualmente efectivos para extraer β -glucano de la cepa BMA2 de *U. maydis*.

Sin embargo, es importante señalar que estos resultados se basan en un conjunto de datos específico y pueden no generalizarse a otras condiciones experimentales. Se recomienda en primera instancia utilizar un método más sensible para la cuantificación de β -glucano, como lo podría ser utilizar métodos enzimáticos (Quezada-Correa *et al.*, 2017).

Para la identificación se empleó FT-IR, ya que múltiples estudios demuestran que la identificación de β -glucanos se puede determinar con la ayuda de FT-IR, porque los grupos funcionales y la disposición anomérica se identifican simplemente (Ahmad *et al.*, 2016; Ibrahim y Mahdi, 2020).

El análisis de los espectros obtenidos identifico varias bandas características de β -glucano (Zechner-Krpan *et al.*, 2010). En particular la banda 1025 cm^{-1} , relacionada con las vibraciones de los enlaces glicosídicos, correspondientes al enlace C-O-C, sugiriendo la presencia de β -glucano en la muestra. Para los cuales se han reportado señales en esa área sugiriendo presencia de β -glucanos (Bleha *et al.*, 2022).

Se considero la extracción alcalina como el método más adecuado, ya que las bandas de vibraciones correspondientes a los enlaces de proteínas estaban ausentes, por lo que la extracción alcalina ayudó a purificar el β -glucano. Además, el FT-IR revelo que en el 1642 cm^{-1} se atribuyó al estiramiento de C=O, así mismo las señales de 1404 cm^{-1} y 2887 cm^{-1} sugieren que se debe al estiramiento de -C-H (CH_2), que podría estar ocurriendo en la flexión de los anillos de glucosa (Bleha *et al.*, 2022).

Asimismo, la señal 3262 cm^{-1} corresponde a la presencia de grupos hidroxilo (-OH) en la estructura (Eyigor *et al.*, 2018). Todo en conjunto sugiere que la muestra contiene enlaces típicos de β -glucano, como lo son los grupos carbonilo y metileno, confirmando la presencia del polisacárido.

Evaluación biológica

La evaluación de la citotoxicidad del β -glucano en la línea celular HUVEC, utilizando concentraciones de 50 μg a 200 μg de β -glucano, determinando que la Concentración Citotóxica Mediana (CC_{50}) en células HUVEC fue de 291.76 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucano (Fig. 13). Presentando una disminución de la viabilidad celular en relación con el aumento de la concentración utilizada. El tratamiento sin β -glucano respecto a los demás tratamientos utilizados (50, 75, 100, 150 y 200 μg) presenta diferencias significativas ($p < 0,001$). Los tratamientos de 50, 75 y 100 μg no presentaron diferencias significativas entre sí, presentando en promedio porcentajes de viabilidad de 83,30%, 82,96% y 81,93%, respectivamente. El tratamiento de 150 $\mu\text{g/mL}$ tiene una viabilidad celular del 76,30%, mostrando una diferencia significativa con el tratamiento de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$); los tratamientos de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 75 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.001$), mientras que el tratamiento de 200 $\mu\text{g/mL}$ presentó 63.23% de viabilidad celular, mostrando diferencias significativas con todos los demás tratamientos (50, 75, 100, 150 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados nos indican que, a concentraciones más bajas, el β -glucano no tiene efectos drásticos en la viabilidad celular de las células HUVEC. En cambio, a concentraciones medianas (150 $\mu\text{g/mL}$) se comienzan a percibir los efectos, esto con una reducción del porcentaje de viabilidad celular. Siendo 200 $\mu\text{g/mL}$ la concentración más citotóxica para las células. Por lo cual se sugiere que se prueben en diferentes líneas celulares para observar el impacto y que al menos en la línea celular HUVEC el β -glucano de la cepa BMA2 presenta una viabilidad mayor al 80% cuando se aplican 50, 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de tratamiento.

La citotoxicidad se ha centrado principalmente en estudios sobre líneas celulares cancerosas, para detectar qué β -glucanos podrían usarse en el tratamiento para la regresión del cáncer (Ma *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2016). Se ha demostrado que es posible influir en la calidad de la inmunidad celular a través del β -glucano, obteniendo efectos positivos sobre las actividades inmunorreguladoras, particularmente sobre la inmunidad adaptativa (Richter *et al.*, 2016).

Incluso existen reportes clínicos donde se han utilizado diferentes tipos de β -glucanos como parte del tratamiento del cáncer, entre ellos para el cáncer colorrectal (Karaca *et al.*, 2014) y cáncer gástrico (Ina *et al.*, 2011).

El efecto del β -glucano sobre las células HUVEC mostró una relación dependiente entre la concentración de la goma y la disminución en la cantidad de ROS (expresada como porcentaje de fluorescencia) (Figura 14). Sin embargo, se demuestra estadísticamente una interacción entre el tratamiento y el tiempo de medición ($p < 0,05$). Por lo tanto, se podría sugerir que existe un efecto diferente dependiendo del tiempo en el que se realiza la evaluación. Se ha informado que los β -glucanos promueven la expresión de proteínas implicadas en la angiogénesis y la protección contra el estrés oxidativo (Casieri *et al.*, 2017). Sin embargo, en otros estudios donde se evaluó en células HeLa y A549, ha sido prospectivo porque se ha observado una generación significativa de ROS con concentraciones crecientes aplicadas de β -glucano y la capacidad del β -glucano para desencadenar la apoptosis (Joha *et al.*, 2023). Lo cual sería interesante analizar más adelante.

