



lutega



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



DEPUTACIÓN
PONTEVEDRA

PROYECTO PILOTO

EMPLEO DE MODELOS MATEMÁTICOS EN

PRODUCTOS NUTRACÉUTICOS A BASE DE TÉ Y

LÚPULO

FEADER 2021/026A

Informe de resultados final

ORBALLO

Julio de 2023



**AXENCIA GALEGA
DA CALIDADE
ALIMENTARIA**

ÍNDICE

ACTIVIDAD 1. COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA Y ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES SALUDABLES DE LAS MATERIAS PRIMAS.	2
Actividad 1.1. Análisis fitoquímico y parámetros de influencia en el contenido de principios bioactivos.	2
Actividad 1.2. Análisis estacional de la fitoquímica de las especies objeto de estudio.	9
Actividad 1.3. Análisis de las propiedades saludables de la materia prima en bruto.....	15
 ACTIVIDAD 2. DESARROLLO DE UN PROCESO DE TRATAMIENTO BASADO EN MODELOS FERMENTATIVOS PARA AMBAS ESPECIES.....	24
Actividad 2.1. Estudios individualizados de procesos de fermentativos para potenciar la presencia de metabolitos funcionales.	24
Actividad 2.2. Desarrollo de procesos fermentativos de mezclas de materias primas y mejora de su bioactividad.	41
 ACTIVIDAD 3. ENSAYOS DE OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DE PROCESO Y COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DEL PRODUCTO FINAL.....	42
Actividad 3.1. Optimización del contenido en L-teanina de las hojas de té.	42
Actividad 3.2. Optimización de las variables del proceso fermentativo.....	46
Actividad 3.3. Empleo de modelos matemáticos para la obtención de mezclas sinérgicas.	46
 ACTIVIDAD 4. ESCALADO DEL PROCESO A NIVEL PILOTO.	60
Actividad 4.1. Estudios de escalado, parámetros de influencia.....	60
Actividad 4.2. Estudios de caracterización del producto final.	64
 REFERENCIAS.....	66

ACTIVIDAD 1. COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA Y ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES SALUDABLES DE LAS MATERIAS PRIMAS.

Actividad 1.1. Análisis fitoquímico y parámetros de influencia en el contenido de principios bioactivos.

En esta primera etapa se realizó un análisis de materia prima evaluando el contenido polifenólico de las diferentes materias primas para obtener una primera aproximación de la potencial presencia de compuestos bioactivos.

GLECEX (Global and Ecofriendly Natural Extracts S.L.) ha puesto a punto un ensayo espectrofotométrico que permite determinar el contenido total en compuestos polifenólicos de las materias primas proporcionadas por ORBALLO (Orballo Innovaciones Forestales S.L.) y LUTEGA (Lúpulo Tecnología De Galicia, S.C.G.).

Ensayo de FolinCiocalteu: este ensayo espectrofotométrico (Folin y Ciocalteu, 1927; Singleton y Rossi, 1965) ha sido actualizado por investigadores a lo largo de los años y se ha adaptado para realizar las lecturas en un lector de microplacas (equipo SpectraMax M2 de Molecular Devices). Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de FolinCiocalteu a pH básico y se oxidan dando lugar a una coloración azul (cromógenos de tungsteno y molibdeno) susceptible de una determinación espectrofotométrica a 765nm. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg GAE/g muestra).

Muestras proporcionadas por ORBALLO y LUTEGA:

- Hojas de *Camelliasinensis* procesadas (té)
- Hojas de poda de *Camelliasinensis*
- Lúpulo en flor deshidratada/molido en formato flor y pellet codificadas como: Pellet Nº1, Pellet Nº2, Pellet Nº3, Pellet Nº4, Pellet Nº5, Pellet Nº6, Pellet Nº7, Pellet Nº8, Pellet Nº9, Pellet Nº10, Pellet Nº11, Pellet Nº12, Pellet Nº15, Pellet Nº2 Nugget, Flor Nº4 Nugget, Flor Nº5 Cascade, Flor Nº 7 Magnum
- Hojas de lúpulo de variedad Nugget
- Semillas Nº8 variedad Nugget
- Hojas y tallos de trepa de lúpulo de variedad Nugget

Se realizaron las primeras determinaciones del contenido fenólico en hojas de té (*Camelliasinensis*) proporcionadas por ORBALLO. Las hojas de té presentan un contenido polifenólico del 25,4%.

El contenido polifenólico de las muestras de lúpulo es muy inferior al de las hojas de té, tal y como se muestra en la **figura 1**. Las hojas de lúpulo tienen un contenido polifenólico de un 0,3%, seguido de la semillas con un 1,2%, la muestra de trepa con un 1,3%, siendo el contenido en las muestras de la flor del lúpulo en torno al 4,2-7,5%. Además el contenido polifenólico en las muestras en formato flor es inferior a aquellas en pellet.

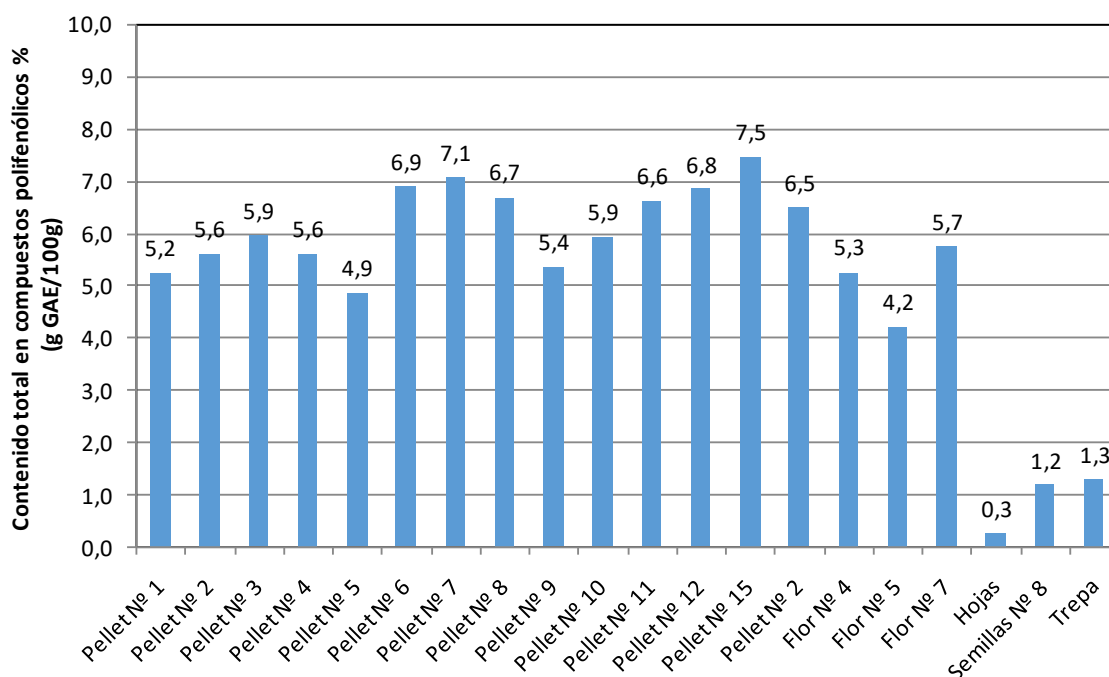


Figura 1. Contenido total en compuestos polifenólicos de las muestras de lúpulo.

Los brotes de *Camellia sinensis*(L.) O. Kuntze, se utilizan para la elaboración de los diferentes tipos de té, que se obtienen mediante diferentes técnicas de procesado. Básicamente existen, según su nivel de oxidación existen 3 tipos de té: no oxidado (blanco y verde), parcialmente oxidado (Oolong) y totalmente oxidado (negro), en el que se incluye también el fermentado (rojo o pu-erh). En la actualidad, más de 3 mil personas consumen esta bebida milenaria en todo el mundo entre otras razones por sus efectos beneficiosos para la salud humana. El consumo de los diferentes tipos de té se ha asociado con propiedades antioxidantes, antidiabéticas, anticancerígenas y protectoras del sistema nervioso y cardiovascular. Estas propiedades se deben a un gran abanico de compuestos químicos entre los que se incluyen compuestos fenólicos, alcaloides, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas hidrosolubles, saponinas, etc.

En las últimas décadas, se ha estudiado en detalle la variación estacional de los metabolitos secundarios presentes en los brotes de té ya que estos compuestos influyen en la calidad final del té, pudiendo afectar a su sabor, aroma, color y textura, así como a sus propiedades beneficiosas para la salud humana. Entre ellos, los principales metabolitos secundarios

estudiados en los brotes de *C. sinensis* son compuestos fenólicos, alcaloides y el aminoácido no proteico L-teanina, por su abundancia y su importante contribución a las características organolépticas del té.

Cada tipo de metabolito secundario o clase estructural de compuestos confiere unas determinadas propiedades organolépticas al té. Los compuestos fenólicos destacan por su abundancia en los brotes y en los diferentes tipos de té y son los principales responsables de aportar a la infusión de té una gran capacidad antioxidante. En concreto, las catequinas son los compuestos fenólicos más abundantes ya que pueden llegar a suponer hasta el 30% del peso seco de la hoja de *C. sinensis*. Existen 8 formas diferentes de catequinas (**figura 2**): epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epigallocatequina galato (EGCG), catequina (C), galocatequina (GC), catequina galato (CG) y galocatequina galato (GCG). Cada tipo de flavan-3-ol o catequina, tiene diferentes propiedades antioxidantes, así como confiere diferentes propiedades a las infusiones del té. En conjunto este tipo de flavonoides son los principales compuestos responsables de hasta un 70% de la astringencia y amargor del té, así como están asociados con la formación de compuestos poliméricos como las teaflavinas y tearubiginas, que aportan un color rojizo-negro en los té oxidados enzimáticamente. Asimismo, estos compuestos son beneficiosos para la salud gracias a su elevada capacidad antioxidante entre otras propiedades.

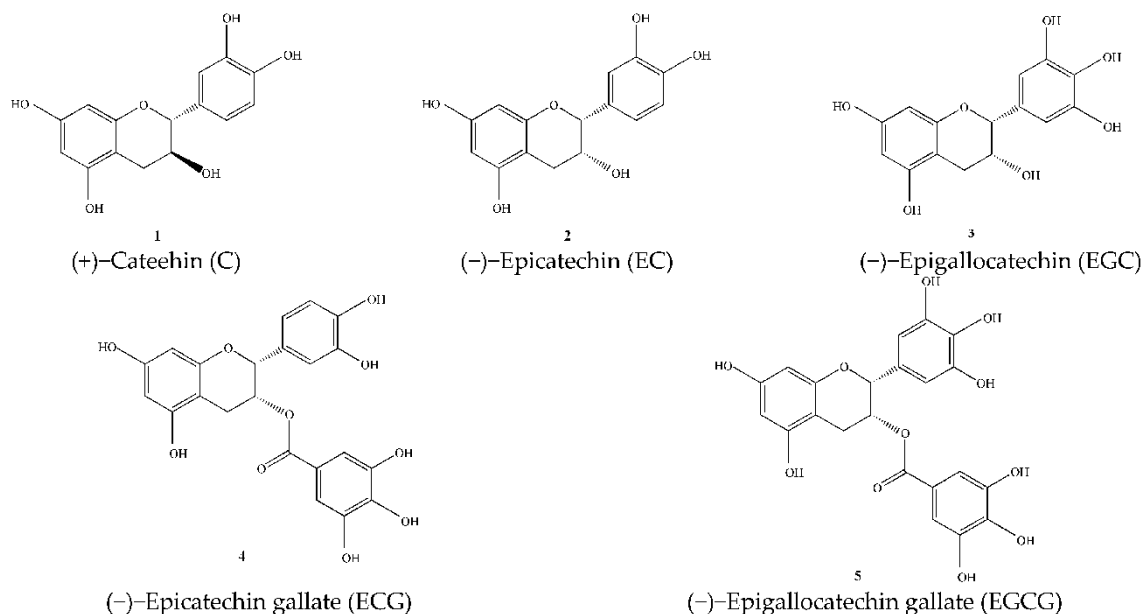


Figura 2. Estructura química de las principales catequinas en los brotes de *C. sinensis* (Zhao, Li, Wang, & Song, 2022).

Otros compuestos fenólicos como el ácido gálico también están presentes en elevadas cantidades en los brotes de *C. sinensis* y en consecuencia en los diferentes tipos de té (**figura 3**). Este compuesto fenólico se agrupa dentro del grupo de los ácidos fenólicos.

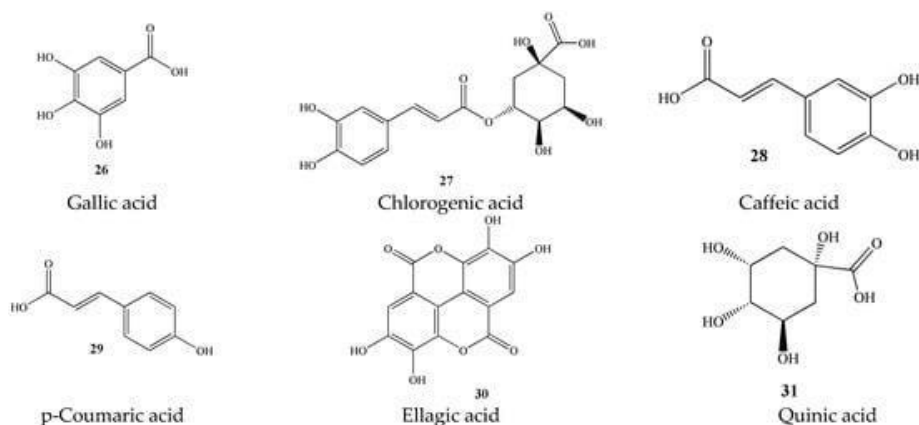


Figura 3. Estructura química de los principales ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos y otros compuestos fenólicos presentes en los brotes de *C. sinensis* (Zhao et al., 2022).

Los alcaloides mayoritarios presentes en los brotes de té, son del tipo metilxantina y son principalmente la cafeína y la teobromina, aunque existen otros menos abundantes como la teofilina (**figura 4**). La cafeína es el principal alcaloide del té, ya que puede suponer entre un 1 y un 3% del peso seco de la hoja de té. Entre sus efectos este tipo de alcaloide aporta al té un sabor amargo, así como se asocian con el efecto estimulante de la infusión de té.

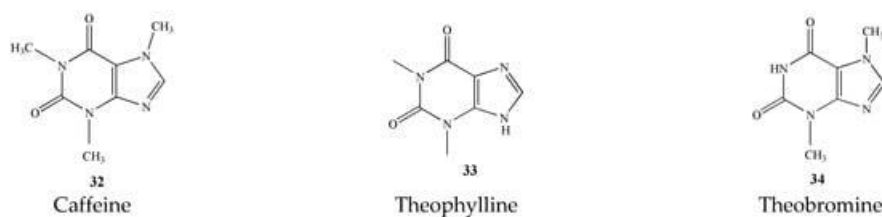


Figura 4. Estructura química de los principales alcaloides del tipo metilxantina encontrados en los brotes de té (Zhao et al., 2022).

Los aminoácidos son compuestos que afectan a la calidad final del té en gran medida ya que están involucrados en la formación de los compuestos del aroma del té, así como influyen en gran medida al gusto de la infusión (**figura 5**). Estos compuestos pueden suponer entre un 1 y 4% del peso seco de la hoja de *C. sinensis* aproximadamente. El aminoácido no proteico L-teanina (5-N-etilglutamina, Thea) representa entre el 50 y 80% del total de aminoácidos de forma general, aunque su contenido se ve fuertemente influenciado por la variedad y genotipo de *C. sinensis*, las prácticas de cultivo, el clima, la región geográfica y la forma de procesado de los brotes de té. Este aminoácido está asociado con el sabor “umami” de las infusiones de té, por lo que es uno de los factores que influyen en gran medida en la calidad y el precio de venta del té. Además de influir en el sabor y aroma, este aminoácido tiene propiedades beneficiosas para la salud humana, mejorando la concentración y produciendo efectos que reducen el estrés y la ansiedad, así como estimulando el sistema inmunitario.

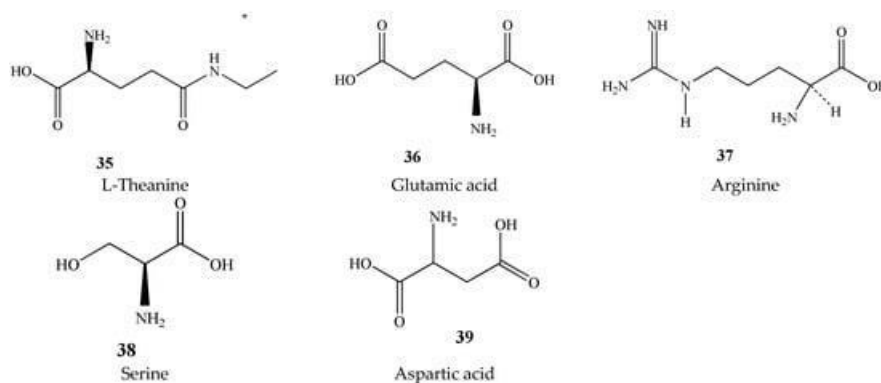


Figura 5. Estructura química de los principales aminoácidos presentes en los brotes de *C. sinensis* (Zhao et al., 2022)

Debido a este amplio abanico de compuestos bioactivos, con elevado potencial nutracéutico considerable, varían su contenido en los brotes de *C. sinensis* en función de múltiples factores ambientales, el objetivo de esta actividad realizada por AREEIRO (Estación Fitopatológica Areeiro) es estudiar la presencia de estos compuestos bioactivos en los brotes de *C. sinensis* cultivadas en Galicia (España) y entender cómo varían estos compuestos a lo largo de los meses de brotación, ya que dicha variación afectará a las propiedades organolépticas y al potencial nutracéutico del té elaborado. Asimismo, la segunda parte de este proyecto tiene como objetivo la producción en condiciones *in vitro* de L-teanina mediante el cultivo de células desdiferenciadas y de hairyroots.

Por esto mismo, la actividad 1.1. se ha centrado en el estudio del contenido de compuestos fenólicos, alcaloides y de L-teanina en los brotes de dos genotipos de *C. sinensis* crecidos en la plantación experimental de AREEIRO durante el año 2021. Durante los meses de brotación (marzo-septiembre), se cosecharon los brotes tiernos de *C. sinensis* durante la última semana de cada mes (**figura 6**). Los brotes se secaron en estufa a 60°C hasta peso constante y se conservaron a -80°C hasta su posterior procesado y análisis.



Figura 6. Brotes de los genotipos 1 (A, C) y 2 (B, D) de *C. sinensis* en junio de 2021.

Se realizó una extracción metanólica para el análisis de los compuestos fenólicos y alcaloides siguiendo la norma BS ISO 14502-2:2005, 2006 y una extracción acuosa para el análisis del aminoácido L-teanina. En el caso de las extracciones acuosas, se realizó una derivatización precolumna de los aminoácidos extraídos, con el fin de hacer reaccionar los aminoácidos con el compuesto fenilisotiocianato (PITC) y que de esta forma el aminoácido derivatizado pueda ser detectado por absorbancia ultravioleta.

El análisis de los compuestos bioactivos de los brotes de té se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con un cromatógrafo Varian 920-LC equipado con un detector de matriz de fotodiodos (DAD) y una fase estacionaria C18 de 250x4,6 mm y 5 μ m de tamaño de partícula.

En ambos métodos, la identificación de los compuestos bioactivos se realizó comparando el tiempo de retención y el espectro de absorción en el rango de UV de estándares de alta pureza con los de las muestras analizadas. La calibración se realizó pinchando entre 4 o 5 concentraciones diferentes de cada compuesto y obteniendo en todos los casos una recta de calibrado con un coeficiente de determinación mayor a 0,995, salvo para los flavonoles estudiados que fue mayor a 0,98.