Nuestro β -glucano tiene efecto reductor de ROS, que en términos celulares previenen daño oxidativo, protegiendo contra el estrés oxidativo y todos los efectos negativos que este genera. Por lo cual el β -glucano analizado es un posible antioxidante, que puede ser de utilidad para potenciales tratamientos.

Se observaron varios cambios en la producción de citocinas en las células tratadas con β -glucano en comparación con el control. Se observó un ligero aumento en la concentración de IL-17B e IFN- γ humanos (Tabla 8). Se ha informado que el β -glucano regula positivamente las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-8), incluida la IL-8, que ha sido mediada por el receptor Dectin-1 además de involucrando la actividad de proteínas como SKY, MAPK y NF- κ B y factores de transcripción AP-1 (Ali *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que el β -glucano puede inducir la producción de citoquinas proinflamatorias, aunque en ensayos *in vitro* también se observó una disminución en la concentración de TNF e IL-10. Lo que podría estar relacionado con los

diferentes efectos de las estructuras del β -glucano respecto a la producción de citoquinas, como se ha sugerido (Ohno *et al.*, 1995). Estos resultados sugieren un efecto modulador de nuestro β -glucano sobre la producción de citocinas, lo que podría estar relacionado con la regulación de la respuesta inmune y por tanto con la búsqueda de aplicaciones médicas de la misma. Actualmente, se han realizado esfuerzos para utilizar β -glucano e interferón γ para activar células mieloides en modelos murinos de cáncer de ovario metastásico, obteniendo resultados positivos donde se redujo la metástasis general (Miyamoto *et al.*, 2023).

Para determinar un panorama mayor al que reportamos del β -glucano de la cepa BMA2 es necesario diseñar ensayos, que permitan identificar los mecanismos moduladores que pueden estar relacionados con toda la maquinaria celular que activa al aplicar tratamientos de este tipo de moléculas.

11 CONCLUSIONES

La mutante BMA2 de *Ustilago maydis* mostró que en la producción del β -glucano su rendimiento aumentó significativamente durante la fase de crecimiento exponencial y alcanzó 16,12 g/L utilizando dextrosa como fuente de carbono y urea como fuente de nitrógeno. El análisis de la expresión genética reveló 572 genes expresados diferencialmente, en su mayoría regulados positivamente, implicados en vías estructurales metabólicas y celulares. Las proyecciones subcelulares sugieren que el β -glucano se sintetiza en múltiples sitios, destacando la membrana endoplásmica y las membranas intracelulares. Los métodos de extracción de β -glucano no mostraron diferencias significativas en la cantidad de extracción, pero si en sus huellas dactilares. La evaluación en línea celular determinó un porcentaje de viabilidad celular de 83.30% al administrar un tratamiento de 50 μ g/mL glucano durante 24 h y una CC_{50} de 291,76 μ g/mL, mientras que el β -glucano mostró una generación reducida de ROS intracelular dependiente de la concentración y el tiempo, asimismo una mayor producción de citoquinas proinflamatorias como IL-17B e IFN- γ ; y disminución en el TNF, IL-10 e IL-4; lo que sugiere un efecto inmunomodulador del β -glucano sobre la producción de citoquinas, sin embargo el mecanismo particular no está determinado en las células HUVEC pero sería interesante analizarlo más adelante.

12 PERSPECTIVAS

- Escalar la producción a nivel reactor.
- Investigaciones más a fondo en otras líneas celulares, principalmente cancerígenas para determinar su efecto en las mismas.
- Estudios detallados de modificaciones químicas con el fin de potencializar sus propiedades.
- Probar en estudios *in vivo* para validar los hallazgos *in vitro*.
- Investigaciones con citocinas antiinflamatorias, para comprender mejor el mecanismo de regulación.

13 BIBLIOGRAFÍA

Abd-El-Ghany, K., Ragaa-A, H., Hoda, M., Abd-Elhafez, E., Ahmed, F. A. H., & Hamza, H. A. (2016). Description of isolated LAB producing β -glucan from Egyptian sources and evaluation of its therapeutic effect. *International Journal of Pharmacology*, 12(8), 801–811. <https://doi.org/10.3923/ijp.2016.801.811>

Afiati, F., Firza, S. F., Kusmiati, K., & Aliya, L. S. (2019). The effectiveness β -glucan of shiitake mushrooms and *Saccharomyces cerevisiae* as antidiabetic and antioxidant in mice Sprague Dawley induced alloxan. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2120, No. 1). AIP Publishing.

Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., & Dilshad, S. M. R. (2012). Beta glucan: A valuable functional ingredient in foods. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 52, Issue 3, pp. 201–212). <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499806>

Ahmad, M., Gani, A., Shah, A., Gani, A., & Masoodi, F. A. (2016). Germination and microwave processing of barley (*Hordeum vulgare* L) changes the structural and physicochemical properties of β -d-glucan & enhances its antioxidant potential. *Carbohydrate polymers*, 153, 696-702.

Aimanianda, V., Clavaud, C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., & Latgé, J. P. (2009). Cell wall β -(1, 6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13401-13412.)

Ali, M. F., Driscoll, C. B., Walters, P. R., Limper, A. H. and Carmona, E. M. (2015). B-glucan-activated human B cells participate in innate immune responses by releasing proinflammatory cytokines and stimulating neutrophil chemotaxis. *The Journal of Immunology*, 195(11), 5318-5326.

Aquinas, N., Bhat M, R., & Selvaraj, S. (2022). A review presenting production, characterization, and applications of biopolymer curdlan in food and pharmaceutical sectors. In *Polymer Bulletin* (Vol. 79, Issue 9, pp. 6905–6927). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03860-1>

Aréchiga-Carvajal, E. T., & Ruiz-Herrera, J. (2005). The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryotic Cell*, 4(6), 999–1008. <https://doi.org/10.1128/EC.4.6.999-1008.2005>

Bannuet, F., & Herskowitz, I. (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis (corn smut fungus/plant pathology/tumor induction/mating) (Vol. 86). <https://www.pnas.org>

Basso, V., Schiavenin, C., Mendonça, S., de Siqueira, F. G., Salvador, M., & Camassola, M. (2020). Chemical features and antioxidant profile by *Schizophyllum commune* produced on different agroindustrial wastes and byproducts of biodiesel production. *Food Chemistry*, 329. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127089>.

Batbayar, S., Lee, D. H., & Kim, H. W. (2012). Immunomodulation of fungal β -glucan in host defense signaling by dectin-1. *Biomolecules & therapeutics*, 20(5), 433.

Benito-Román, Ó., Alonso, E., & Cocero, M. J. (2013). Pressurized hot water extraction of β -glucans from waxy barley. *The Journal of Supercritical Fluids*, 73, 120-125.

Bhattad, T., Koradiya, A., & Prakash, G. (2021). Prebiotic Activity Of Paramylon Isolated From Heterotrophically Grown *Euglena Gracilis*. *Heliyon*, 7(9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07884>

Bleha, R., Třešnáková, L., Sushytskyi, L., Capek, P., Čopíková, J., Klouček, P., & Synytsya, A. (2022). Polysaccharides from basidiocarps of the polypore fungus *Ganoderma resinaceum*: Isolation and structure. *Polymers*, 14(2), 255.

- Brennan, C. S., & Cleary, L. J. (2005). The potential use of cereal (1→3,1→4)- β -D-glucans as functional food ingredients. In *Journal of Cereal Science* (Vol. 42, Issue 1, pp. 1–13). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.01.002>
- Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Molenda, M., & Reczek, L. (2015). Biosynthesis of β (1, 3)/(1, 6)-glucans of cell wall of the yeast *Candida utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinized potato juice water and glycerol. *European Food Research and Technology*, 240, 1023-1034.
- Caruso, A., Piermaria, J. A., Abraham, A. G., & Micaela, M. (2022). Food Hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, 107963.
- Casieri, V., Matteucci, M., Cavallini, C., Torti, M., Torelli, M. ., & Lionetti, V. (2017). Long-term intake of pasta containing barley (1–3) beta-D-glucan increases neovascularization-mediated cardioprotection through endothelial upregulation of vascular endothelial growth factor and parkin. 1), 13424.).
- Cerletti, C., Esposito, S., & Iacoviello, L. (2021). Edible mushrooms and beta-glucans: Impact on human health. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu13072195>
- Cervantes-Montelongo, J. A., Aréchiga-Carvajal, E. T., & Ruiz-Herrera, J. (2016). Adaptation of *Ustilago maydis* to extreme pH values: A transcriptomic analysis. *Journal of basic microbiology*, 56(11), 1222-1233.
- Chang, I., & Cho, G. C. (2012). Strengthening of Korean residual soil with β -1,3/1,6-glucan biopolymer. *Construction and Building Materials*, 30, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2011.11.030>
- Chang, Y. J., Lee, S., Yoo, M. A., & Lee, H. G. (2006). Structural and biological characterization of sulfated-derivatized oat β -glucan. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(11), 3815-3818.

Choromanska, A., Kulbacka, J., Rembialkowska, N., Pilat, J., Oledzki, R., Harasym, J., & Saczko, J. (2015). Anticancer properties of low molecular weight oat beta-glucan—An in vitro study. *International journal of biological macromolecules*, 80, 23-28.

Choromanska, A., Kulbacka, J., Harasym, J., Oledzki, R., Szewczyk, A., & Saczko, J. (2018). High-and low-molecular weight oat beta-glucan reveals antitumor activity in human epithelial lung cancer. *Pathology & Oncology Research*, 24, 583-592.

Christofi, N. (2005). Bioassays:(d) microbial tests. In *Encyclopedia of Analytical Sciences*, 2nd edn. Elsevier Press.

Du, L. P., Cheong, K. L., & Liu, Y. (2018). Optimization of an aqueous two-phase extraction method for the selective separation of sulfated polysaccharides from a crude natural mixture. *Separation and Purification Technology*, 202, 290-298.

Du, B., Nie, S., Peng, F., Yang, Y., & Xu, B. (2022). A narrative review on conformational structure characterization of natural polysaccharides. *Food Frontiers*, 3(4), 631-640.

Eyigor, A., Bahadori, F., Yenigun, V. B., & Eroglu, M. S. (2018). Beta-Glucan based temperature responsive hydrogels for 5-ASA delivery. *Carbohydrate polymers*, 201, 454-463.