Los resultados se muestran como el promedio y el error estándar de la concentración de cada compuesto, expresado en miligramos por gramo de peso seco. Los valores del estudio son una media de los dos genotipos de *C. sinensis* estudiados, de los que se han realizado tres extracciones independientes por genotipo.

Identificación de compuestos bioactivos en los brotes de *C. sinensis*.

Mediante cromatografía líquida de alta eficacia se han identificado un total de 14 compuestos bioactivos en los brotes de *C. sinensis* crecidos en AREEIRO (**tabla 1**).

Se identificaron 6 de las 8 catequinas principales presentes en el té: epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epigallocatequina galato (EGCG), catequina (C) y catequina galato (CG). Durante los meses de cosecha de *C. sinensis* no se detectaron galocatequina (GC) ni galocatequina galato (GCG) en los brotes recolectados, por lo que el contenido total de catequinas (CT) es la suma de las catequinas identificadas.

Se identificaron también otros flavonoides como los flavonoles quercetina (Q), quercetina-3-O-glucósido (Q-glu) y rutina (Q-rut), así como flavanonanaringenina (N), molécula precursora tanto de las catequinas como de los flavonoles anteriormente nombrados. Sin embargo, sería necesario corroborar la presencia de flavanona y de los flavonoles identificados mediante otras técnicas, como la espectrometría de masas, ya que estas moléculas suelen unirse a diferentes residuos de azúcar y pueden tener un comportamiento similar durante el análisis cromatográfico, dando lugar a similares tiempos de retención y espectros de absorción.

En los brotes de *C. sinensis* también se identificaron ácido gálico (GA) y dos alcaloides del tipo metilxantina: cafeína (CAF) y teobromina (TB). Por último, se detectó la presencia del aminoácido no proteico L-teanina.

Tabla 1. Listado de compuestos identificados por HPLC en los brotes de *C. sinensis* crecidos en Pontevedra

Compuestos identificados	Abreviatura	Tipo de metabolito
Ácido Gálico	GA	Ácido fenólico
Epicatequina	EC	Flavonoide, catequina
Epigallocatequina	EGC	Flavonoide, catequina
Epicatequina galato	ECG	Flavonoide, catequina
Epigallocatequina galato	EGCG	Flavonoide, catequina
Catequina	C	Flavonoide, catequina
Catequina galato	CG	Flavonoide, catequina
Quercetina	Q	Flavonoide, flavonol
Quercetina-3-O-glucósido	Q-glu	Flavonoide, flavonol
Rutina	Q-rut	Flavonoide, flavonol
Naringenina	N	Flavonoide, flavanona
Cafeína	CAF	Alcaloide metilxantina
Teobromina	TB	Alcaloide metilxantina
L-teanina	Thea	Aminoácido no proteico

Actividad 1.2. Análisis estacional de la fitoquímica de las especies objeto de estudio.

A lo largo de la primera anualidad del proyecto se han ido realizando recolecciones de hoja de té para realizar un seguimiento de los principales principios activos de interés, los compuestos polifenólicos.

Las condiciones ambientales pueden influir en la composición química y en la capacidad antioxidante del cultivo. La composición química de la planta es variable atendiendo a diferentes factores que están íntimamente relacionados con el desarrollo de la planta como son, entre otros, los factores edafo-climáticos, las condiciones medioambientales y del suelo, la fecha en la que se procede a la siega o recolección del material vegetal y el estrés abiótico sufrido por la planta. En condiciones adversas la planta genera antioxidantes, fitoquímicos, compuestos fenólicos, como medio de defensa. Diversos estudios han demostrado que la síntesis de polifenoles es favorecida por las condiciones de estrés a las cuales las especies vegetales se ven expuestas en climas adversos o de estrés (Iglesias y col., 1999). Además, varios estudios han reportado una alta correlación entre la actividad antioxidante y sus contenidos polifenólicos (Ruiz y col., 2010); aunque cabe mencionar que cada especie vegetal tiene su propio comportamiento en la síntesis de compuestos bioactivos, ya que incluso especies vegetales genéticamente idénticas que crecen en lugares y condiciones distintas presentan notables diferencias (Iglesias y col., 1999).

Por todo ello, se estudia la influencia de diversos factores (condiciones ambientales, momento de recogida de las hojas, etc.) en la composición química (contenido fenólico) y la capacidad antioxidante ($H-ORAC_{FL}$) de las hojas de té.

La **imagen 1** muestra las cinco zonas de estudio:

- Zona 0. Se corresponde con las ejemplares más adultos, plantados a finales de 2014-principios 2015.
- Zona 1. Se corresponde con las ejemplares plantados en la campaña 2016-2017.

Estas dos zonas se corresponden con una parte de la parcela donde la exposición al sol es mayor, zona más seca, suelo de peor calidad, más compactado, menor humedad ambiental, y por lo tanto un ambiente más agresivo para las plantas.

- Zona 2. Se corresponde con las ejemplares más jóvenes, plantados en los años 2018-2019. Se podría considerar como una zona de transición, aunque dominando más las similitudes con las zonas anteriormente descritas (zona 0 y 1).
- Zona 3. Se corresponde con las ejemplares plantados en los años 2015-2016.
- Zona 4. Se corresponde con las ejemplares plantados a finales de 2017-principios 2018.

Estas dos últimas zonas, debido a su proximidad hacia el cauce fluvial, poseen unas condiciones un poco más suaves y es una zona más húmeda. Es un terreno más fértil ya que, los años anteriores a la plantación de estos ejemplares objeto de estudio, ésta era una parte de la finca destinada a cultivos, siendo trabajado y abonado durante años y dando lugar a un suelo con una estructura mucho mejor.

También hay que tener en cuenta que, aunque se establezcan unas edades generales de las plantas de las distintas zonas de estudio, en cada zona puede haber individuos plantados en años posteriores debido a la reposición de marras o a la ampliación de las zonas plantadas.



Imagen 1. Imagen del campo con las distintas zonas de estudio.

Además del efecto de las diferentes condiciones de terreno y climáticas a las que son sometidas las plantas, también se estudia la época de la recogida de las hojas, que se centra en la época de brote, época en la que ORBALLO recoge las hojas para preparar las infusiones. Las hojas recogidas que componen las muestras objeto de estudio son siempre hojas de las partes altas de las plantas o finales de ramas, para darle más veracidad al presente estudio ya que, serán al final las hojas que se cosechen para su uso en aplicación alimentaria. Es interesante estudiar las hojas obtenidas de la poda, hojas de las partes altas de la planta, pero podría haber igualmente hojas de ramas laterales.

La **figura 7** muestra los resultados de GLECEX sobre el contenido fenólico de las muestras obtenidas de las distintas zonas de estudio, las cuales son sometidas a diferentes condiciones ambientales y se recolectan en diferentes fechas de recogida: finales de marzo, mediados de

abril, finales de abril y principios de mayo. El contenido fenólico de las hojas de las distintas zonas no presentan diferencias significativas, y este contenido se encuentran entre el rango de 10,7 y 15,4 % de fenoles totales. Se observa que por norma general el contenido fenólico decrece con el paso de las semanas, siendo inferior en las hojas recogidas a principios de mayo. También se analizó el contenido fenólico de las hojas de la primera poda realizada en febrero. El contenido fenólico obtenido de estas hojas fue de 160 mg GAE/g muestra (16% de fenoles totales).

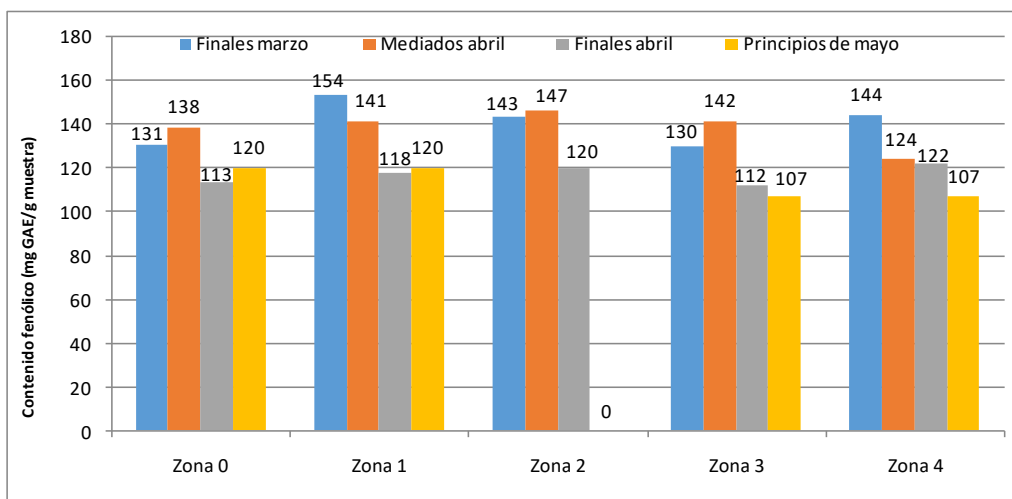


Figura 7. Influencia de la época de recogida en el contenido fenólico de las hojas de *Camellia sinensis*.

La capacidad antioxidante de las distintas plantas analizadas (**figura 8**) se encuentra entre los valores de 2.817 y 1.472 $\mu\text{mol TE/g}$. Se observa que el valor más alto se obtuvo en la zona 3 a finales de marzo, sin embargo en esta fecha la zona 0 presentó el valor más bajo, siendo el más alto para esta zona principios de mayo. Esta baja capacidad antioxidante posiblemente es debida a que las plantas de la zona 0 son las más adultas y se ha demostrado que la composición de las hojas de té varía con muchos factores: el clima, la variedad y la edad de la hoja. Por otro lado, la elevada capacidad de las plantas de la zona 3 puede deberse a que presenta un terreno más fértil ya que, los años anteriores a la plantación de estos ejemplares objeto de estudio, ésta era una parte de la finca destinada a cultivos, siendo trabajado y abonado durante años y dando lugar a un suelo con una estructura mucho mejor.

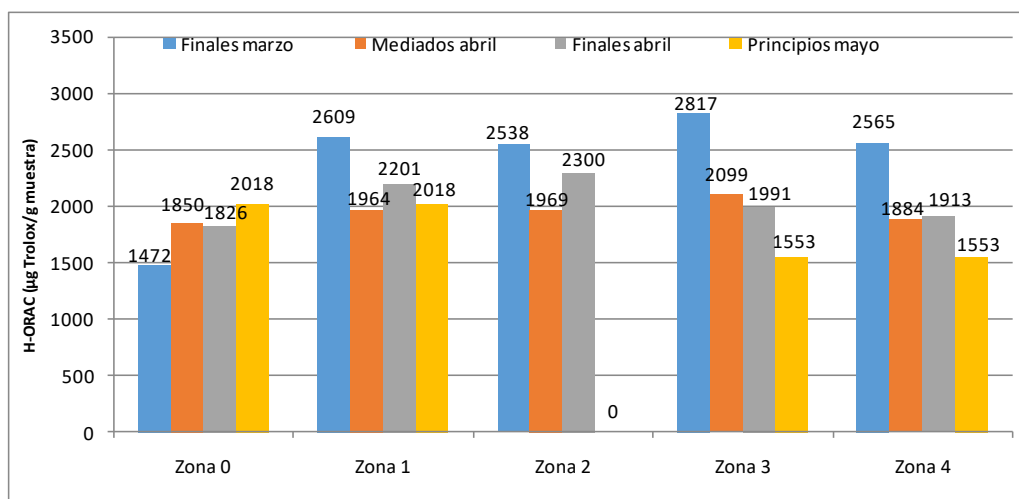


Figura 8. Influencia de la época de recogida en el valor de $H-ORAC_{FL}$ de las hojas de *Camellia sinensis*.

La **figura 9** muestra los resultados de la capacidad antioxidante de los polifenoles de las hojas de té de cada una de las zonas analizadas del terreno de Orballo. Se observa que los polifenoles de las hojas son entre 3 y casi 6 veces más activos que el Trolox, compuesto análogo soluble de la vitamina E. Los compuestos más activos se obtuvieron en las hojas de la zona 3 a finales de marzo, sin embargo, los menos activos fueron los de la zona 0 a finales de marzo, zona en la que los ejemplares son los más adultos y presenta un suelo de peor calidad, más compactado. La capacidad antioxidante de los polifenoles de las hojas de la primera poda realizada en febrero fue de 4 g Trolox/g GAE, es decir, dichos compuestos son 4 veces más activos que el Trolox.

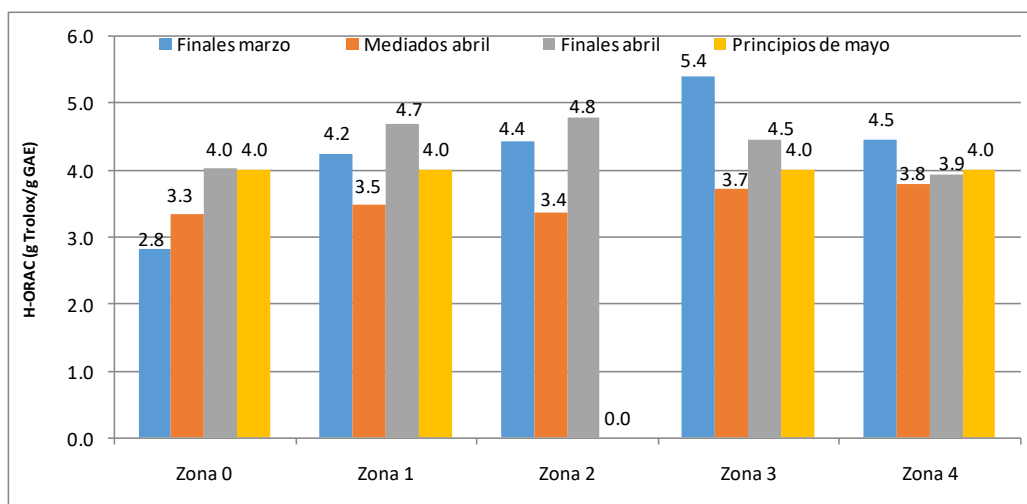
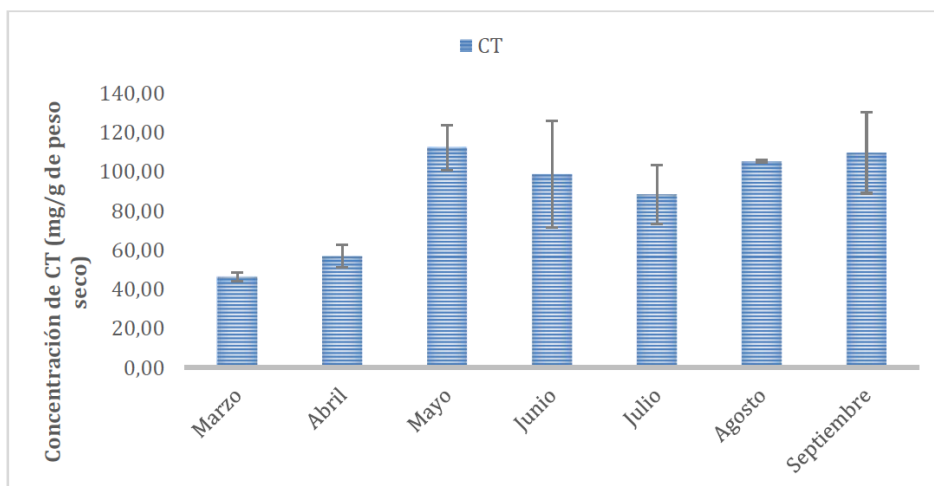


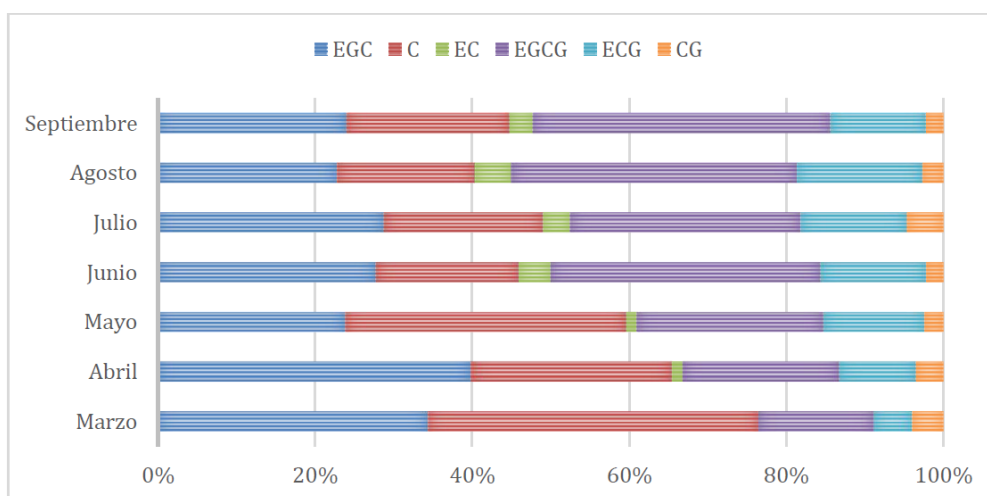
Figura 9. Influencia de la época de recogida en el valor $H-ORAC_{FL}$ de los compuestos polifenólicos de las hojas de *Camellia sinensis*.

El contenido de catequinas totales (CT) a lo largo de los meses de cosecha, realizado por AREEIRO, puede verse en la **gráfica 1**. A lo largo de las estaciones varía de manera significativa, diferenciándose por un menor contenido en los primeros meses de brotación (marzo y abril) si lo comparamos con el resto de meses (mayo a septiembre). El contenido máximo de CT se observa en el mes de mayo, con un valor de 112,43 mg/g de peso seco, aunque existe cierta variabilidad en función del genotipo analizado, por lo que es un factor a tener en cuenta en futuros estudios.



Gráfica 1. Contenido de catequinas totales (CT) en los brotes de *C. sinensis* (media de los genotipos 1 y 2) recogidos durante los meses de cosecha (marzo a septiembre) del 2021.

El perfil de catequinas es diferente en función del mes de brotación, lo que es importante ya que cada tipo de molécula posee unas propiedades químicas diferentes. De forma general, las catequinas esterificadas con ácido gálico aumentan su proporción a medida que se avanzan los meses de brotación (**gráfica 2**).



Gráfica 2. Perfil de las diferentes catequinas en los brotes de *C. sinensis* recogidos durante los meses de cosecha (marzo a septiembre) del 2021.

El contenido del aminoácido L-teanina varía considerablemente en función del mes en que se cosechen los brotes de *C. sinensis* (**figura 10**). De este modo, en el primer mes de brotación (marzo) se observa el máximo contenido de L-teanina ($6,4 \pm 0,41$ mg/g), reduciéndose su concentración en los brotes a más de la mitad en el siguiente mes de brotación (**gráfica 3**).

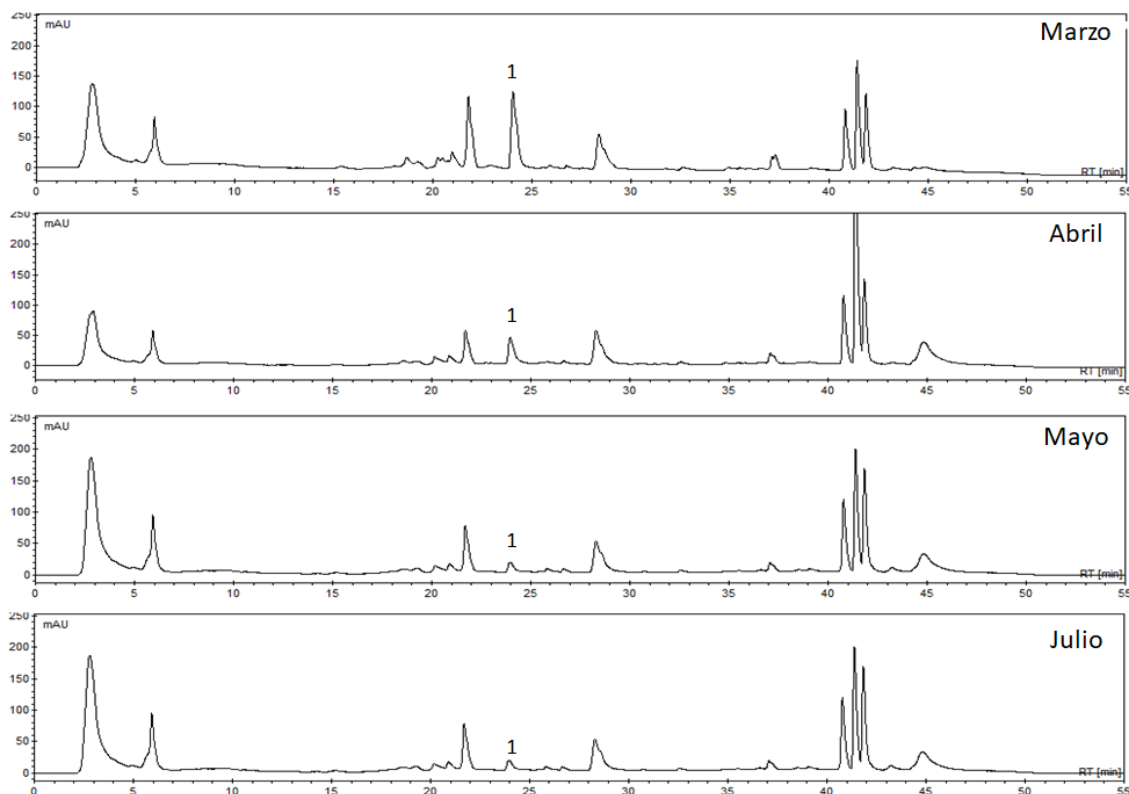
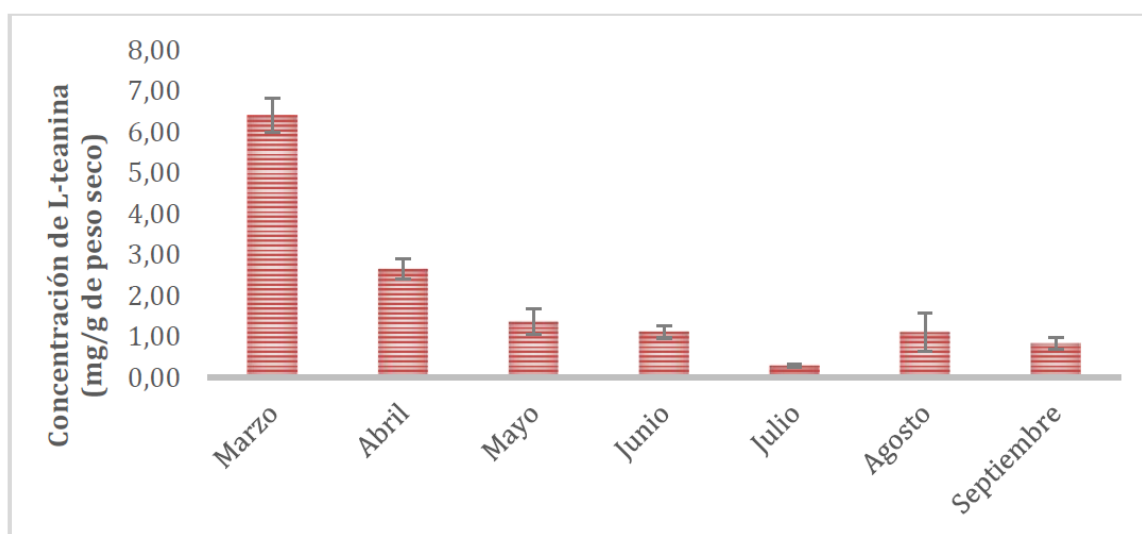
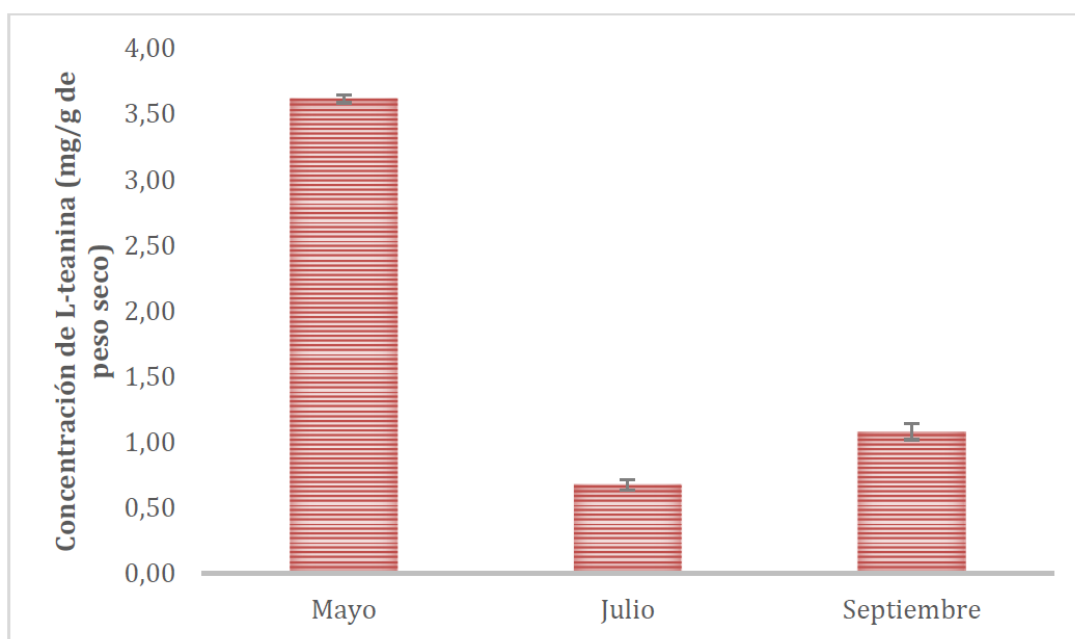


Figura 10. Cromatogramas a 254 nm donde se muestra la variación de L-teanina (pico 1) en los brotes de marzo, abril, mayo y julio de 2021.



Gráfica 3. Variación del contenido de L-teanina en los brotes de *C. sinensis* en función del mes (año 2021).

También se analizó el contenido de L-teanina en el té verde elaborado a partir de los brotes cosechados en los meses de mayo, julio y septiembre de 2021 (**gráfica 4**). Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en los brotes de los dos genotipos estudiados de *C. sinensis*, detectándose mayor nivel de L-teanina en primavera con respecto a verano. De forma general, se observa un contenido de L-teanina ligeramente más elevado en el té con respecto a los brotes. Esta diferencia puede deberse a que el té se elabora con diferentes clones de *C. sinensis*, a diferencia de los dos genotipos analizados en este trabajo, así como al diferente procesamiento de los brotes en ambos casos.



Gráfica 4. Contenido de L-teanina en el té verde en diferentes meses (año 2021).

Actividad 1.3. Análisis de las propiedades saludables de la materia prima en bruto.

En esta etapa se realizará un exhaustivo estudio de las propiedades saludables de las materias primas. Para ello GLECEX ha puesto a punto ensayos *in vitro* en sistemas enzimáticos libres de células para la determinación de la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antidiabética.

- **Capacidad antioxidante de captación del radical peroxilo (Oxygen Radical Absorbance Capacity).**

El análisis de ORAC_{FL} se lleva a cabo mediante un ensayo de fluorescencia (métodos de Ou y col., 2001, 2003; Huang y col 2002; Prior y col., 2003 con modificaciones) y las lecturas se realizan en un lector de microplacas (equipo SpectraMax M2 de Molecular Devices). Este ensayo se basa en la oxidación de una molécula fluorescente, la fluoresceína, por los radicales

peroxilo, que son producidos por la descomposición térmica de un iniciador de radicales libres 2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH). Los antioxidantes presentes en este ensayo trabajan para inhibir la oxidación de la fluoresceína a través del mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno a los radicales libres. Este ensayo presenta una serie de ventajas frente a otros ensayos más convencionales al proporcionar una generación continua de radicales con una visión más realista de las reacciones biológicas.

Se han validado dos ensayos para detectar tanto la capacidad antioxidante de la fracción hidrofílica como lipofílica, algo poco habitual en otros laboratorios, y que proporciona un valor más completo de la capacidad antioxidante de la muestras.

- Ensayo H-ORAC_{FL}: Proporciona una medida directa de la capacidad antioxidante de la fracción hidrofílica de la muestra frente a los radicales libres peroxilo.
- Ensayo L-ORAC_{FL}: Proporciona una medida directa de la capacidad antioxidante de la fracción lipofílica de la muestra frente a los radicales libres peroxilo. Para llevar a cabo el ensayo en muestras lipofílicas se usa "RandomylMethylated β -Cyclodextrin" que actúa como potenciador de la solubilidad en agua para los compuestos lipofílicos.

Por sumatorio del valor de ORAC de la fracción hidrofílica (H-ORAC_{FL}) y lipofílica (L-ORAC_{FL}) se obtiene el valor total de ORAC. Los resultados se expresan como μ moles equivalentes de Trolox (TE; análogo hidrosoluble de la vitamina E) por gramo muestra.

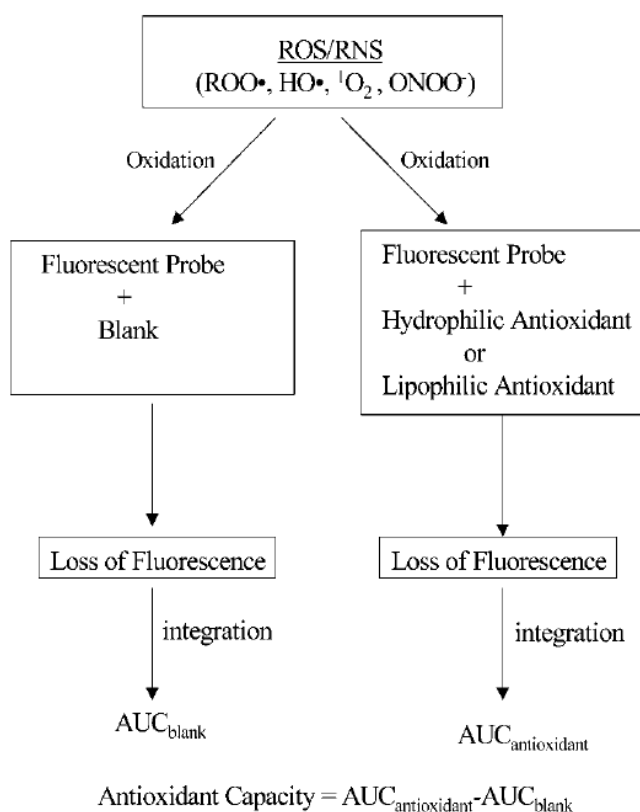


Figura 11. Mecanismo de actuación del ensayo de ORAC

- **Capacidad antiinflamatoria mediante la determinación de la inhibición enzimática de la ciclooxigenasa COX-2 humana recombinante.**

Ensayo de fluorescencia. La capacidad de inhibición de la COX-2, enzima responsable de la biosíntesis de las prostaglandinas bajo condiciones inflamatorias agudas, se determina por un ensayo de fluorescencia siguiendo la ruta metabólica del ácido araquidónico. Este ensayo utiliza el componente peroxidasa de las ciclooxigenasas. La reacción entre PGG₂ (hydroperoxydeendoperoxyde) y ADHP (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) produce un compuesto altamente fluorescente que puede ser detectado (resorufin).

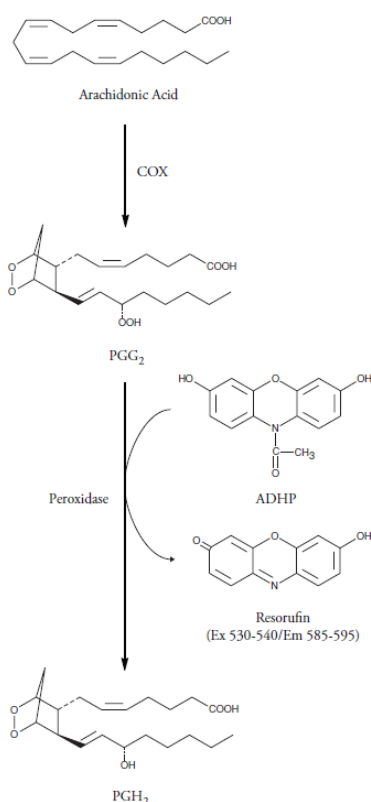


Figura 12. Ruta metabólica del ácido araquidónico

Los resultados se expresan como concentración efectiva o de inhibición media (CE₅₀, concentración de la muestra que inhibe la actividad de la COX-2 al 50%) y como porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima COX-2 (PI) a una concentración determinada. La eficacia se compara con un inhibidor control: compuesto puro celecoxib. El valor de CE₅₀ para el compuesto celecoxib es de 5,6 mg/L.

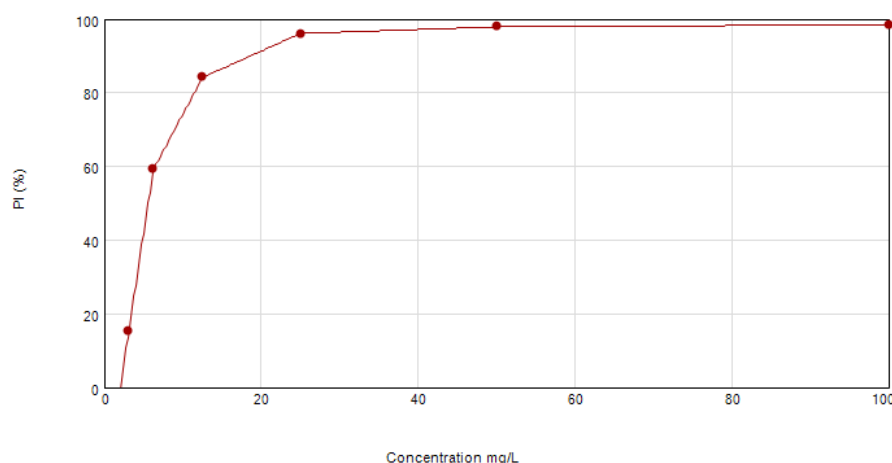


Figura 13. Porcentaje de inhibición de la COX-2 del compuesto celecoxib

- **Capacidad antidiabetes mediante la determinación de la inhibición de las dos principales enzimas de digestión de carbohidratos: α -amilase α -glucosidase.**

La hidrólisis del almidón dietético es la principal fuente de glucosa en la sangre, siendo la α -amilasa y α -glucosidasa las enzimas clave involucradas en la descomposición del almidón y la absorción intestinal, respectivamente. Se cree que la inhibición de estas enzimas puede disminuir significativamente el aumento postprandial del nivel de glucosa en sangre después de una dieta mixta de carbohidratos y, por lo tanto, puede ser una estrategia importante en el tratamiento de la hiperglucemia relacionada con la diabetes tipo II. La segunda enzima, la α -glucosidasa, que también se encuentra en la membrana superficial de las células intestinales, activa el paso final del proceso digestivo del almidón. Esta enzima cataliza la hidrólisis de hidratos de carbono complejos y disacáridos a monosacáridos absorbibles. En consecuencia, los inhibidores de estas enzimas hidrolíticas suprimen la entrada de glucosa desde el tracto intestinal a los vasos sanguíneos, lo que produce una disminución de la hiperglucemia postprandial (Collado-González et al., 2017; Vinholes et al., 2011).

Actualmente existen algunos fármacos antidiabéticos, como la acarbosa, el miglitol y la voglibosa, que actúan inhibiendo la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa. Si bien es eficaz para atenuar el aumento de los niveles de glucosa en la sangre en muchos pacientes, el uso continuo de estos medicamentos a menudo se asocia con efectos secundarios no deseados, como toxicidad hepática y síntomas gastrointestinales adversos. Es por esta razón que existe la necesidad de desarrollar inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa obtenidos de fuentes naturales, como la planta de té y de lúpulo, que no tengan efectos secundarios adversos o no deseados (Cham et al., 2010; Matsui et al., 1996).

Capacidad antidiabética a través de la determinación de la capacidad de inhibición de la enzima α -glucosidase.

Se puso a punto un ensayo que utiliza la capacidad de la enzima α -glucosidasa activa para escindir un sustrato sintético, liberando así un cromóforo que es detectado espectrofotométricamente. En presencia de inhibidores específicos de la α -glucosidasa, la actividad enzimática se reduce en gran medida, lo que se detecta por una disminución de las lecturas de absorbancia.

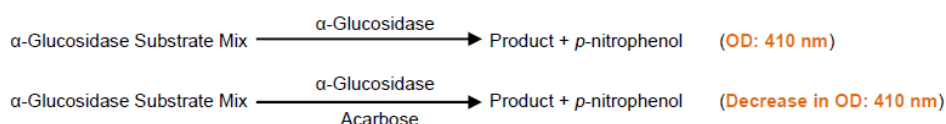


Figura 14. Reacción del ensayo de inhibición enzimática de la α -glucosidase

Los resultados se expresan como concentración efectiva o de inhibición media (CE50, concentración de la muestra que inhibe la actividad de la enzima al 50%) y como porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima (PI) a una concentración determinada.

El valor de CE50 para el compuesto Acarbosees: $0,74 \pm 0,15$ mM.

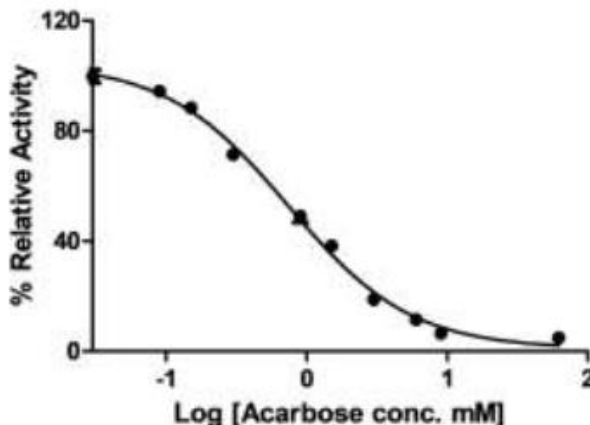


Figura 15. Porcentaje de inhibición de la α -glucosidase del compuesto acarbose

Capacidad antidiabética a través de la determinación de la capacidad de inhibición de la enzima α -amylase.

Las amilasas son enzimas digestivas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4-glucosídicos del almidón a productos de menor peso molecular, como las unidades de glucosa, maltosa y maltotriosa. La α -amilasa humana se expresa principalmente en las glándulas salivales y el páncreas. La modulación de la actividad de la α -amilasa afecta a la utilización de los

carbohidratos como fuente de energía. Esta enzima es responsable de la descomposición de los hidratos de carbono complejos en los seres humanos. Por lo tanto, la inhibición de la α -amilasa podría considerarse una estrategia para el tratamiento de trastornos relacionados con la absorción de carbohidratos, como la diabetes, la obesidad, las caries dentales y las enfermedades periodontales.

Se puso a punto un ensayo en el cual la α -amilasa humana hidroliza un sustrato sintético, produciendo fragmentos más pequeños que contienen un cromóforo que es detectado espectrofotométricamente. Los resultados se expresan como concentración efectiva o de inhibición media (CE50, concentración de la muestra que inhibe la actividad de la enzima al 50%) y como porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima (PI) a una concentración determinada.