Falch, B. H., Espevik, T., Ryan, L., & Stokke, B. T. (2000). The cytokine stimulating activity of (1→3)-β-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *Carbohydrate Research*, 329(3), 587-596.

Fonseca-García, C., López, M. G., Aréchiga-Carvajal, E. T., & Ruiz-Herrera, J. (2011). A novel polysaccharide secreted by pal/rim mutants of the phytopathogen fungus *Ustilago maydis*. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1646–1650. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.077>

Franco-Frias, E., Ruiz-Herrera, J., & Arechiga-Carvajal, E. T. (2014). Transcriptomic analysis of the role of Rim101/PacC in the adaptation of *Ustilago maydis* to an alkaline environment. *Microbiology*, 160(9), 1985-1998.)

Fuller, R., Moore, M. v., Lewith, G., Stuart, B. L., Ormiston, R. v., Fisk, H. L., Noakes, P. S., & Calder, P. C. (2017). Yeast-derived β -1,3/1,6 glucan, upper respiratory tract infection and innate immunity in older adults. *Nutrition*, 39–40, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.03.003>.

Gan, H., Kabe, T., & Iwata, T. (2020). Manufacture, characterization, and structure analysis of melt-spun fibers derived from paramylon esters. *Journal of Fiber Science and Technology*, 76(5), 151–160. <https://doi.org/10.2115/fiberst.2020-0018>.

Garrido, M., Escobar, M. C., Carrasco, P., Durán, S., Angarita, M., Reina, N.,... & Chaparro, R. (2016). Efecto del B-glucano de avena sobre el índice glicémico y carga glicémica de un suplemento nutricional edulcorado con sucralosa en adultos sanos: Un ensayo clínico aleatorizado. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 35(4), 77-85.

Geng, L., He, X., Ye, L., & Zhang, G. (2022). Identification of the genes associated with β -glucan synthesis and accumulation during grain development in barley. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5, 100136.).

Giese, E. C., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., & da Silva, R. (2008). Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1→3;1→6)- β -d-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 953–956. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.038>

Giordano, N. (2017). Microbial growth control in changing environments: theoretical and experimental study of resource allocation in *Escherichia coli* (Doctoral dissertation, Université Grenoble Alpes).

Guo, X., Kang, J., Xu, Z., Guo, Q., Zhang, L., Ning, H., & Cui, S. W. (2021). Triple-helix polysaccharides: Formation mechanisms and analytical methods. *Carbohydrate Polymers*, 262, 117962.

- Gou, Z., Peng, Z., Wang, S., Chen, L., Ma, Z., Kang, Y., & Lei, P. (2023). Efficient production and skincare activity evaluation of schizophyllan, a β -glucan derived from *Schizophyllum commune* NTU-1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 241, 124504.
- Han, M. D., Han, J. S., Hyun, S. H., & Shin, H. W. (2008). Solubilization of water-insoluble beta-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. Author information. *Journal of Environmental Biology*, 2(29), 237. Holliday, R. (1961). The genetics of *ustilago maydis*. *Genetical Research*, 2(2), 204–230. <https://doi.org/10.1017/S0016672300000719>
- He, L., Yan, X., Liang, J., Li, S., He, H., Xiong, Q., & Huang, S. (2018). Comparison of different extraction methods for polysaccharides from *Dendrobium officinale* stem. *Carbohydrate Polymers*, 198, 101-108.
- Hematian-Sourki, A., & Hesarinejad, M. A. (2023). Molecular conformation and dilute solution properties of barley β -glucan: unveiling β -glucan as a highly flexible biopolymer under different processing conditions. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1), 69.
- Hu, Y., Lian, L., Xia, J., Hu, S., Xu, W., Zhu, J., & Zhao, M. W. (2020). Influence of PacC on the environmental stress adaptability and cell wall components of *Ganoderma lucidum*. *Microbiological research*, 230, 126348.
- Hu, X., Yang, P., Chai, C., Liu, J., Sun, H., Wu, Y., & Yu, H. (2023). Structural and mechanistic insights into fungal β -1, 3-glucan synthase FKS1. *Nature*, 616(7955), 190-198.
- Ibrahim, H. K., & Mahdi, M. S. (2020). Antioxidant Effect of Beta-glucan Extract from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 14(4)
- Ina, K., Furuta, R., Kataoka, T., Kayukawa, S., Yoshida, T., Miwa, T., & Takeuchi, Y. (2011). Lentinan prolonged survival in patients with gastric cancer

receiving S-1-based chemotherapy. *World journal of clinical oncology*, 2(10), 339.

Izydorczyk, M. S., & Dexter, J. E. (2008). Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products-a Review. *Food Research International*, 41(9), 850–868. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.04.001>

Izydorczyk, M. S., Storsley, J., Labossiere, D., MacGregor, A. W., & Rossnagel, B. G. (2000). Variation in total and soluble β -glucan content in hulless barley: Effects of thermal, physical, and enzymic treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 982–989. <https://doi.org/10.1021/jf991102f>

Jang, H. Y., Jung, S. J., Park, E. O., Kim, S. D., Kim, J. K., Chae, S. W., & Lee, S. O. (2023). TBG-136, a *Schizophyllum commune*-derived β -glucan benefits gut microbiota and intestinal health: A randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical trial. *Journal of Functional Foods*, 107, 105668.