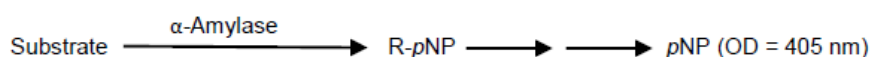
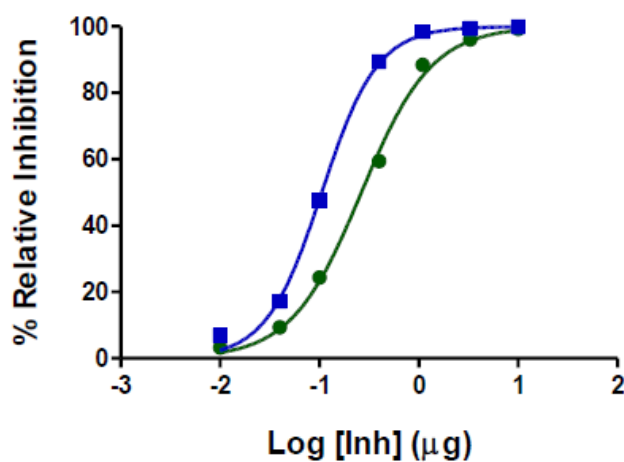


Figura 16. Reacción del ensayo de inhibición enzimática de la α -amilase

El valor de CE50 para un inhibidor control de α -amilase en saliva humana y páncreas es: 108 ± 5 ng y 267 ± 4 ng, respectivamente.



Inhibition of α -Amylase, Human Salivary ($\blacksquare$) and Pancreas ($\bullet$) by α -Amylase Inhibitor.

Figura 17. Porcentaje de inhibición de la α -amilase de un inhibidor control

Tras la puesta a punto de los tres ensayos *in vitro* para la determinación de bioactividades (antioxidante, antiinflamatorio, antidiabético), se decide seleccionar el ensayo que determina la capacidad antioxidante para realizar el screening de las bioactividades de las distintas

materias prima. De este modo a partir de los resultados del ensayo de ORAC se seleccionarán aquellas muestras con mayor potencial para ser utilizadas como materias primas para la obtención de nutraceuticos y con las que se realizarán los estudios de extracción/fermentación de las sucesivas actividades.

Capacidad antioxidante de las hojas de té.

Se realizaron las primeras determinaciones de la capacidad antioxidante en hojas de té (*Camellia sinensis*) proporcionadas por ORBALLO. Se extrajo tanto la fracción hidrofílica como lipofílica de las hojas de té a través de procesos de extracción.

- H-ORACFL: La capacidad antioxidante de la fracción hidrofílica de las hojas de té: 3689 μ mol TE/g.
- L-ORACFL: La capacidad antioxidante de la fracción lipofílica de las hojas de té: 23 μ mol TE/g.
- Por sumatorio del valor de H-ORACFL y L-ORACFL se obtiene el valor total de ORAC de 3.712 μ mol TE/g. Solamente el 0,6% de la actividad antioxidante total de las hojas de té procede de la fracción lipofílica (L-ORACFL), por lo tanto se decide analizar en posteriores experimentos únicamente la fracción hidrofílica que corresponde al 99,4% de la capacidad antioxidante total de las hojas.

Las hojas de té contienen compuestos polifenólicos (25,4%) con una capacidad antioxidante de 3,7 veces la capacidad antioxidante del Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E (3,7 g Trolox/g GAE).

Capacidad antioxidante las muestras de lúpulo.

Se determinó la capacidad antioxidante de la fracción hidrofílica (H-ORAC) y lipofílica (L-ORAC) de las muestras proporcionadas por LUTEGA.

- Lúpulo en flor deshidratada/molido en formato flor y pellet codificadas como: Pellet Nº1, Pellet Nº2, Pellet Nº3, Pellet Nº4, Pellet Nº5, Pellet Nº6, Pellet Nº7, Pellet Nº8, Pellet Nº9, Pellet Nº10, Pellet Nº11, Pellet Nº12, Pellet Nº15, Pellet Nº2 Nugget, Flor Nº4 Nugget, Flor Nº5 Cascade, Flor Nº 7 Magnum
- Hojas de lúpulo de variedad Nugget
- Semillas Nº8 variedad Nugget
- Hojas y tallos de trepa de lúpulo de variedad Nugget

Tal y como muestra la **figura 18**, las hojas de lúpulo tienen una capacidad antioxidante de 126 $\mu\text{mol TE/g}$ (78% correspondiente a la fracción hidrofílica), seguido de las semillas con 294 $\mu\text{mol TE/g}$ (72% correspondiente a la fracción hidrofílica), la muestra de trepa con 346 $\mu\text{mol TE/g}$ (99% correspondiente a la fracción hidrofílica), siendo la capacidad antioxidante de las muestras de la flor del lúpulo en torno a 787 – 2.471 $\mu\text{mol TE/g}$ (39 - 70% correspondiente a la fracción hidrofílica). La capacidad antioxidante en las muestras en formato flor es inferior a aquellas en pellet.

De las 14 muestras de pellet, la codificada como N°12 presenta la mayor actividad antioxidante total (2471 $\mu\text{mol TE/g}$), el 52% de la capacidad antioxidante corresponde a la fracción hidrofílica (H-ORAC 1281 $\mu\text{mol TE/g}$) mientras que el 48% a la fracción lipofílica (L-ORAC 1.190 $\mu\text{mol TE/g}$). La muestra con el valor más alto de H-ORAC fue la codificada como N°3 (H-ORAC 1.328 $\mu\text{mol TE/g}$), que representa el 70% de la capacidad antioxidante total. En cambio la muestra cuya capacidad antioxidante mayoritariamente viene dada por su fracción lipofílica es la pellet N°1, con un valor de L-ORAC de 584 $\mu\text{mol TE/g}$ que representa el 61% de la capacidad antioxidante total (958 $\mu\text{mol TE/g}$).

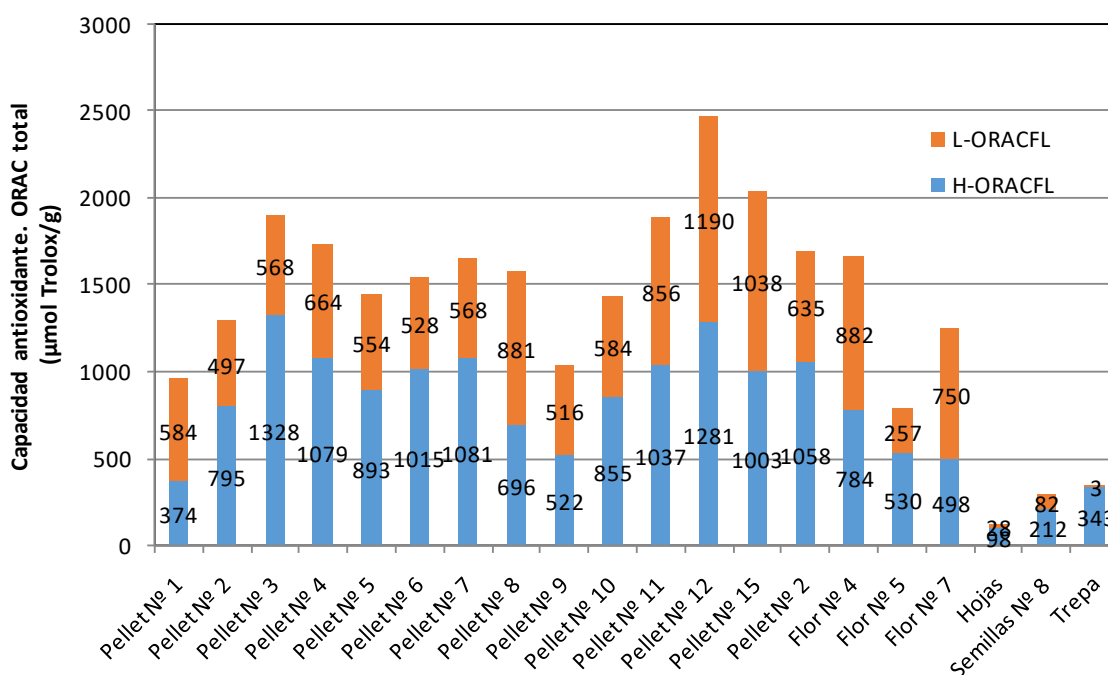


Figura 18. Capacidad antioxidante por el ensayo de ORAC de las muestras de lúpulo.

La capacidad antioxidante viene dada por diferentes familias de compuestos con propiedades antioxidantes, entre ellos los compuestos polifenólicos. Si suponemos que la capacidad antioxidante de las muestras viene dada principalmente por los compuestos polifenólicos, podemos relacionar los resultados del contenido total en compuestos polifenólicos, ensayo de

Folin, con los resultados de la capacidad antioxidante total, ensayo de ORAC total (**figura 19**). De este modo obtenemos una estimación de la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos de las muestras, expresada como g Trolox/g GAE. Los compuestos polifenólicos con la mayor capacidad antioxidante son aquellos contenidos en las hojas de lúpulo, sin embargo estos compuestos polifenólicos aunque son muy antioxidantes se encuentran en una muy baja concentración en las hojas (0,3%) tal y como muestra la **figura 19**. La muestra de pellet N°12 contiene compuestos polifenólicos (6,8%) con una capacidad antioxidante de 9 veces la capacidad antioxidante del Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E (9 g Trolox/g GAE).

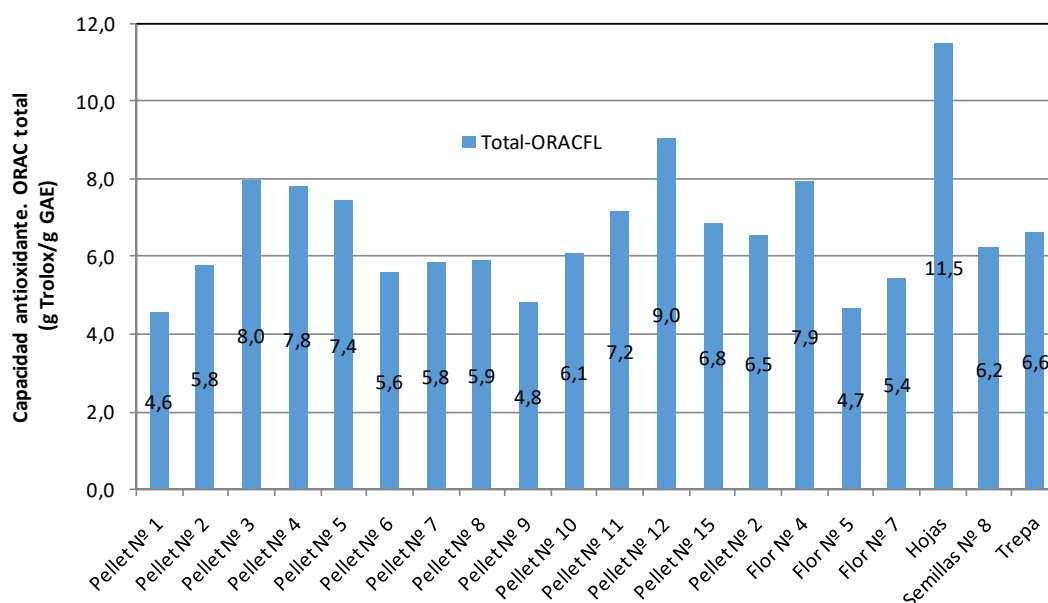


Figura 19. Capacidad antioxidante por el ensayo de ORAC de los compuestos polifenólicos de las muestras de lúpulo.

A partir de los resultados del ORAC y del Folin (actividad 1.1) se seleccionan las muestras con potencial para ser utilizadas como materias primas para la obtención de nutraceuticos y con las que se realizarán los estudios de extracción/fermentación de las sucesivas actividades:

- **Hojas de té:**
Contenido polifenólico total 25,4%.
Capacidad antioxidante 3.712 $\mu\text{mol TE/g}$ (3,7 g Trolox/g GAE)
- **Lúpulo en pellet N°12:**
Contenido polifenólico total 6,8%
Capacidad antioxidante 2.471 $\mu\text{mol TE/g}$ (9,0 g Trolox/g GAE)
- **Lúpulo en pellet N°3:**
Contenido polifenólico total 5,9%
Capacidad antioxidante 1.896 $\mu\text{mol TE/g}$ (8,0 g Trolox/g GAE)

ACTIVIDAD 2. DESARROLLO DE UN PROCESO DE TRATAMIENTO BASADO EN MODELOS FERMENTATIVOS PARA AMBAS ESPECIES.

Actividad 2.1. Estudios individualizados de procesos de fermentativos para potenciar la presencia de metabolitos funcionales.

En esa actividad se realizan estudios individualizados de procesos fermentativos para potenciar la presencia de metabolitos funcionales. Inicialmente, el grupo de investigación de la Universidad de A Coruña (UDC) realiza un estudio individual de cada una de las especies que entran en juego en este proceso con el fin de llegar a determinar cuáles de sus propiedades funcionales se pueden potenciar. Realiza estudios de fermentación directa de las materias primas (hojas de té, lúpulo en pellet Nº12 y Nº3) así como estudios de fermentación de los extractos obtenidos de las materias primas, con el fin de comparar si se obtienen mejores resultados realizando una extracción de los compuestos bioactivos previamente a la fermentación (**figura 20**).

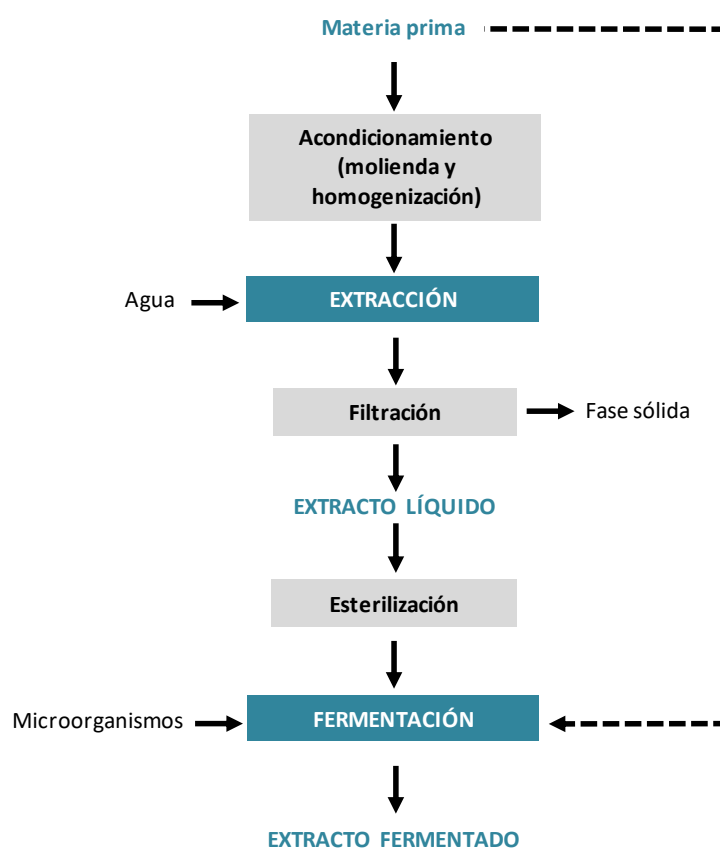


Figura 20. Diagrama del proceso de extracción y fermentación.

GLECEX ha trabajado en el desarrollo y optimización de procesos de extracción para determinar las condiciones adecuadas para obtener extractos antioxidantes a partir de las hojas de té y de la flor de lúpulo en pellet N°12 y N°3.

Desarrollo y optimización de procesos para la obtención de extractos de hojas de *Camellia sinensis*.

Diseño de experimentos:

Se llevó a cabo un diseño de experimentos Factorial 3^2 , con 2 variables independientes de operación con 3 niveles para cada una, que permite evaluar la influencia de las variables de operación del proceso, temperatura y tiempo de extracción, para maximizar el contenido total en compuestos polifenólicos y la eficacia antioxidante de los extractos. La **tabla 2** muestra el diseño factorial con las variables independientes de operación, los niveles y las variables de respuesta.

- Variables independientes de operación:

Temperatura (Temp.): 40, 60, 80 °C

Tiempo de extracción (Time): 30, 60, 90 min

- Variables de respuesta:

Contenido total en compuestos polifenólicos: Contenido total en polifenoles. “Folin-Ciocalteuassay”. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por litro de muestra.

Eficacia antioxidante: Capacidad antioxidante *in vitro* de captación del radical peroxilo (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Ensayo de fluorescencia por el método de ORAC_{FL}. Los resultados se expresan como μ moles equivalentes de Trolox (TE) (análogo soluble en agua de la vitamina E) por litro de muestra.

Tabla 2. Diseño Factorial 3^2 para las variables independientes, niveles y variables de respuesta.

Exp.	Variables independientes codificadas		Variables independientes		Variables de respuesta	
	Temp. °C	Time min	Temp. °C	Time min	Phenoliccontent mg GAE/L	H-ORAC _{FL} μ mol Trolox/L
1	-1	-1	40	30	4.710	150.966
2	-1	0	40	60	3.777	114.744
3	-1	+1	40	90	3.471	58.646
4	0	-1	60	30	2.967	97.905
5	0	0	60	60	4.097	120.861
6	0	+1	60	90	3.561	137.278
7	+1	-1	80	30	3.242	106.990
8	+1	0	80	60	4.015	155.587
9	+1	+1	80	90	4.230	118.435

Optimización de respuestas:

Los resultados se analizaron a través de la metodología de superficie de respuesta, un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar aplicaciones en las que una variable de interés es influenciada por otras y que permiten por lo tanto localizar las condiciones óptimas de operación del proceso (software *STATGRAPHICS Centurion*).

✓ Optimización de respuestas individuales. Maximizar el contenido total polifenólico:

El análisis de los resultados a través de la metodología de superficie de respuesta nos permite establecer las condiciones óptimas del proceso de extracción para maximizar el contenido polifenólico:

Condiciones óptimas. Temperatura: 40 °C / Tiempo de extracción: 32 min

Valor óptimo estimado del contenido total en polifenoles: 4.398 mg GAE/L

✓ Optimización de respuestas individuales. Maximizar la capacidad antioxidante:

La **figura 21** muestra la gráfica de superficie de respuesta que indica la capacidad antioxidante esperada como una función de la temperatura y el tiempo de extracción, así como la gráfica de contornos de la superficie de respuestas. El análisis de los resultados a través de esta metodología nos permite establecer las condiciones óptimas del proceso de extracción para maximizar la capacidad antioxidante:

Condiciones óptimas. Temperatura: 80 °C / Tiempo de extracción: 75 min

Valor óptimo estimado de la capacidad antioxidante H-ORAC_{FL}: 144.307 μmol Trolox/L

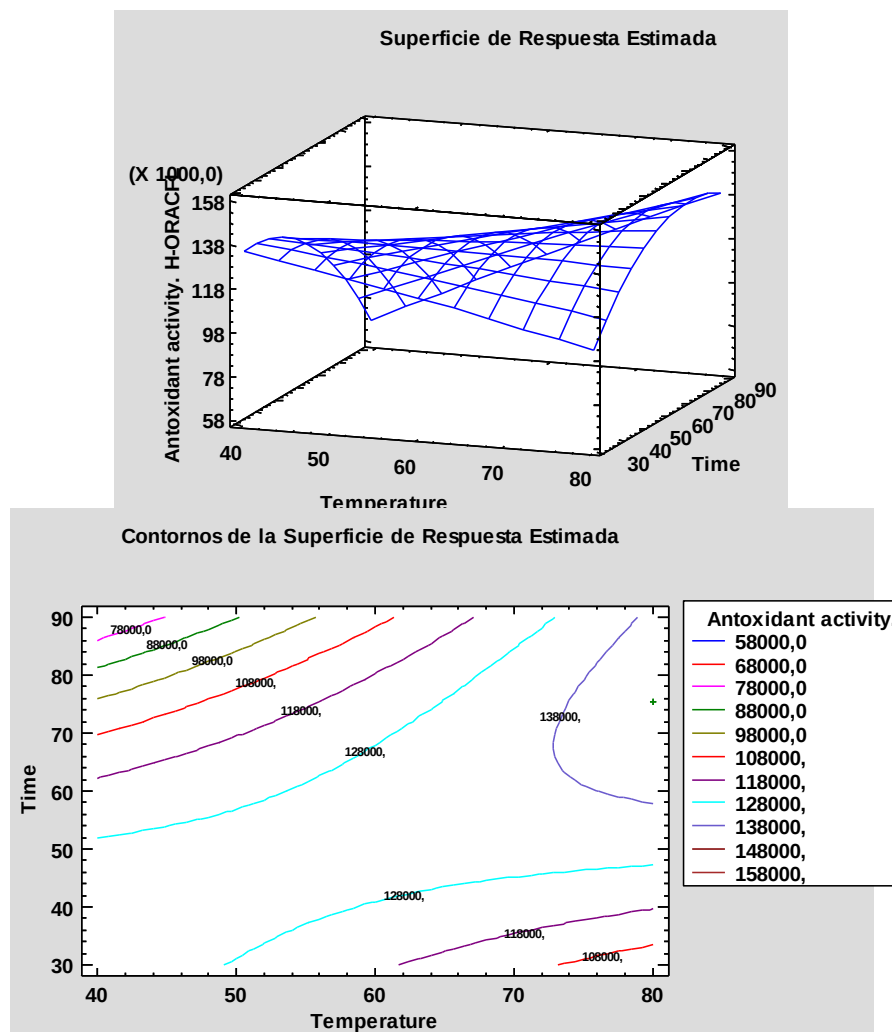


Figura 21. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos para maximizar la capacidad antioxidante.

- ✓ **Optimización de multi-respuesta. Maximizar el contenido total en polifenoles y la capacidad antioxidante:**

La **figura 22** muestra las gráficas de superficie de respuesta y de contornos que estiman la influencia de la temperatura y el tiempo de sobre la capacidad antioxidante y el contenido polifenólico. La metodología de superficie de respuesta nos permite establecer las condiciones óptimas para maximizar ambas variables de respuesta a través de la función de “deseabilidad”:

Condiciones óptimas. Temperatura: 80 °C / Tiempo de extracción: 84 min

Valor óptimo del contenido total en polifenoles: 4.329 mg GAE/L

Valor óptimo estimado de la capacidad antioxidante H-ORAC_{FL}: 142.609 μmol Trolox/L

Índice de deseabilidad global: 0,82 (escala 0 a 1)

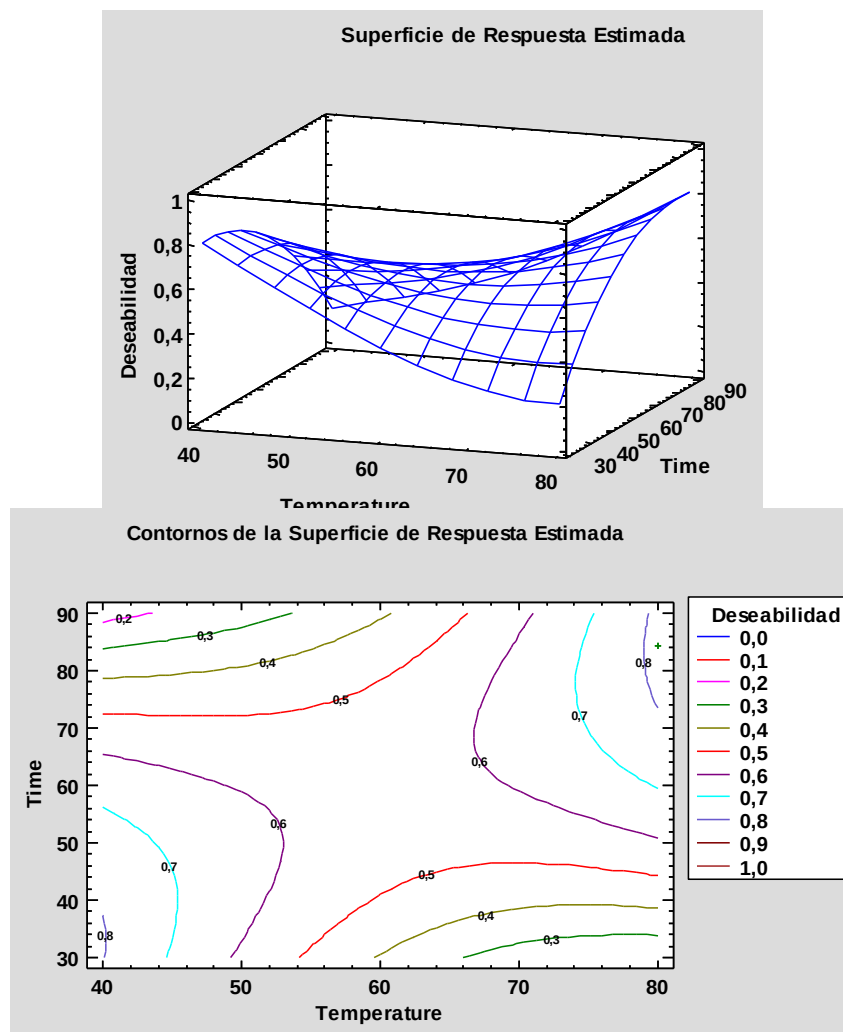


Figura 22. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos para maximizar el contenido polifenólico y la capacidad antioxidante.

Se seleccionan como condiciones óptimas de extracción aquellas que permiten maximizar el contenido polifenólico y la capacidad antioxidante: extracción con agua a 80 °C durante 84 min y relación sólido:líquido 1:15 (w:v). Se prepara un lote de extracto y se somete a un proceso de esterilización para ser utilizado como sustrato en los proceso de fermentación realizados por la UDC. Se confirman las propiedades de este extracto líquido:

Contenido total en polifenoles: 9.293 mg GAE/L; 37 g GAE/g extracto

Capacidad antioxidante H-ORAC: 195.078µmol Trolox/L (48,8 g Trolox/L; 27,3 g Vit C/L)

pH: 4,54

Peso seco: 25,4 g extracto/L



Desarrollo y optimización de procesos para la obtención de extractos *Humulus lupulus*.

Diseño de experimentos:

Se llevó a cabo un diseño de experimentos Factorial 3^2 , con 2 variables independientes de operación con 3 niveles para cada una, que permite evaluar la influencia de las variables de operación del proceso, temperatura y tiempo de extracción, para maximizar el contenido total en compuestos polifenólicos y la eficacia antioxidante de los extractos. La **tabla 3** muestra el diseño factorial con las variables independientes de operación, los niveles y las variables de respuesta.

- Variables independientes de operación:

Temperatura (Temp.): 25, 50, 75°C

Tiempo de extracción (Time): 30, 60, 90 min

- Variables de respuesta:

Contenido total en compuestos polifenólicos: Contenido total en polifenoles. “Folin-Ciocalteuassay”. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por litro de muestra.

Eficacia antioxidante: Capacidad antioxidante *in vitro* de captación del radical peroxilo (Oxygen Radical AbsorbanceCapacity). Ensayo de fluorescencia por el método de ORAC_{FL}. Los resultados se expresan como μ moles equivalentes de Trolox (TE) (análogo soluble en agua de la vitamina E) por litro de muestra.

Tabla 3. Diseño Factorial 3^2 para las variables independientes, niveles y variables de respuesta.

Exp.	Variables independientes codificadas		Variables independientes		Variables de respuesta	
	Temp. °C	Time min	Temp. °C	Time min	Phenoliccontent mg GAE/L	H-ORAC _{FL} μ mol Trolox/L
1	-1	-1	25	30	818	20.805
2	-1	0	25	60	855	21.682
3	-1	+1	25	90	855	23.880
4	0	-1	50	30	955	26.765
5	0	0	50	60	987	35.934
6	0	+1	50	90	1.012	34.755
7	+1	-1	75	30	1.073	33.909
8	+1	0	75	60	1.049	31.291
9	+1	+1	75	90	1.018	28.158

Optimización de respuestas:

Los resultados se analizaron a través de la metodología de superficie de respuesta que permiten por lo tanto localizar las condiciones óptimas de operación del proceso (software *STATGRAPHICS Centurion*).

✓ Optimización de respuestas individuales. Maximizar el contenido total polifenólico:

La **figura 23** muestra las gráficas de superficie de respuesta y de contornos que estiman la influencia de la temperatura y el tiempo de sobre el contenido polifenólico. El análisis de los resultados a través de esta metodología nos permite establecer las condiciones óptimas del proceso de extracción para maximizar el contenido polifenólico:

Condiciones óptimas. Temperatura: 75°C / Tiempo de extracción: 31 min

Valor óptimo estimado del contenido total en polifenoles: 1.060 mg GAE/L

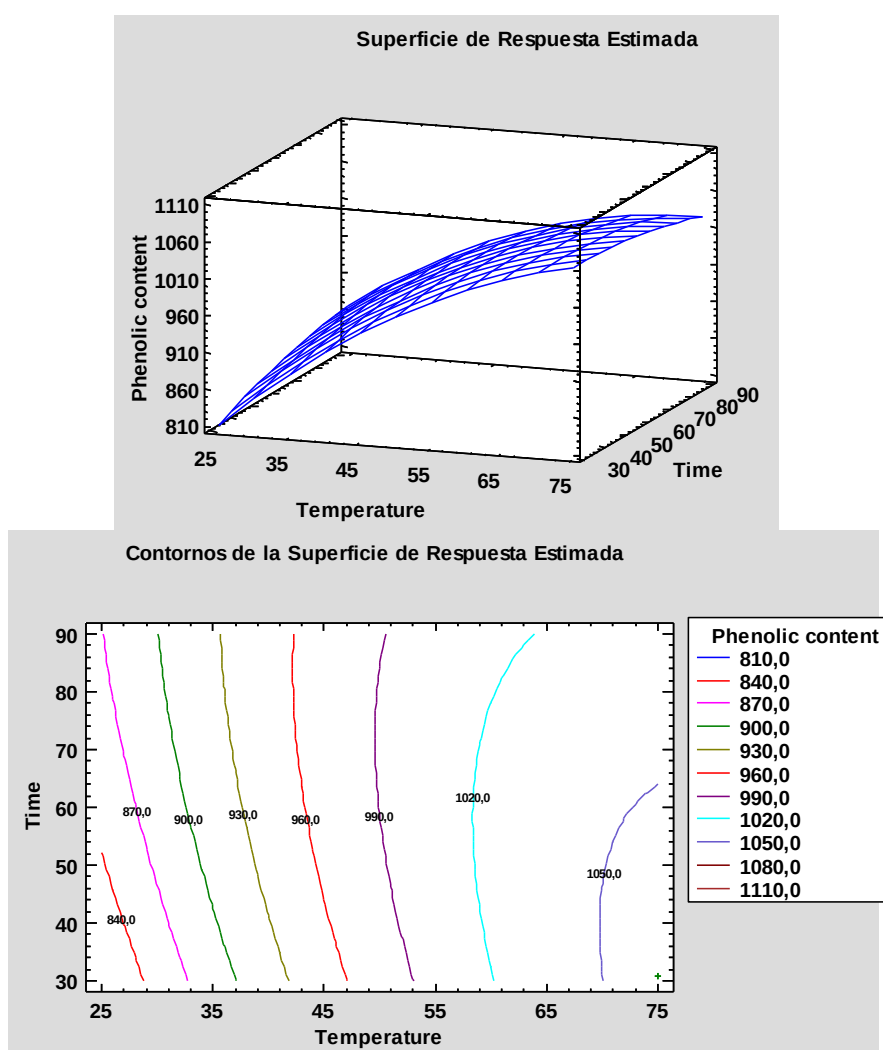


Figura 23. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos para maximizar el contenido polifenólico.

✓ **Optimización de respuestas individuales. Maximizar la capacidad antioxidante:**

La **figura 24** muestra la gráfica de superficie de respuesta que indica la capacidad antioxidante esperada como una función de la temperatura y el tiempo de extracción, así como la gráfica de contornos de la superficie de respuestas. El análisis de los resultados a través de la metodología de superficie de respuesta nos permite establecer las condiciones óptimas del proceso de extracción para maximizar la capacidad antioxidante:

Condiciones óptimas. Temperatura: 60°C / Tiempo de extracción: 60 min

Valor óptimo estimado de la capacidad antioxidante H-ORAC_{FL}: 34.408μmol Trolox/L

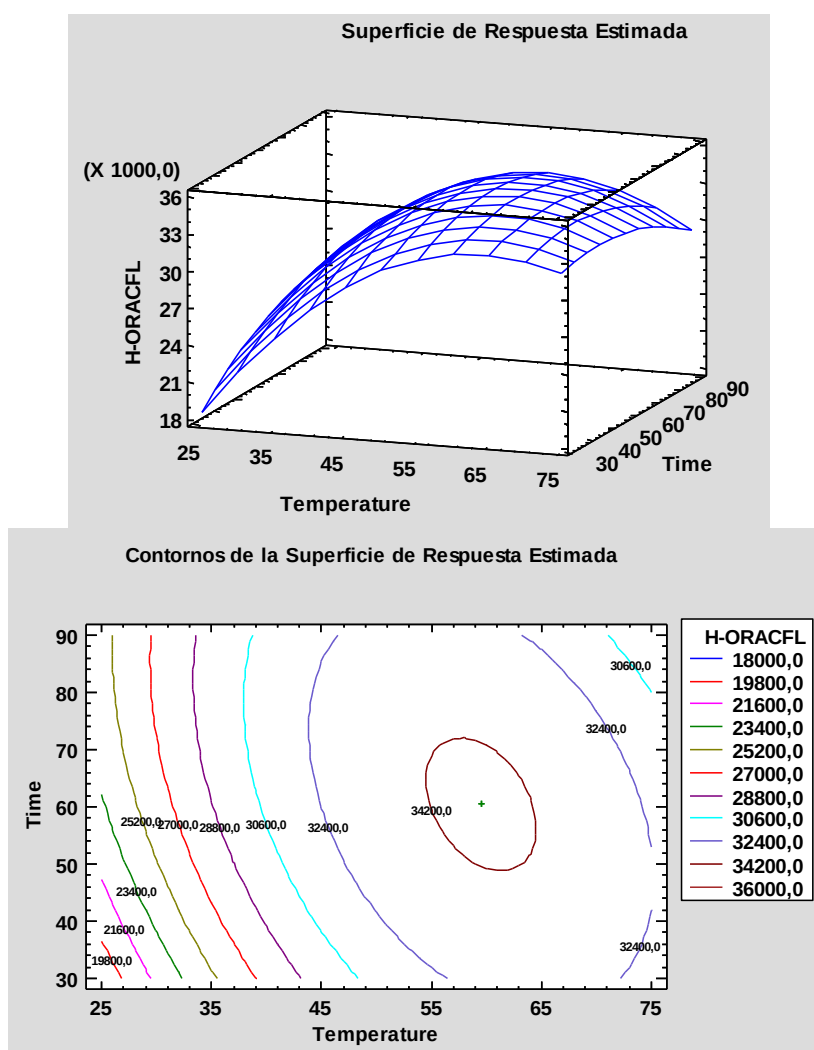


Figura 24. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos para maximizar la capacidad antioxidante.

- ✓ **Optimización de multi-respuesta. Maximizar el contenido total en polifenoles y la capacidad antioxidante:**

La **figura 25** muestra las gráficas de superficie de respuesta y de contornos que estiman la influencia de la temperatura y el tiempo de sobre la capacidad antioxidante y el contenido polifenólico. La metodología de superficie de respuesta nos permite establecer las condiciones óptimas para maximizar ambas variables de respuesta a través de la función de “deseabilidad”:

Condiciones óptimas. Temperatura: 67°C / Tiempo de extracción: 51min

Valor óptimo estimado del contenido total en polifenoles: 1.044 mg GAE/L

Valor óptimo estimado de la capacidad antioxidante H-ORAC_{FL}: 33.882 μmol Trolox/L

Índice de deseabilidad global: 0,88 (escala 0 a 1)

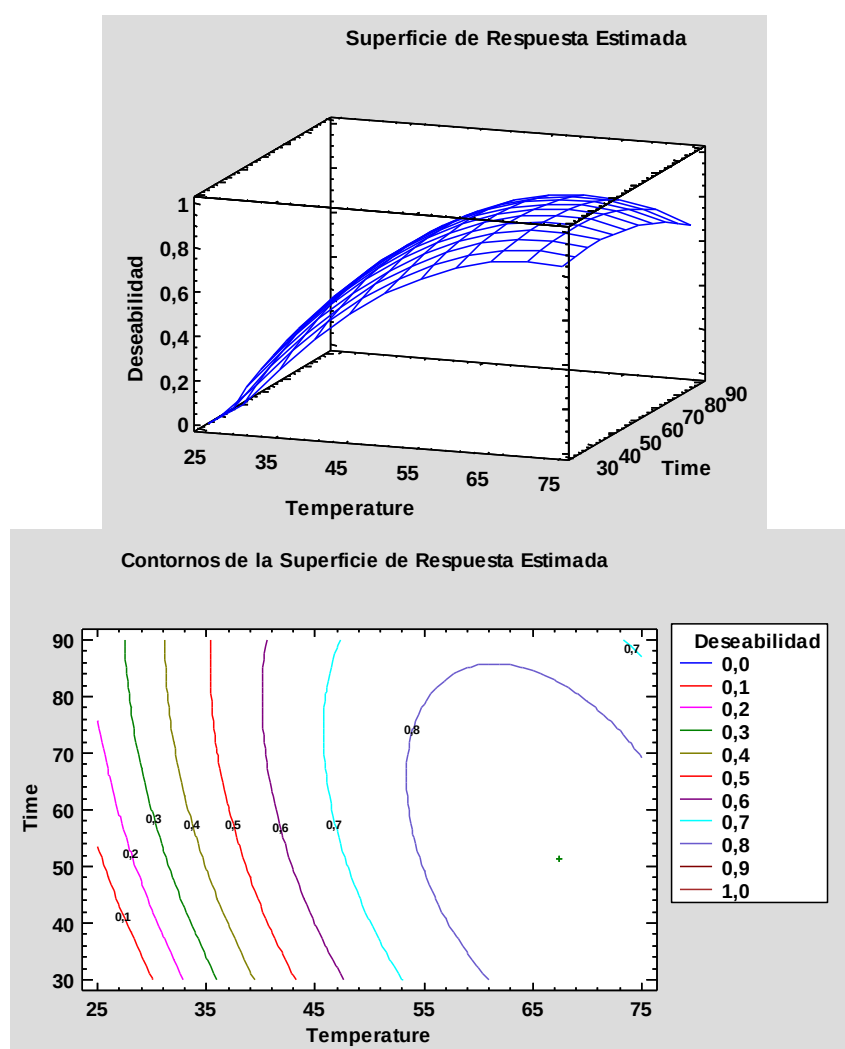


Figura 25. Gráfica de superficie de respuesta y de contornos para maximizar el contenido polifenólico y la capacidad antioxidante.

Se seleccionan como condiciones óptimas de extracción aquellas que permiten maximizar la capacidad antioxidante: extracción con agua a 60 °C durante 60 min y relación sólido:líquido 1:15 (w:v). Se prepara un lote de extracto con cada una de las muestras de lúpulo (Nº3 y Nº12) y se somete a un proceso de esterilización para posteriormente ser utilizado como sustrato en los procesos de fermentación realizados por la UDC. Se confirman las propiedades de los extractos líquidos:

Extracto de lúpulo Nº3

Contenido total en polifenoles: 1.529 mg GAE/L; 9,3 g GAE/g extracto

Capacidad antioxidante H-ORAC: 40.643 µmol Trolox/L (10,2 g Trolox/L; 5,7 g Vit C/L)

pH: 4,9

Peso seco: 16,4 g extracto/L



Extracto de lúpulo Nº12

Contenido total en polifenoles: 1.173 mg GAE/L; 8,4 g GAE/g extracto

Capacidad antioxidante H-ORAC: 31.477 µmol Trolox/L (7,9 g Trolox/L; 4,4 g Vit C/L)

pH: 5,0

Peso seco: 14,0 g extracto/L



Estudio individualizado de fermentaciones de hojas de *Camellia sinensis* e inflorescencias de *Humulus lupulus* con el objetivo de incrementar las moléculas bioactivas en el producto final.