Jendretzki, A., Wittland, J., Wilk, S., Straede, A., & Heinisch, J. J. (2011). How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. In *European Journal of Cell Biology* (Vol. 90, Issue 9, pp. 740–744). <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.04.006>.

Jenny, S., Vaclav, V., & Michael, A. (2014). β -1,3-glucan anticancer efficacies and synergies: A review. *American Journal of Immunology*, 10(3), 131–143. <https://doi.org/10.3844/ajisp.2014.131.143>.

Joha, Z., & Ergül, M. (2023). Unraveling the Role of Apoptosis in the Antiproliferative Activity of β -Glucan on A549 Cells. *Cumhuriyet Science Journal*, 44(4), 640-644.

Junior, H. J. F., Tallo, F. S., de Góes, R. B., de Oliveira, C. T. F., Nicolau, L. A. D., Arias, A. N., & Menezes-Rodrigues, F. S. (2024). Potential Clinical Benefits And Probable Mechanisms of Action Promoted By A Nutraceutical Obtained By Fermentation And Rich In B-Glucans And Amino Acids for Oncologic Patients. *Journal of Medical Residency Review*, 3(00), e055-e055.

Kaur, R., Sharma, M., Ji, D., Xu, M., & Agyei, D. (2020). Structural features, modification, and functionalities of beta-glucan. In *Fibers* (Vol. 8, Issue 1). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/fib8010001>.

Karficsonyi, S., & Kuniak, L. (1994). Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble fl-D-glucan. *Carbohydrate Polymers*, 24(2), 107–111.

Karaca, H., Bozkurt, O., Ozaslan, E., Baldane, S., Berk, V., Inanc, M., & Ozkan, M. (2014). Positive effects of oral β -glucan on mucositis and leukopenia in colorectal cancer patients receiving adjuvant FOLFOX-4 combination chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(8), 3641-3644.

Khan, A. A., Gani, A., Masoodi, F. A., Amin, F., Wani, I. A., Khanday, F. A., & Gani, A. (2016). Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of β -d-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)—Effect of γ -irradiation. *Carbohydrate polymers*, 140, 442-450.

Khan, A. A., Gani, A., Masoodi, F. A., Mushtaq, U., & Naik, A. S. (2017). Structural, rheological, antioxidant, and functional properties of β -glucan extracted from edible mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Coprinus attrimentarius*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 11, 67-74.

Kim, Y. M., & Park, J. H. (2006). Purification and Chemical Characterization of Laminaran from *Eisenia bicyclis* in Korea. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 1(35), 78–86.

Kim, H. J., & White, P. J. (2011). Optimizing the molecular weight of oat β -glucan for in vitro bile acid binding and fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(18), 10322-10328.

- Kono, H., Kondo, N., Isono, T., Ogata, M., & Hirabayashi, K. (2020). Characterization of the secondary structure and order–disorder transition of a β -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-glucan from *Aureobasidium pullulans*. *International journal of biological macromolecules*, 154, 1382-1391.
- Kopiasz, Ł., Dziendzikowska, K., Oczkowski, M., Harasym, J., & Gromadzka-Ostrowska, J. (2024). Low-molar-mass oat beta-glucan impacts autophagy and apoptosis in early stages of induced colorectal carcinogenesis in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127832.
- Kurita, T., Noda, Y., Takagi, T., Osumi, M., & Yoda, K. (2011). Kre6 protein essential for yeast cell wall β -1, 6-glucan synthesis accumulates at sites of polarized growth. *Journal of biological chemistry*, 286(9), 7429-7438.
- Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G. (2007). Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. In *Journal of Cereal Science* (Vol. 46, Issue 2, pp. 101–118). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.05.003>
- Lee, S. Y., & Ra, C. H. (2022). Comparison of liquid and solid-state fermentation processes for the production of enzymes and beta-glucan from hulled barley. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 317.
- Li, W., Cui, S. W., & Wang, Q. (2006). Solution and conformational properties of wheat β -D-glucans studied by light scattering and viscometry. *Biomacromolecules*, 7(2), 446-452.
- Li, S., Huang, Y., Wang, S., Xu, X., & Zhang, L. (2014). Determination of the triple helical chain conformation of β -glucan by facile and reliable triple-detector size exclusion chromatography. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(3), 668-675.
- Li, Y., Wan, J., Gao, H., & Yang, X. (2023a). Production of Curdlan by *Agrobacterium sp.* DH-2 Using Sugarcane Molasses-Based Medium. *Journal of Polymers and the Environment*, 1-11.

- Li, J., Chen, Z., Shi, H., Yu, J., Huang, G., & Huang, H. (2023b). Ultrasound-assisted extraction and properties of polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 93, 106295.
- Liu, H., Li, Y., You, M., & Liu, X. (2021). Comparison of physicochemical properties of β -glucans extracted from hull-less barley bran by different methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 1192-1199.
- 毛自朝, 杨发祥, 李兴义, & 尚海丽. (2012). High-curdlan-yield strain and preparation method thereof [Patent]. China: CN102296045A.
- Ma, Z., Wang, J., Zhang, L., Zhang, Y., & Ding, K. (2010). Evaluation of water soluble β -D-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent. *Carbohydrate polymers*, 80(3), 977-983.
- Majtan, J., & Jesenak, M. (2018). β -Glucans: Multi-functional modulator of wound healing. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23040806>
- Mantovani, M. S., Bellini, M. F., Angeli, J. P. F., Oliveira, R. J., Silva, A. F., & Ribeiro, L. R. (2008). B-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 658, Issue 3, pp. 154–161). <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.07.002>
- Markovina, N., Banjari, I., Bucevic Popovic, V., Jelicic Kadic, A., & Puljak, L. (2020). Efficacy and safety of oral and inhalation commercial beta-glucan products: Systematic review of randomized controlled trials. In *Clinical Nutrition* (Vol. 39, Issue 1, pp. 40–48). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.01.003>
- Miyamoto, T., Murphy, B., Manning, B., Kannan, T., Claiborne, D., Zhang, R., & Zhang, N. (2023). 1101 Activation of myeloid cells suppresses metastatic ovarian cancer via tumoricidal neutrophils and IL-27-secreting macrophages.

Mohammadi, A., Shojaosadati, S. A., Tehrani, H. J., Mousavi, S. M., Saleh, T., & Khorasani, A. C. (2018). Schizophyllan production by newly isolated fungus *Schizophyllum commune* IBRC-M 30213: optimization of culture medium using response surface methodology. *Annals of Microbiology*, 68(1), 47–62. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1316-9>

Mohd-Jamil, N. A., Rahmad, N., Mohd Nor Rashid, N., Mohd Yusoff, M. H. Y., Shaharuddin, N. S., & Mohd Saleh, N. (2013). LCMS-QTOF Determination of Lentinan-Like β -D-Glucan Content Isolated by Hot Water and Alkaline Solution from Tiger's Milk Mushroom, Termite Mushroom, and Selected Local Market Mushrooms. *Journal of Mycology*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/718963>

Mordor Intelligence. (2024). Tamaño del mercado de beta glucano y análisis de participación tendencias de crecimiento y pronósticos (2024-2029). Recuperado el 20 de Mayo de 2024, de <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/beta-glucan-market>.

Murphy, E. J., Rezoagli, E., Collins, C., Saha, S. K., Major, I., & Murray, P. (2023). Sustainable Production and Pharmaceutical Applications of β -glucan from Microbial Sources. *Microbiological Research*, 127424.

Navarro, M. V., de Barros, Y. N., Segura, W. D., Chaves, A. F. A., Jannuzzi, G. P., Ferreira, K. S., Xander, P., & Batista, W. L. (2021). The role of dimorphism regulating histidine kinase (Drk1) in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall. *Journal of Fungi*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/jof7121014>.

Novak, M., & Vetvicka, V. (2009). Glucans as Biological Response Modifiers. In *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets* (Vol. 9).

O'Shea, J. J., Gadina, M., & Siegel, R. M. (2019). Cytokines and cytokine receptors. In *Clinical immunology* (pp. 127-155). Elsevier.

Ohno, N., Asada, N., Adachi, Y. and Yadomae, T. (1995). LPS enhancement triggered TNF- α (tumor necrosis factor- α) production via (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucans in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(1), 126-133.

Olicón-Hernández, D. R., Araiza-Villanueva, M. G., Pardo, J. P., Aranda, E., & Guerra-Sánchez, G. (2019). New insights of *Ustilago maydis* as yeast model for genetic and biotechnological research: A review. *Current Microbiology*, 76, 917-926.

Oliveira, R. J., Matuo, R., Da Silva, A. F., Matiazi, H. J., Mantovani, M. S., & Ribeiro, L. R. (2007). Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicology in vitro*, 21(1), 41-52.

Padder, S. A., Prasad, R., & Shah, A. H. (2018). Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. In *Microbiological Research* (Vol. 210, pp. 51–58). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.03.007>

Pengkumsri, N., Sivamaruthi, B. S., Sirilun, S., Peerajan, S., Kesika, P., Chaiyasut, K., & Chaiyasut, C. (2016). Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Science and Technology*, 37, 124-130.

Pérez-Bassart, Z., Bäuerl, C., Fabra, M. J., Martínez-Abad, A., Collado, M. C., & López-Rubio, A. (2023). Composition, structural properties and immunomodulatory activity of several aqueous *Pleurotus* β -glucan-rich extracts. *International journal of biological macromolecules*, 253, 127255.

Pérez-Rodríguez, F., González-Prieto, J. M., Vera-Núñez, J. A., Ruiz-Medrano, R., Peña-Cabriales, J. J., & Ruiz-Herrera, J. (2021). Wide distribution of the *Ustilago maydis*-bacterium endosymbiosis in naturally infected maize plants. *Plant Signaling & Behavior*, 16(2), 1855016.

Qu, X., Nazarenko, Y., Yang, W., Nie, Y., Zhang, Y., & Li, B. (2021). Effect of oat β -glucan on the rheological characteristics and microstructure of set-type yogurt. *Molecules*, 26(16), 4752.

Quezada-Correa, L., Martínez-Mora, E., Matute-Castro, L., Bravo-Bravo, V., & Ramírez-Moreno, E. (2017). β -Glucanos en almidón nativo de fruta pan y su potencial uso en alimentos funcionales. *Revista Ciencia Unemi*, 10(24), 82-87.)

Reyes-Becerril, M., Angulo, M., Sanchez, V., Guluarte, C., & Angulo, C. (2020). β -D-glucan from marine yeast *Debaryomyces hansenii* BCS004 enhanced intestinal health and glucan-expressed receptor genes in Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Microbial Pathogenesis*, 143, 104141.