A la par, el grupo de investigación de la UDC ha realizado un estudio individualizado de fermentaciones de hojas de *Camellia sinensis* e inflorescencias de *Humulus lupulus* con el objetivo de incrementar el número de moléculas bioactivas presentes en el producto final. El lúpulo empleado fueron las muestras de pellet codificadas con el número 12 y número 3 por presentar la mayor actividad antioxidante total la primera y con mayor capacidad antioxidante en la fracción hidrofílica la segunda de todas las analizadas por GLECEX. Como control y a modo de referencia se utilizó un SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*) comercial (de

la casa Kirandia) empleado para realizar la bebida fermentada tradicional en base a té, kombucha. Aunque el SCOBY se ha venido utilizando de manera tradicional para la elaboración de la kombucha casera, no es lo más adecuado a nivel industrial debido a las variaciones en su composición microbiana y actividad biológica lo que conlleva variaciones en la calidad del producto final. Por esa razón y con el objetivo de obtener una bebida nutracéutica novedosa con relación a otras ya conocidas y extensamente comercializadas como es la kombucha, se decidió preparar infusiones de té y lúpulo inoculadas con una combinación de microorganismos, empleando en concreto la bacteria *Lactiplantibacillus plantarum* y la levadura *Saccharomyces boulardii*. Ambos microorganismos son considerados como probióticos y presentan la presunción cualificada de seguridad (QPS, QualifiedPresumption of Safety) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, EuropeanFood Safety Authority).

Inicialmente, se realizaron experimentos empleando la receta de kombucha tradicional consistente en añadir 3 g de hojas de té por cada litro de agua y/o 1,5 g de lúpulo/L en presencia de 50 g/L de sacarosa, inoculando con el SCOBY comercial o con la combinación de microorganismos probióticos seleccionados. También se comprobó el efecto de inocular la bacteria y la levadura probiótica desde el inicio de manera conjunta o dejando actuar 24h uno de ellos y posterior inoculación del otro microorganismo (inoculación escalonada). La inoculación de los microorganismos se hizo a una absorbancia final en la infusión de 0,1. Además, se probó el efecto de retirar de la infusión las hojas de té desde un principio o mantenerlas a lo largo de la fermentación. Tanto la kombucha como las infusiones inoculadas con los microorganismos probióticos se dejaron fermentando a 30°C durante 15 días, recogiendo muestras periódicamente (a los 0, 1, 2, 7 y 15 días). El análisis mediante HPLC (empleando una columna Sugar Pack de Waters y un HPLC con un detector de índice de refracción) de los azúcares así como del etanol presente en las muestras obtenidas demostró que la receta tradicional de la kombucha no era aplicable a estas infusiones ya que daba lugar a características poco deseadas como una elevada concentración de etanol, entre 1,3% y 2,5% según los casos a los 7 días (que haría que se tuviese que considerar como bebida alcohólica) (**figura 26**) y gran cantidad de azúcar residual (sacarosa no consumida, así como glucosa y fructosa producida a partir de la hidrólisis de la sacarosa por los microorganismos) (**figura 27, 28 y 29**).

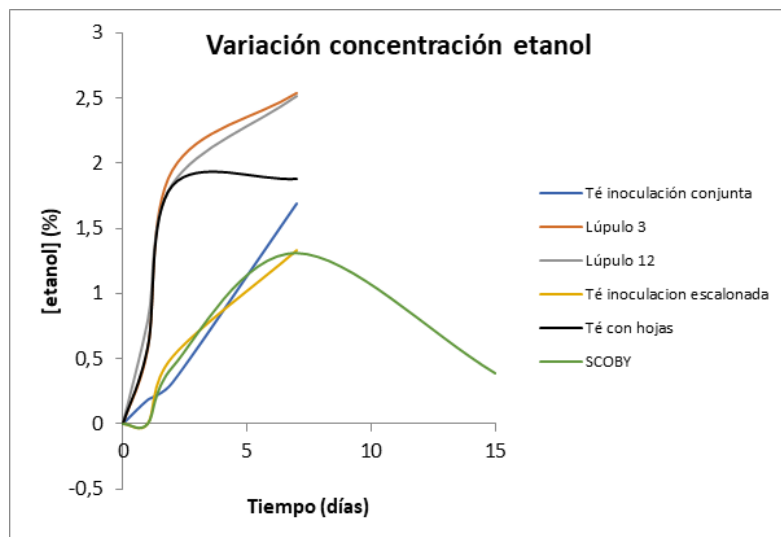


Figura 26. Datos de la variación de la concentración de etanol (%) a lo largo del tiempo empleando la receta tradicional de la kombucha, para la infusión en base a té (con inoculación conjunta de los probióticos o escalonada), lúpulo 3, lúpulo 12, infusión con las hojas del té y el SCOBY.

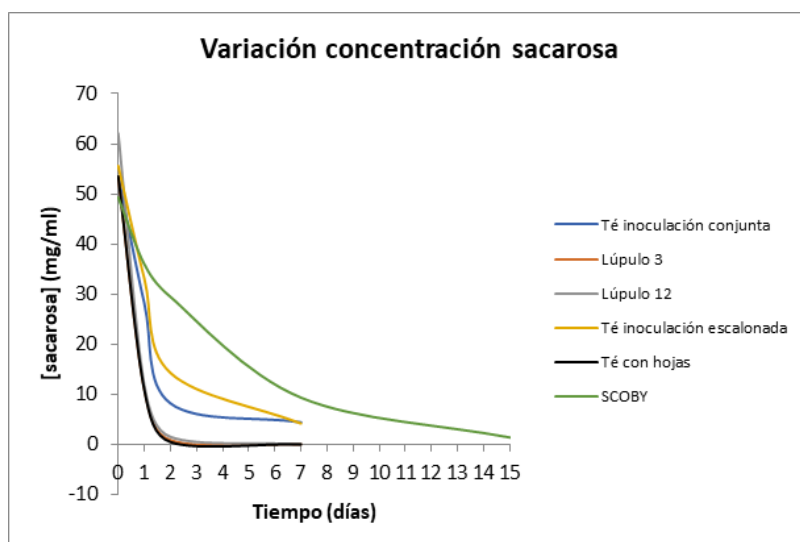


Figura 27. Datos de la variación de la concentración de sacarosa (mg/mL) a lo largo del tiempo empleando la receta tradicional de la kombucha, para la infusión en base a té (con inoculación conjunta de los probióticos o escalonada), lúpulo 3, lúpulo 12, infusión con las hojas del té y el SCOBY.

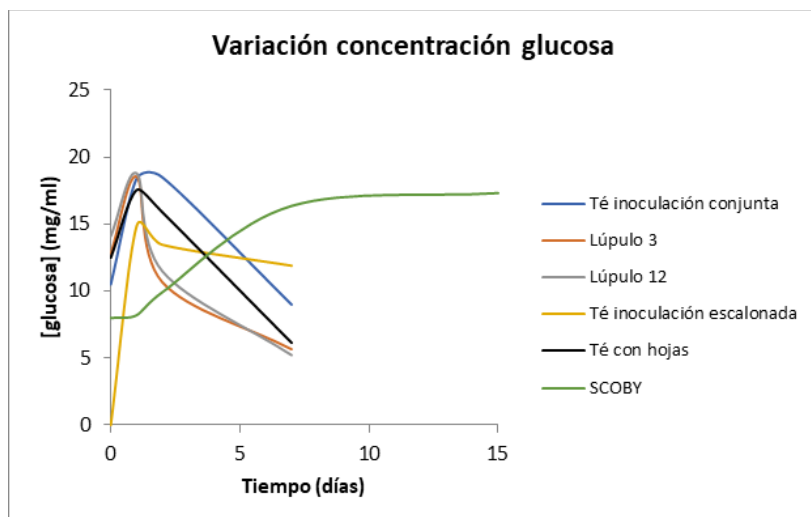


Figura 28. Datos de la variación de la concentración de glucosa (mg/mL) a lo largo del tiempo empleando la receta tradicional de la kombucha, para la infusión en base a té (con inoculación conjunta de los probióticos o escalonada), lúpulo 3, lúpulo 12, infusión con las hojas del té y el SCOBY.

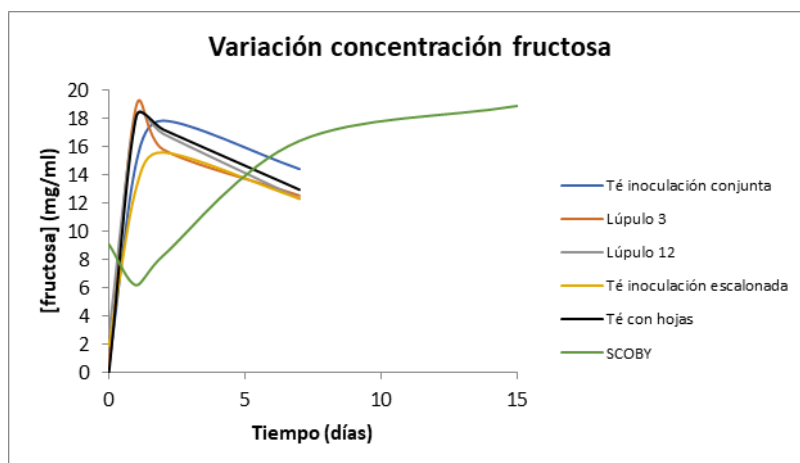


Figura 29. Datos de la variación de la concentración de fructosa (mg/mL) a lo largo del tiempo empleando la receta tradicional de la kombucha, para la infusión en base a té (con inoculación conjunta de los probióticos o escalonada), lúpulo 3, lúpulo 12, infusión con las hojas del té y el SCOBY.

Aunque la concentración de la sacarosa se aproximó a cero a siete días en el caso de las fermentaciones en base a lúpulo 3 y 12, y en el caso de la infusión manteniendo las hojas del té (**figura 27**), se mantienen concentraciones de glucosa entre 5 y 12 mg/mL (**figura 28**) y fructosa entre 12 y 14 mg/mL (**figura 29**). Para el caso del SCOBY comercial los valores de sacarosa, glucosa y fructosa son más elevados a los siete días comparado con el resto de las fermentaciones manteniéndose hasta los 15 días, salvo para la sacarosa que va disminuyendo. Con respecto a la inoculación conjunta de los microorganismos probióticos o de manera escalonada, se observó que el crecimiento de los microorganismos probióticos era mayor si se hacía de manera conjunta que de manera escalonada (**figura 27**), por lo que se decidió realizar el resto de los ensayos una inoculación conjunta. También se observó que mantener las hojas de té y/o lúpulo durante la fermentación facilitaba el crecimiento y el consumo de azúcares

(figura 27, 28 y 29), por lo que en los siguientes experimentos se mantuvieron las hojas de té y/o lúpulo a lo largo de la fermentación en vez de retirarlas desde un inicio.

Debido a estos resultados, con el objetivo de optimizar el proceso, se realizaron varias fermentaciones estudiando el efecto de disminuir la cantidad de sacarosa inicial (pasando de 50 g/L a 2 g/L), incrementar el inóculo inicial (pasando de 0,1 a 0,5 de absorbancia final al inicio de la infusión para asegurar el crecimiento de los probióticos), así como la adición de 5 g/L de glucosa para conseguir reducir la fase de latencia de los microorganismos y por tanto una adaptación más rápida a las condiciones de crecimiento. Las fermentaciones se realizaron para el té y para el lúpulo por separado, así como una combinación de ambos. Los resultados parecen indicar una mejora en prácticamente todos los parámetros analizados al reducir la cantidad de sacarosa inicial, incrementar el inóculo inicial, la adición de un 0,5% de glucosa y el mantenimiento durante las fermentaciones de las hojas de té o de lúpulo. Se observa en la figura 30 que los niveles de los azúcares analizados descienden prácticamente a cero tras un día de fermentación. En cuanto al etanol, se produce un pequeño pico a las 24 horas que rápidamente es consumido por los microorganismos (figura 30).

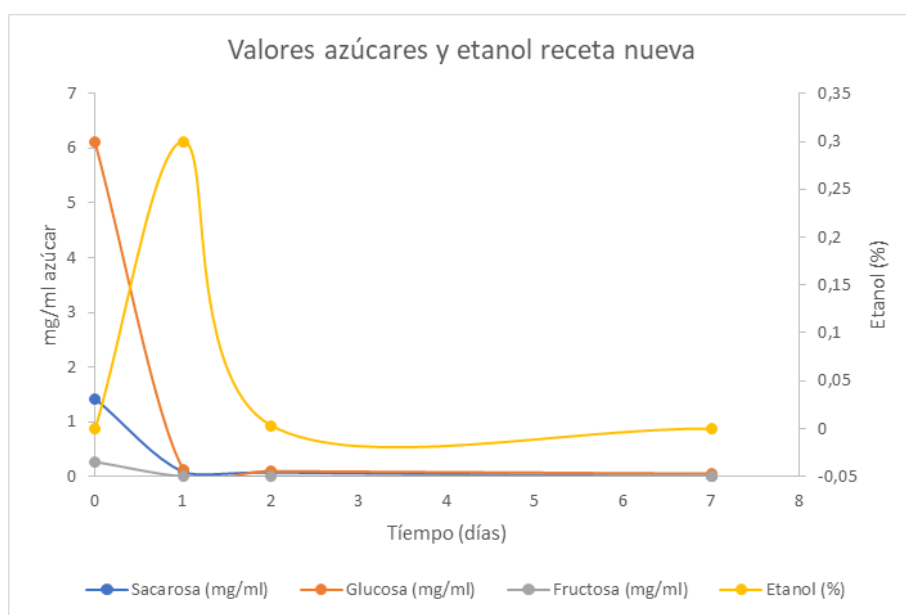


Figura 30. Datos de la variación de la concentración (mg/mL) de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) y etanol (%) a lo largo del tiempo empleando la receta nueva para la infusión en base a hojas del té.

En todas las fermentaciones realizadas además de analizar los niveles de azúcares y etanol en la muestra, se determinó el pH, los principales ácidos orgánicos (ácido glucónico, ácido glucurónico y ácido acético), la viabilidad celular y la capacidad antioxidante.

El pH, en todas las fermentaciones analizadas, tras siete días fue inferior a 4,2 (un pH superior podría indicar una contaminación o una temperatura de fermentación baja) y nunca se alcanzaron pHs inferiores a 2,5 que se considerarían inseguros para el consumidor (figura 31).

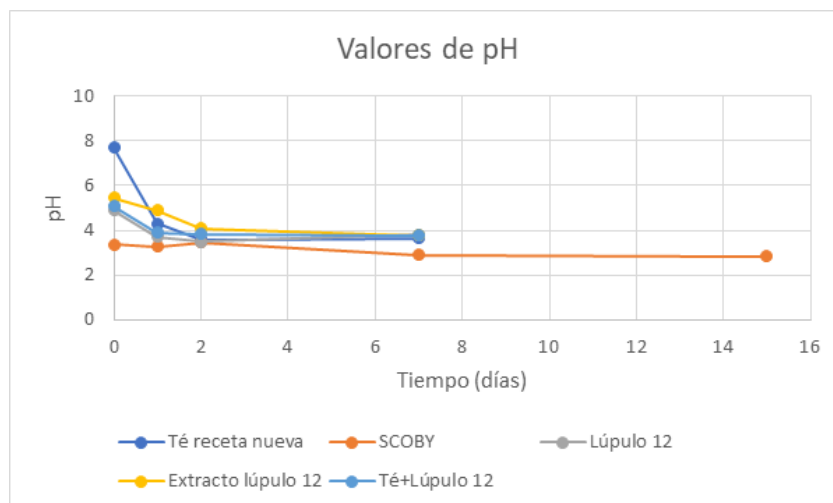


Figura 31. Datos de la variación de los valores de pH para alguna de las fermentaciones analizadas.

La determinación de los principales ácidos orgánicos se realizó empleando kits comerciales de la casa Megazyme. En lo que respecta al ácido glucónico (responsable del sabor agradablemente ácido en las bebidas fermentadas como la kombucha) se incrementó con respecto al tiempo cero, superando a los dos días de fermentación los valores alcanzados por el SCOBY comercial (**figura 32**).

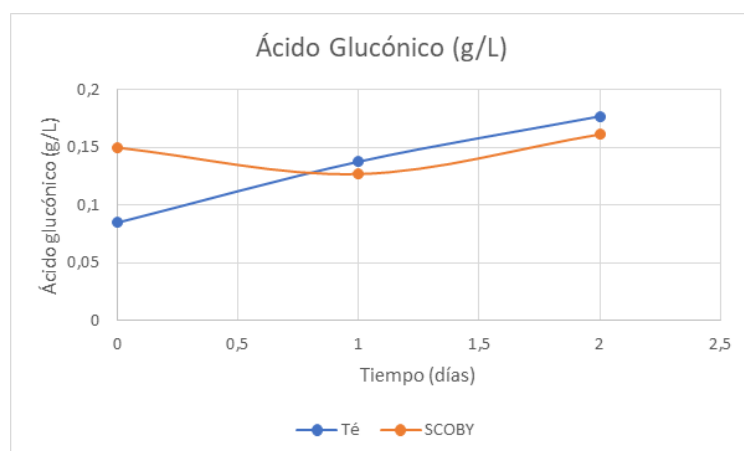


Figura 32. Datos de la variación de los valores de ácido glucónico (g/L) para la infusión en base a té y la producida por el SOBY comercial.

Por otra parte, el ácido glucurónico, un compuesto bioactivo bien conocido por sus beneficios en la salud, obtenido para la bebida fermentada en base al lúpulo (muestra número 12) alcanzó a lo largo de los 7 días valores superiores a los obtenidos con la bebida tradicional kombucha producida por el SCOBY comercial (**figura 33**). Para el caso de la bebida fermentada en base a té y en base al lúpulo 3, se obtuvieron valores superiores de ácido glucurónico durante las primeras 24 horas de fermentación con respecto a la bebida tradicional, disminuyendo posteriormente (**figura 34**).

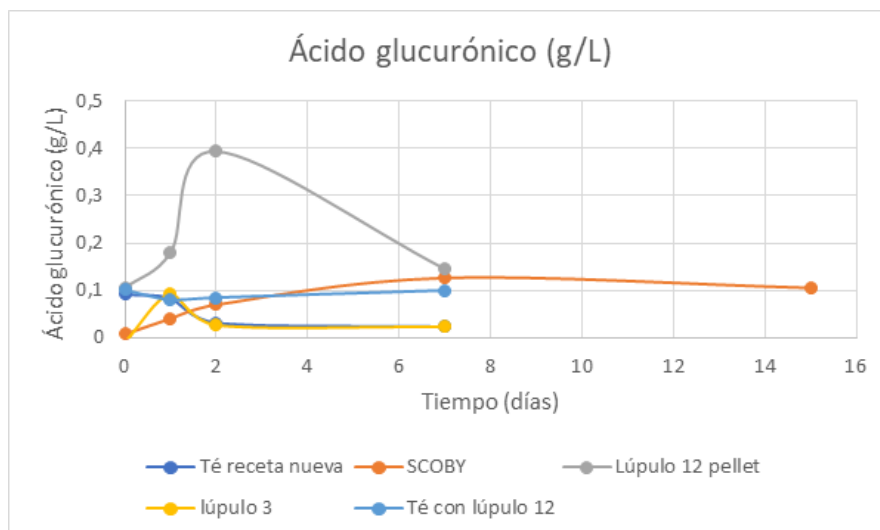


Figura 33. Datos de la variación de los valores de ácido glucurónico (g/L) para las infusiones en base a té, a lúpulo 13, lúpulo 12, té y lúpulo 12 y la producida por el SOBY comercial.