Richter, J., Svozil, V., Král, V., Dobiášová, L. R., & Vetvicka, V. (2015). β -glucan affects mucosal immunity in children with chronic respiratory problems under physical stress: Clinical trials. *Annals of Translational Medicine*, 3(4).
<https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.20>

Richter, J., Kral, V., Pohorska, J., Dobiasova, L. R., & Vetvicka, V. (2016). Effects of b-glucan on natural killer cells in patients recovering from cancer treatment: Clinical trial. *International Journal of Clinical and Experimental Medical Sciences*, 2(2), 26-30.

Roemer, T., & Bussey, H. (1991). Yeast beta-glucan synthesis: KRE6 encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis in vivo and for glucan synthase activity *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(24), 11295-11299.

Romero-Jiménez, P. (2023). Evaluación de la dosis de un fármaco en células tumorales. Tesis licenciatura. Universidad Politécnica de Madrid.

Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C., Vera-Núñez, A., Sánchez-Arreguín, A., Ruiz-Medrano, R., Salgado-Lugo, H., & Peña-Cabriaes, J. J. (2015). A novel

intracellular nitrogen-fixing symbiosis made by *Ustilago maydis* and *Bacillus spp.* *New Phytologist*, 207(3), 769-777.)

Ruppel, H. G., Baeumer, D., & Kahmann, U. (2000). Process for the production of paramylon (β -1,3-glucan) in *Euglena gracilis* and use of the paramylon thus produced as film or as packaging material [Patente DE19734389C2]. Espacenet. URL:<https://patents.google.com/patent/DE19734389C2/en?q=paramylon>

Saeedian, K., Shojaosadati, S. A., Zamir, S. M., & Mohammadi, A. (2022). Increasing-Aeration Strategy: a Practical Approach to Enhance the Schizophyllan Production and Improve the Operational Conditions of *Schizophyllum commune* Cultivation in the Stirred Tank and Bubble Column Bioreactors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(5), 2284-2300.).

Saitô, H., Ohki, T., & Sasaki, T. (1979). A ^{13}C -nuclear magnetic resonance study of polysaccharide gels. Molecular architecture in the gels consisting of fungal, branched (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans (lentinan and schizophyllan) as manifested by conformational changes induced by sodium hydroxide. *Carbohydrate Research*, 74(1), 227-240.

Sakdasri, W., Arnutpongchai, P., Phonsavat, S., Bumrungthaichaichan, E., & Sawangkeaw, R. (2022). Pressurized hot water extraction of crude polysaccharides, β -glucan, and phenolic compounds from dried gray oyster mushroom. *LWT*, 168, 113895.

Sánchez-Castillo, G. (2023). Extracción, purificación y cuantificación de metabolitos de mutantes de *Ustilago maydis* (Stevenson and Jonhson 1944)(Ustilaginales, Ustilaginacea) (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Schimoler-O'Rourke, R., Renault, S., Mo, W., & Selitrennikoff, C. P. (2003). Neurospora crassa FKS protein binds to the (1,3) β -glucan synthase substrate, UDP-glucose. *Current Microbiology*, 46(6), 408–412. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3884-5>

- Selbmann, L., Stingele, F., & Petruccioli, M. (2003). Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. In *Antonie van Leeuwenhoek* (Vol. 84).
- Shih, I. L., Yu, J. Y., Hsieh, C., & Wu, J. Y. (2009). Production and characterization of curdlan by *Agrobacterium* sp. *Biochemical Engineering Journal*, 43(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.08.006>
- Smiderle, F. R., Carbonero, E. R., Mellinger, C. G., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2006). Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry*, 67(19), 2189–2196. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.022>.
- Song, G., & Du, Q. (2010). Isolation of a polysaccharide with anticancer activity from *Auricularia polytricha* using high-speed countercurrent chromatography with an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography A*, 1217(38), 5930–5934. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.036>.
- Song, G., & Du, Q. (2012). Structure characterisation of a α β -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha*. *Natural Product Research*, 26(21), 1963–1970. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.633080>
- Sridhar, K., & Kaur, R. (2023). β -Glucan. In *Valorization of Biomass to Bioproducts* (pp. 27-43). Elsevier. CAPITULO 2)
- Stier, H., Ebbeskotte, V., & Gruenwald, J. (2014). Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta1,3/1,6-D-glucan. In *Nutrition Journal* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-38>.
- Tada, R., Tanioka, A., Iwasawa, H., Hatashima, K., Shoji, Y., Ishibashi, K. I., Adachi, Y., Yamazaki, M., Tsubaki, K., & Ohno, N. (2008). Structural characterisation and biological activities of a unique type β -D-glucan obtained from *Aureobasidium pullulans*. *Glycoconjugate Journal*, 25(9), 851–861. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9147-3>

Tang, Z., & Huang, G. (2022). Extraction, structure, and activity of polysaccharide from *Radix astragali*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 113015.

Tekin-Cakmak, Z. H., Ozer, C., Ozkan, K., Yildirim, H., Sestili, F., Jilal, A., & Koksel, H. (2024). High-beta-glucan and low-glycemic index functional bulgur produced from high-beta-glucan barley. *Journal of Functional Foods*, 112, 105939.

Ungureanu-Iuga, M., & Avrămia, I. (2024). Pasta fortified with β -glucan Isolated from brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by-product. *Journal of Cereal Science*, 115, 103818.

Utama, G. L., Dio, C., Sulistiyo, J., Chye, F. Y., Lembong, E., Cahyana, Y., & Singh, S. (2021). Evaluating comparative β -glucan production aptitude of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Xanthomonas campestris*, and *Bacillus natto*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 6765-6773.

Tong, L. L., Wang, Y., Yuan, L., Liu, M. Z., Du, Y. H., Mu, X. Y., & Guo, D. S. (2022). Enhancement of polysaccharides production using microparticle enhanced technology by *Paraisaria dubia*. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 12.

Vannucci, L., Šíma, P., Vetvicka, V., & Křížan, J. (2017). Lentinan properties in anticancer therapy: A review on the last 12-year literature. *American Journal of Immunology*, 13(1), 50–61. <https://doi.org/10.3844/ajisp.2017.50.61>

Velebný, V., Hrdina, V., Šuláková, R., Mlcochová, R., Holas, P., Kremár, T., & Martin. (2008). Polysaccharide modification process [Patente CZ2006605A3]. Espacenet.

URL:

[https://patents.google.com/patent/CZ2006605A3/en?q=\(Schizophylan\)](https://patents.google.com/patent/CZ2006605A3/en?q=(Schizophylan)).

Vetter, J. (2023). The Mushroom Glucans: Molecules of High Biological and Medicinal Importance. *Foods*, 12(5), 1009.

Villares, A. (2013). Polysaccharides from the edible mushroom *Calocybe gambosa*: Structure and chain conformation of a (1→4),(1→6)-linked glucan.

Carbohydrate Research, 375, 153–157.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.04.017>

Wagener, J., Striegler, K., & Wagener, N. (2020). α -and β -1,3-Glucan Synthesis and Remodeling. The Fungal Cell Wall: An Armour and a Weapon for Human Fungal Pathogens, 53–82.

Wan, W., & Xu, B. (2018). Development of an orange juice beverage formulated with oat beta-glucan and whey protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(12), 4685-4691.

Wang, D., Zhu, C., Zhang, G., Wang, C., & Wei, G. (2020). Enhanced β -glucan and pullulan production by *Aureobasidium pullulans* with zinc sulfate supplementation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1751–1760.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10326-y>

Wang, Y., Xiong, X., & Huang, G. (2023). Ultrasound-assisted extraction and analysis of maidenhairtree polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*, 95, 106395.

Wieser, J. A., Bell, J. M., & Sarnat, R. L. (2016). Process for preparing medicinal mycological preparations [Patente US10092609B2]. Google Patents. URL: [https://patents.google.com/patent/US10092609B2/en?q=\(lentinano+leninu+edodes\)](https://patents.google.com/patent/US10092609B2/en?q=(lentinano+leninu+edodes))

Xu, S., Xu, X., & Zhang, L. (2013). Effect of heating on chain conformation of branched β -glucan in water. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(28), 8370-8377.

Xu, H., Zou, S., Xu, X., & Zhang, L. (2016). Anti-tumor effect of β -glucan from *Lentinus edodes* and the underlying mechanism. *Scientific reports*, 6(1), 28802.

张佳婵, 王昌涛, 马玉涵, 李萌, 赵丹, & 王倩. (2020). Novel *ganoderma lucidum* strain, *ganoderma lucidum* polysaccharide prepared based on *ganoderma lucidum* strain and anti-aging cosmetic [Patente CN111454844A]. Espacenet. URL:

[https://patents.google.com/patent/CN111454844A/en?q=\(ganoderma+lucidum+Gl+I.](https://patents.google.com/patent/CN111454844A/en?q=(ganoderma+lucidum+Gl+I.)

Yu, C., Chen, H., Du, D., Lv, W., Li, S., Li, D., & Liu, D. (2021). β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* alleviates oxidative stress in LPS-stimulated RAW264. 7 cells via Dectin-1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Cell Stress and Chaperones*, 26, 629-637.

Zechner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Gospodarić, I., Sajli, L., Đaković, S., & Filipović-Grčić, J. (2010). Characterization of β -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 189-197.

Zhang, L., Li, X., Xu, X., & Zeng, F. (2005). Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydrate Research*, 340(8), 1515-1521.

Zhang, K., Lin, C., Zhao, S., Wang, W., Zhou, W., Ru, X., & Yang, Q. (2023). The role of pH transcription factor Appacc in upregulation of pullulan biosynthesis in *Aureobasidium pullulans* using potato waste as a substrate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124797.

Zhang, H., Nie, S., Guo, Q., Wang, Q., Cui, S. W., & Xie, M. (2018). Conformational properties of a bioactive polysaccharide from *Ganoderma atrum* by light scattering and molecular modeling. *Food Hydrocolloids*, 84, 16-25.

Zhang, B., Zhang, Z., Lyu, X., & Zhao, W. (2022). Structural characterization of a water-soluble and antimicrobial β -glucan secreted by *Rhizobium pusense*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134(4), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.06.015>

Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., & Cheung, P. C. K. (2011). Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 25, Issue 2, pp. 196– 206). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.02.001>

Zheng, X., Lu, F., Xu, X., & Zhang, L. (2017). Extended chain conformation of β -glucan and its effect on antitumor activity. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(28), 5623-5631.

Zhu, F., Du, B., & Xu, B. (2016). A critical review on production and industrial applications of betaglucans. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 52, pp. 275–288). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.00>