Por último, el ácido acético, compuesto en general no deseado en las bebidas fermentadas por producir un sabor desagradable astringente y ácido, aumenta ligeramente a los dos días pero luego parece disminuir en la bebida fermentada en base a té, mientras que aumenta a los 7 y 15 días en la bebida tradicional kombucha producida por el SCOBY comercial (**figura 34**).

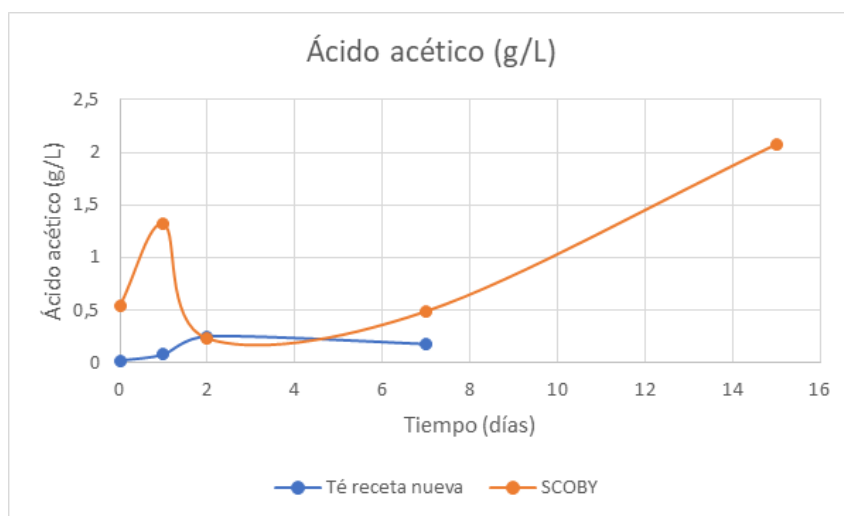


Figura 34. Datos de la variación de los valores de ácido acético (g/L) para las infusiones en base a té y la producida por el SOBY comercial.

Para la viabilidad celular, se hicieron siembras en placa para hacer recuento de UFC (Unidades Formadoras de Colonia) /mL de *L. plantarum* y *S. boulardii*. Se ha observado incremento en las UFCs de ambos microorganismos al cabo de las 48 horas de fermentación, siendo mayoritaria la población de levaduras, *S. boulardii*, sobre la de bacterias, *L. plantarum* (**figura 35**). Además, para el caso de la levadura *S. boulardii* se ha visto que mantiene viable el 32% de las células tras un mes en nevera a 4°C, mientras que la bacteria *L. plantarum* el 100% de las células se mantienen viables tras ese período de tiempo.

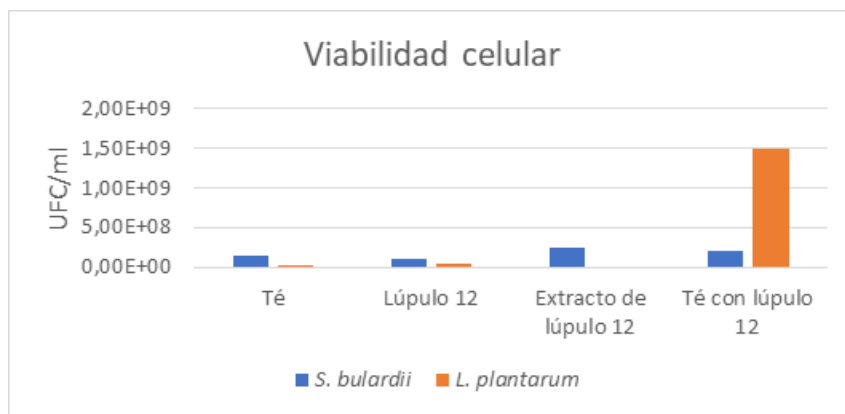


Figura 35. Datos de células viables de *S. boulardii* y *L. plantarum* tras 48h de fermentación en diferentes infusiones. El número de células viables de *L. plantarum* en la infusión en base al extracto de lúpulo 12 no se pudo determinar con exactitud debido a que había pocas colonias.

Por último, también se determinó la capacidad antioxidante total (TAC) de las muestras fermentadas, para lo que se evaluó la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ . El Cu^+ forma un complejo coloreado con un reactivo colorante, siendo la intensidad de color a 570 nm proporcional a la capacidad antioxidante total en la muestra. Para las muestras analizadas se ha observado un incremento en la capacidad antioxidante total al cabo de las 24 horas de fermentación que disminuye ligeramente a las 48 horas, manteniéndose hasta más de 7 días. La capacidad antioxidante total alcanzada con la bebida en base a té fue superior a la alcanzada con la kombucha elaborada de forma tradicional con el SCOBY comercial (**figura 36**).

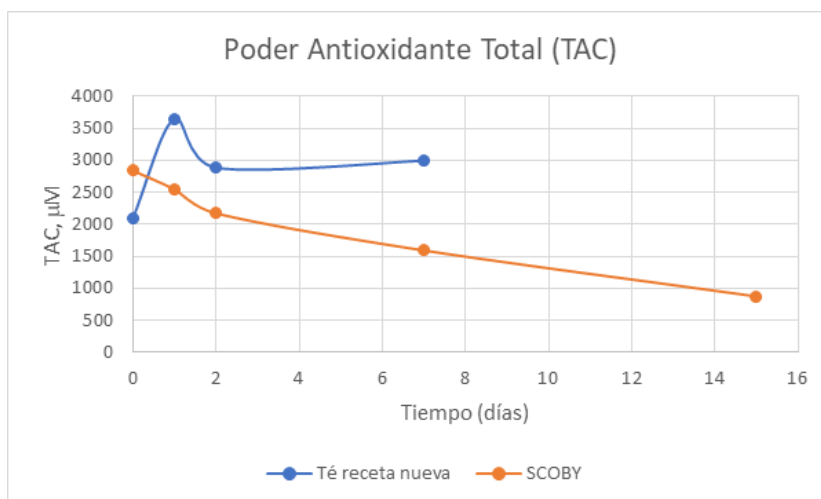


Figura 36. Datos de la variación de los valores del poder antioxidante total (TAC, µM) para las infusiones en base a té y la producida por el SCOBY comercial.

De todos los resultados extraídos parece concluirse que se ha obtenido una bebida fermentada en base al té y lúpulo novedosa, con probióticos, con mayor capacidad antioxidante y con mayor contenido en compuestos bioactivos que el propio té y la bebida fermentada tradicional en base al té, la kombucha.

Actividad 2.2. Desarrollo de procesos fermentativos de mezclas de materias primas y mejora de su bioactividad.

Una vez realizados diferentes procesos fermentativos individualizados para cada una de las especies, *Camellia sinensis* e inflorescencias de *Humulus Lupulus*, la UDC desarrolló procesos fermentativos combinando ambas especies y buscando de ese modo mejorar así la bioactividad inicial que presentan por separado. Dado que la muestra de pellet del lúpulo 12 dio mejores valores de compuestos bioactivos (ácido glucurónico fundamentalmente) en las pruebas individuales que el extracto de lúpulo 12 o la muestra número 3 de lúpulo, se decidió combinar el pellet del lúpulo 12 (1,5 g/L) con las hojas de té (3 g/L) para realizar las infusiones. La variación de azúcares a lo largo de 7 días de fermentación en el caso de la mezcla sinérgica de té y lúpulo 12 (**figura 37**) da un patrón similar al obtenido para la infusión con el té solo empleando la receta nueva (**figura 30**).

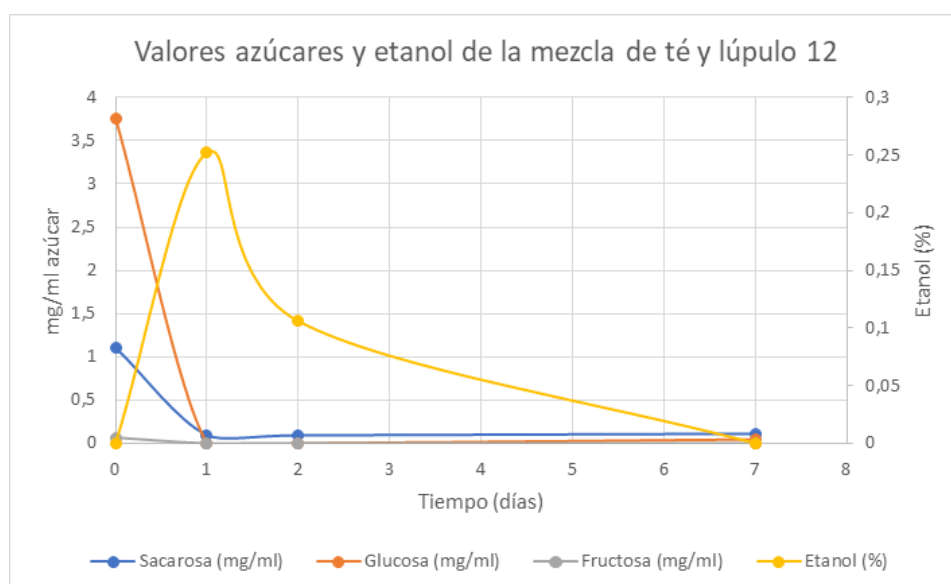


Figura 37. Datos de la variación de la concentración (mg/mL) de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) y etanol (%) a lo largo del tiempo empleando la receta nueva para la infusión en base a las hojas del té y lúpulo 12.

El valor de pH osciló entre 5,09 al inicio de la fermentación y 3,76 al cabo de 7 días (**figura 31**). Con respecto al compuesto bioactivo, el ácido glucurónico, se mantuvo al cabo de los dos días por encima de los valores obtenidos para la infusión en base a té solo, pero curiosamente fueron inferiores a los alcanzados por la infusión con lúpulo 12 (**figura 33**). Por otra parte, el número de células viables tras 48 h de fermentación de los probióticos *L. plantarum* y *S. bulardii* fueron superiores a las existentes en la fermentación con té solo o con el lúpulo 12 únicamente (**figura 35**). Especialmente notorio es el incremento en 42 veces del número de bacterias en la infusión combinada de té con lúpulo con respecto a la infusión con sólo lúpulo 12 (**figura 35**).

Por tanto, la mezcla sinérgica de té y lúpulo 12 parece mejorar los valores de compuestos bioactivos (ácido glucurónico) y la viabilidad de los probióticos *L. plantarum* y *S. bulardii*.

ACTIVIDAD 3. ENSAYOS DE OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DE PROCESO Y COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DEL PRODUCTO FINAL.

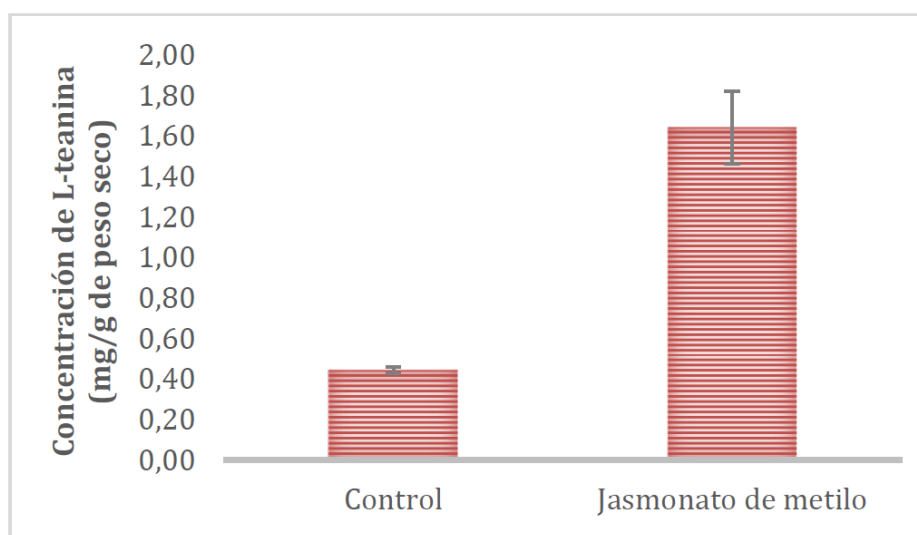
Actividad 3.1. Optimización del contenido en L-teanina de las hojas de té.

Para estudiar la biosíntesis de L-teanina a nivel celular, AREEIRO estableció una línea celular indiferenciada de *C. sinensis* en condiciones *in vitro*, procedente de callos (masas de células indiferenciadas en medio sólido) inducidos a partir de hojas de *C. sinensis* (**figura 38**). Los callos se indujeron a partir de hojas de plántulas *C. sinensis* previamente cultivada *in vitro*, mediante el uso de reguladores de crecimiento específicos como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (auxina) y la Kinetina (citoquinina). Una vez los callos se han establecido, se inicia el cultivo líquido de estas células indiferenciadas en matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad en agitadores orbitales (**figura 38**).



Figura 38. Callos de *C. sinensis* vistos a la lupa a 35 aumentos (izquierda) y matraz Erlenmeyer de 500 mL con cultivo de células indiferenciadas de *C. sinensis* (derecha)

El objetivo de la actividad es identificar y cuantificar el aminoácido L-teanina en la línea celular establecida, así como inducir o elicitar la biosíntesis de este aminoácido a nivel celular. Para ello se seleccionó la molécula jasmonato de metilo por ser un elicitor químico de compuestos bioactivos en células indiferenciadas en diferentes especies vegetales. Se comprobó que el jasmonato de metilo induce la síntesis de L-teanina llegando a triplicar el rendimiento de este aminoácido en las células de *C. sinensis* (**gráfica 5**). Además, las células desdiferenciadas de *C. sinensis* elicitadas con jasmonato de metilo biosintetizan más cantidad de L-teanina que las hojas de campo en los meses de brotación de mayo a septiembre.



Gráfica 5. Efecto en la síntesis de L-teanina del elicitor del jasmonato de metilo en las células de *C. sinensis*.

Por otro lado, AREEIRO también estudió el cultivo de hairyroots de *C. sinensis* como un posible sistema de producción de biomasa con potencial nutracéutico, debida a la síntesis *in vitro* de L-teanina. Las hairyroots o raíces pilosas son raíces neoplásicas obtenidas mediante transformación genética por la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*, lo que permite su cultivo en medios libres reguladores de crecimiento (sin auxinas y citoquininas).

Según trabajos previos (Zhang et al., 2007), los explantos con una mayor tasa de inducción de raíces pilosas son segmentos nodales. Para ello, previamente se multiplicaron plántulas de *C. sinensis* establecidas en condiciones *in vitro*, cuyos segmentos nodales y hojas se han utilizado como explantos para la inducción de hairyroots.

Mediante el método propuesto por Zhang et al. (2007) se indujeron hairyroots de *C. sinensis* usando la bacteria *A. rhizogenes*. Para ello, en primer lugar, se cultivó la bacteria *A. rhizogenes* en medio líquido YEB (Yeast Manitol Broth) y se utilizó el cultivo en fase de crecimiento exponencial para infectar segmentos nodales y hojas de plántulas de *C. sinensis*. Tras la infección de los explantos, estos se cocultivaron con la bacteria durante 3 días en condiciones de oscuridad a 25°C y en un medio de cocultivo con sales Murahsige en Skoog y acetosiringona. La acetosiringona es un compuesto fenólico secretado por los tejidos vegetales heridos que atrae quimiotácticamente a la bacteria *A. rhizogenes* y activa genes del plásmido Ri implicados en la transformación genética de las células vegetales. Tras el tiempo de cocultivo, los explantos se lavaron con antibiótico cefotaxima para inhibir el crecimiento de la bacteria y tras esto se cultivaron en medio sólido con antibiótico. Los ensayos se realizaron para estudiar la influencia del método de infección (inyección de la bacteria o sumergir el explanto en el cultivo bacteriano) y del tipo de explanto (segmentos nodales y hojas), en el

porcentaje de inducción de hairyroots. Cada tratamiento se realizó con un mínimo de 30 explantos, con 10 explantos por placa y tres réplicas (**figura 39**).

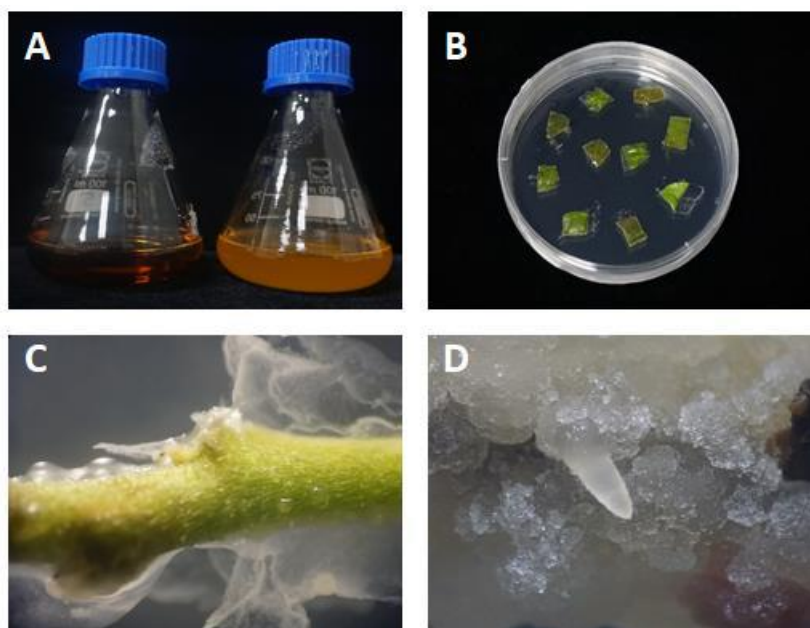


Figura 39. A: Cultivo de *A. rhizogenes* en medio líquido; B: placa de Petri con hojas infectadas con *A. rhizogenes*; C: segmento nodal cocultivado durante 3 días con *A. rhizogenes*; D: hairyroots procedente de un segmento nodal a 35 aumentos.

Se observó que los segmentos nodales eran mucho más reactivos que las hojas, obteniéndose una frecuencia de inducción de hairyroots del 73,3% (**figura 40**) a partir de los segmentos nodales y un 0% a partir de las hojas. Además, se observó que el método de infección del explanto (por inyección de la bacteria o por contacto del explanto con el cultivo bacteriano líquido) no producía diferencias grandes en el porcentaje de inducción en los segmentos nodales.



Figura 40. Detalle de hairyroots de *C. sinensis*.

Posteriormente a la inducción, se comprobó la presencia de los genes introducidos por la bacteria *A. rhizogenes* en las células de *C. sinensis*, que son las responsables de la inducción de las hairyroots o raíces neoplásicas. Para ello, se seleccionaron dos genes del plásmido Ri de *A.*

rhizogenes, rolB y rolC. Estos genes se encuentran localizados en el plásmido Ri de la bacteria y se integran en el ADN de la célula vegetal huésped, siendo responsables de la inducción de las hairyroots.

Para ello, se realizó la extracción del ADN de las hairyroots inducidas mediante un kit comercial. A partir del ADN extraído, se amplificaron las regiones correspondientes a los genes rolB y rolC mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR (PolymeraseChainReaction), mediante el uso de cebadores o primers específicos en el trabajo de Zhang y colaboradores (2007). Las condiciones de amplificación también se especifican en el trabajo de Zhang y colaboradores.

Tras la amplificación de ambos genes, el ADN se visualizó en un gel de agarosa al 1% junto con un marcador molecular (**figura 41**). La presencia de un fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb) para el gen rolB y de 500 pb para el gen rolC, confirmó que las raíces inducidas eran raíces pilosas o hairyroots (**figura 41**), es decir, raíces neoplásicas transformadas genéticamente. Esto se debe a que el tamaño real del amplicón es de 640 pb para el gen rolB y 490 pb para el gen rolC.

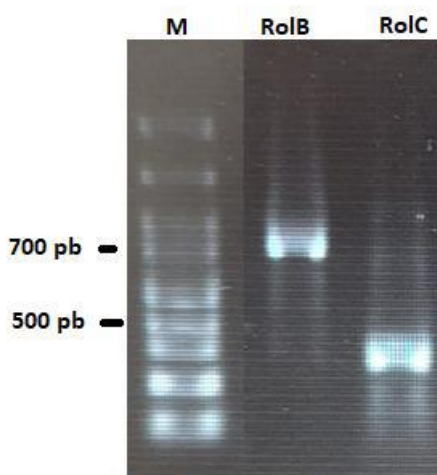


Figura 41. Detección por PCR de los genes rolB y rolC a partir del ADN extraído de las hairyroots inducidas.

Tras la inducción se inició una etapa de establecimiento y multiplicación de las hairyroots inducidas, utilizando dos medios de cultivo diferentes (Murashige and Skoog o Gamborg B5). Debido a la duración del proyecto, las hairyroots aún están en etapa de multiplicación y no se han podido cultivar en medio líquido debido al poco material de inóculo existente, por lo que no se ha podido escalar este cultivo a escala de biorreactor. Por esta misma razón, tampoco se ha podido analizar la capacidad de las hairyroots de sintetizar L-teanina en condiciones *in vitro*.

Actividad 3.2. Optimización de las variables del proceso fermentativo.

Actividad 3.3. Empleo de modelos matemáticos para la obtención de mezclas sinérgicas.

Teniendo en cuenta todo el conocimiento adquirido con las fermentaciones realizadas anteriormente, la UDC diseñó tres planes factoriales completos para evaluar la influencia del tiempo de cultivo, el inóculo inicial y la concentración de té y lúpulo 12 (en el caso de la mezcla sinérgica de té y lúpulo) sobre la producción de compuestos bioactivos, principalmente ácido glucurónico, y la capacidad antioxidante. Con el fin de desarrollar productos nutraceuticos, se emplean modelos matemáticos que permitan optimizar los procesos de mezcla, así como las variables de proceso que entran en juego, consiguiendo de ese modo maximizar los potenciales beneficios para las distintas aplicaciones que se pretenden cubrir. Para una mejor comprensión de los resultados se muestra a continuación el trabajo conjunto realizado en la actividad 3.2 (optimización de las variables del proceso fermentativo) y la actividad 3.3. (empleo de modelos matemáticos para la obtención de mezclas sinérgicas).

Los datos estadísticos (plan factorial y el método de la máxima pendiente) fueron analizados con la ayuda del programa informático *StatGraphics Plus* para *Windows* (*StatisticalGraphicsCorporation*) versión 5.1. La significativa estadística de las diferencias entre medias fue determinada mediante el *test t* de Student realizado con el mismo *software*. Aquellos valores con un $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

Los dominios y los criterios de codificación de las variables ensayadas están en la **tabla 4**.

Tabla 4. Dominios experimentales y codificación de las variables.

Valor codificado	Valores naturales		
	T: Tiempo (Días)	I: Inóculo (OD 600 nm)	C: Concentración de té o lúpulo* (% p/V)
-1	2	0,1	0,3
0	4	0,5	0,6
+1	6	0,9	0,9

Codificación: $V_c = (V_n - V_0) / \Delta V_n$; Descodificación $V_n = V_0 + (\Delta V_n \times V_c)$ donde V_c =valor codificado, V_n =valor natural, V_0 =valor natural en el centro del dominio experimental, ΔV_n =incremento del valor natural correspondiente a un incremento unidad del valor codificado.

*En la mezcla sinérgica de té y lúpulo se mantuvo la concentración de té constante al 1,2% p/V variando la del lúpulo.

Para cada uno de los experimentos realizados en el plan factorial (recogidos en las tablas de 5 a 10) se cogieron muestras para evaluar la cantidad de ácido glucurónico presente (en g/L) (**tablas 5, 7 y 9**) y el poder antioxidante (TAC, Total Antioxidant Capacity, μM) (**tablas 6, 8 y 10**).

Tabla 5. Resultados experimentales del plan factorial del té y valores esperados según el modelo predicho para el ácido glucurónico. Variables según la tabla 4.

	T	I	C	Glucurónico observado (g/L)	Glucurónico esperado (g/L)	Residuos
1	-1	-1	-1	0,114345114	0,0477135	0,066631614
2	-1	1	-1	0,021829522	0,0477135	-0,025883978
3	1	-1	1	0,13247012	0,139639	-0,00716888
4	0	0	0	0,046812749	0,0936762	-0,046863451
5	1	1	-1	0,037848606	0,0477135	-0,009864894
6	-1	1	1	0,205821206	0,139639	0,066182206
7	-1	-1	1	0,172557173	0,139639	0,032918173
8	0	0	0	0,091633466	0,0936762	-0,002042734
9	1	-1	-1	0,053784861	0,0477135	0,006071361
10	1	1	1	0,084661355	0,139639	-0,054977645
11	0	0	0	0,0687251	0,0936762	-0,0249511
12	0	0	0	0,093625498	0,0936762	-5,0702E-05

Tabla 6. Resultados experimentales del plan factorial del té y valores esperados según el modelo predicho para el poder antioxidante. Variables según la tabla 4.

	T	I	C	Poder Antioxidante observado (TAC mM)	Poder Antioxidante esperado (TAC mM)	Residuos
1	-1	-1	-1	5196,110805	5549,88	-353,769195
2	-1	1	-1	4205,099982	3601,34	603,759982
3	1	-1	1	14155,38433	14027,0	128,38433
4	0	0	0	8303,063658	8583,18	-280,116342
5	1	1	-1	5865,712713	5744,07	121,642713
6	-1	1	1	11101,99963	10498,2	603,79963
7	-1	-1	1	8195,927353	8549,7	-353,772647
8	0	0	0	8664,648688	8583,18	81,468688
9	1	-1	-1	6334,434049	6206,09	128,344049
10	1	1	1	14610,71363	14489,1	121,61363
11	0	0	0	8155,751238	8583,18	-427,428762
12	0	0	0	8209,319391	8583,18	-373,860609

Tabla 7. Resultados experimentales del plan factorial del lúpulo 12 y valores esperados según el modelo predicho para el ácido glucurónico. Variables según la tabla 4.

	T	I	C	Glucurónico observado (g/L)	Glucurónico esperado (g/L)	Residuos
1	-1	-1	-1	0	-0,0237721	0,0237721
2	-1	1	-1	0	-0,0237721	0,0237721
3	1	-1	1	0,105210421	0,126529	-0,021319
4	0	0	0	0	0,0513782	-0,0513782
5	1	1	-1	0,058116232	0,059673	-0,0015568
6	-1	1	1	0	0,0430835	-0,0430835
7	-1	-1	1	0,085057471	0,0430835	0,041974
8	0	0	0	0,067816092	0,0513782	0,0164379
9	1	-1	-1	0,06012024	0,059673	0,0004472
10	1	1	1	0,195390782	0,126529	0,068862
11	0	0	0	0,031034483	0,0513782	-0,0203437
12	0	0	0	0,013793103	0,0513782	-0,0375851

Tabla 8. Resultados experimentales del plan factorial del lúpulo 12 y valores esperados según el modelo predicho para el poder antioxidante. Variables según la tabla 4.

	T	I	C	Poder Antioxidante observado (TAC mM)	Poder Antioxidante esperado (TAC mM)	Residuos
1	-1	-1	-1	432,563	597,397	-164,834
2	-1	1	-1	637,461	597,397	40,064
3	1	-1	1	1274,92	1344,0	-69,08
4	0	0	0	956,192	970,7	-14,508
5	1	1	-1	649,514	597,397	52,117
6	-1	1	1	1370,01	1344,0	26,01
7	-1	-1	1	1470,45	1344,0	126,45
8	0	0	0	1098,15	970,7	127,45
9	1	-1	-1	480,774	597,397	-116,623
10	1	1	1	1071,36	1344,0	-272,64
11	0	0	0	977,619	970,7	6,919
12	0	0	0	1229,39	970,7	258,69

Tabla 9. Resultados experimentales del plan factorial de la mezcla sinérgica del té con el lúpulo 12 y valores esperados según el modelo predicho para el ácido glucurónico. Variables según tabla 4.

	T	I	C	Glucurónico observado (g/L)	Glucurónico esperado (g/L)	Residuos
1	-1	-1	-1	0,0787589	0,141705	-0,0629461
2	-1	1	-1	0,101432	0,141705	-0,040273
3	1	-1	1	0,125	0,0111442	0,1138558
4	0	0	0	0,0746269	0,142004	-0,0673771
5	1	1	-1	0,242188	0,272863	-0,030675
6	-1	1	1	0,0823389	0,142302	-0,0599631
7	-1	-1	1	0,0990453	0,142302	-0,0432567
8	0	0	0	0,158582	0,142004	0,016578
9	1	-1	-1	0,40625	0,272863	0,133387
10	1	1	1	0,0	0,0111442	-0,0111442
11	0	0	0	0,177239	0,142004	0,035235
12	0	0	0	0,158582	0,142004	0,016578

Tabla 10. Resultados experimentales del plan factorial de la mezcla sinérgica del té con el lúpulo 12 y valores esperados según el modelo predicho para el poder antioxidante. Variables según tabla 4.

	T	I	C	Poder Antioxidante observado (TAC mM)	Poder Antioxidante esperado (TAC mM)	Residuos
1	-1	-1	-1	17677,5	17595,5	82
2	-1	1	-1	17141,8	17595,5	-453,7
3	1	-1	1	11744,8	12831,2	-1086,4
4	0	0	0	16499,0	15213,4	1285,6
5	1	1	-1	14008,1	12831,2	1176,9
6	-1	1	1	18869,4	17595,5	1273,9
7	-1	-1	1	16405,2	17595,5	-1190,3
8	0	0	0	15990,1	15213,4	776,7
9	1	-1	-1	13097,4	12831,2	266,2
10	1	1	1	12186,8	12831,2	-644,4
11	0	0	0	15159,8	15213,4	-53,6

12	0	0	0	13780,4	15213,4	-1433
----	---	---	---	---------	---------	-------

Según los datos experimentales observados, se realizaron las tablas ANOVA (**tablas 11 a 16**) en las que se eliminaron los efectos no significativos, quedándonos únicamente con aquellos efectos que tienen un p-valor por debajo de 0,05 y por lo tanto presentan un efecto significativo. En todos los casos, se comprobó mediante el test de la falta de ajuste si los modelos generados son adecuados para describir los datos observados experimentalmente o si era necesario emplear un modelo más complicado. Dado que en todos los casos el p-valor para la hipótesis de la falta de ajuste es mayor del 0,05 los modelos serían adecuados para los datos observados al 95% de confianza.

El R-cuadrado explicaría entre el 50,44% (plan factorial desarrollado para el té teniendo como respuesta la producción de compuestos bioactivos) y el 98,765% (plan factorial desarrollado para el té teniendo como respuesta el poder antioxidante) de los datos, bajando al 45,49% (plan factorial desarrollado para el té teniendo como respuesta la producción de compuestos bioactivos) y al 97,74% (plan factorial desarrollado para el té teniendo como respuesta el poder antioxidante) el R-cuadrado ajustado (más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes). Según el error estándar de la estimación, la desviación normal de los residuos es de 0,04 (plan factorial desarrollado para el té teniendo como respuesta la producción de compuestos bioactivos) y 229,2 (plan factorial desarrollado para el té teniendo como respuesta el poder antioxidante), siendo el promedio del valor de los residuos (error absoluto de la media) de 0,029 (plan factorial desarrollado para el té teniendo como respuesta la producción de compuestos bioactivos) y 298,2 (plan factorial desarrollado para el té teniendo como respuesta el poder antioxidante). Los valores de R-cuadrado, R-cuadrado ajustado, errores estándares de estimación, errores absolutos de la media del resto de planes factoriales están recogidos en la parte inferior de las tablas ANOVA respectivas.

El estadístico Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si existe alguna correlación significativa según el orden en que ocurren en el archivo de datos. Dado que el p-valor para el estadístico Durbin-Watson en todos los casos es superior a 0,05 no habría indicios de correlación de serie en los residuos.

Tabla 11. Análisis de la varianza sin los coeficientes no significativos para el plan factorial desarrollado para el té teniendo como respuesta la producción de compuestos bioactivos (ácido glucurónico).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{calculada}	Valor P
C: Concentración de té	0,0169006	1	0,0169006	10,45	0,0103
Falta de ajuste	0,0020484	1	0,0020484	1,27	0,2895 (NS)
Error Puro	0,0145561	9	0,00161734		

Total (Corr.)	0,0335051	11			
----------------------	-----------	----	--	--	--

NS = No significativo; R-cuadrado = 50,4419%; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 45,4861%; Error estándar de estimación = 0,0402162; Error absoluto de la media = 0,0286339; Estadístico Durbin-Watson = 1,5225 (P=0,2051); Autocorrelación residual Lag 1 = 0,105058

Tabla 12. Análisis de la varianza sin los coeficientes no significativos para el plan factorial desarrollado para el té teniendo como respuesta el poder antioxidante.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{calculada}	Valor P
T: Tiempo	1,88102E7	1	1,88102E7	358,06	0,0003
C: Concentración de té	8,75341E7	1	8,75341E7	1666,25	0,0000
TC	5,55984E6	1	5,55984E6	105,83	0,0020
IC	2,90542E6	1	2,90542E6	55,31	0,0050
TIC	1,10487E6	1	1,10487E6	21,03	0,0195
Falta de ajuste	1,29186E6	3	430621,	8,20	0,0588 (NS)
Error Puro	157601,	3	52533,6		
Total (Corr.)	1,17364E8	11			

NS = No significativo; R-cuadrado = 98,765%; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 97,7358%; Error estándar de estimación = 229,202; Error absoluto de la media = 298,159; Estadístico Durbin-Watson = 2,15008 (P=0,4986); Autocorrelación residual Lag 1 = -0,166427

Tabla 13. Análisis de la varianza sin los coeficientes no significativos para el plan factorial desarrollado para el lúpulo 12 teniendo como respuesta la producción de compuestos bioactivos (ácido glucurónico).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{calculada}	Valor P
T: Tiempo	0,0139262	1	0,0139262	9,50	0,0178
C: Concentración de lúpulo	0,00893933	1	0,00893933	6,10	0,0429
Falta de ajuste	0,00441785	2	0,00220893	1,51	0,2857 (NS)
Error Puro	0,0102659	7	0,00146656		
Total (Corr.)	0,0375492	11			

NS = No significativo; R-cuadrado = 60,8947%; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 52,2046%; Error estándar de estimación = 0,0382957; Error absoluto de la media = 0,0292109; Estadístico Durbin-Watson = 1,92196 (P=0,4249); Autocorrelación residual Lag 1 = -0,0283231

Tabla 14. Análisis de la varianza sin los coeficientes no significativos para el plan factorial desarrollado para el lúpulo 12 teniendo como respuesta el poder antioxidante.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{calculada}	Valor P
C: Concentración de lúpulo	1,11484E6	1	1,11484E6	58,83	0,0000
Falta de ajuste	53737,0	1	53737,0	2,84	0,1265 (NS)
Error Puro	170545,	9	18949,5		
Total (Corr.)	1,33912E6	11			

NS = No significativo; R-cuadrado = 83,2516 %; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 81,5767%; Error estándar de estimación = 137,657; Error absoluto de la media = 106,281; Estadístico Durbin-Watson = 1,32662 (P=0,1172); Autocorrelación residual Lag 1 = 0,126932

Tabla 15. Análisis de la varianza sin los coeficientes no significativos para el plan factorial desarrollado para la mezcla sinérgica de té y lúpulo 12 teniendo como respuesta la producción de compuestos bioactivos (ácido glucurónico).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{calculada}	Valor P
C: Concentración de lúpulo	0,0340924	1	0,0340924	8,52	0,0224
TC	0,0344047	1	0,0344047	8,60	0,0219
Falta de ajuste	0,0212042	2	0,0106021	2,65	0,1390 (NS)
Error Puro	0,0279979	7	0,0039997		
Total (Corr.)	0,117699	11			

NS = No significativo; R-cuadrado = 58,1967%; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 48,9071%; Error estándar de estimación = 0,0632432; Error absoluto de la media = 0,0526059; Estadístico Durbin-Watson = 2,03674 (P=0,4642); Autocorrelación residual Lag 1 = -0,0614263

Tabla 16. Análisis de la varianza sin los coeficientes no significativos para el plan factorial desarrollado para la mezcla sinérgica de té y lúpulo 12 teniendo como respuesta el poder antioxidante.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{calculada}	Valor P
T: Tiempo	4,53955E7	1	4,53955E7	38,94	0,0002
Falta de ajuste	124355,	1	124355,	0,11	0,7514 (NS)
Error Puro	1,04915E7	9	1,16572E6		
Total (Corr.)	5,60114E7	11			

NS = No significativo; R-cuadrado = 81,047%; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 79,1517%; Error estándar de estimación = 1079,69; Error absoluto de la media = 810,218; Estadístico Durbin-Watson = 1,84799 (P=0,3652); Autocorrelación residual Lag 1 = -0,0210246

Los sistemas se podrían definir según las siguientes ecuaciones:

(1) Compuestos bioactivos_(té) = 0,0936762 + 0,0459627*C

(2) Poder antioxidante_(té) = 8583,18 + 1533,39*T + 3307,83*C + 833,654*T*C + 602,642*I*C - 371,629*T*I*C

(3) Compuestos bioactivos_(lúpulo 12) = 0,0513782 + 0,0417225*T + 0,0334278*C

(4) Poder antioxidante_(lúpulo 12) = 970,7 + 373,303*C

(5) Compuestos bioactivos_(té+lúpulo 12) = 0,142004 - 0,0652805*C - 0,0655789*T*C

(6) Poder antioxidante_(té+lúpulo 12) = 15213,4 - 2382,11*T

En las **tablas 5, 6, 7, 8, 9 y 10**, además de los datos experimentales obtenidos, están recogidos los resultados esperados para cada uno de los ensayos utilizando las ecuaciones anteriormente descritas (**tabla 5**, ecuación 1; **tabla 6**, ecuación 2; **tabla 7**, ecuación 3; **tabla 8**, ecuación 4; **tabla 9**, ecuación 5; y **tabla 10**, ecuación 6) y los residuos obtenidos (diferencia entre el valor observado y el esperado).

En los gráficos de efectos principales (**figura 42 a la 47**) el factor elegido varía del nivel -1 al +1, mientras que el resto se mantienen constantes en sus valores medios o centrados. Cuanto

mayor es la pendiente mayor será el efecto sobre la respuesta. Se puede observar claramente que para la respuesta de producción de compuestos bioactivos en el caso del plan factorial del té según el modelo el factor fundamental es la concentración del té (**figura 42**), mientras que para el caso del poder antioxidante influye la concentración del té y el tiempo de cultivo (**figura 43**). Sin embargo, en el caso del plan factorial obtenido para el lúpulo 12, los factores con mayor efecto son la concentración del lúpulo y el tiempo de cultivo para la respuesta producción de compuestos bioactivos (**figura 44**) y sólo influye la concentración de lúpulo para la respuesta poder antioxidante (**figura 45**). En el caso de la infusión en base a té y lúpulo para la respuesta producción de compuestos bioactivos a menor concentración de lúpulo se alcanzan mayores valores de estos compuestos (**figura 46**) y para la respuesta poder antioxidante a menor tiempo de cultivo mayores valores (**figura 47**).

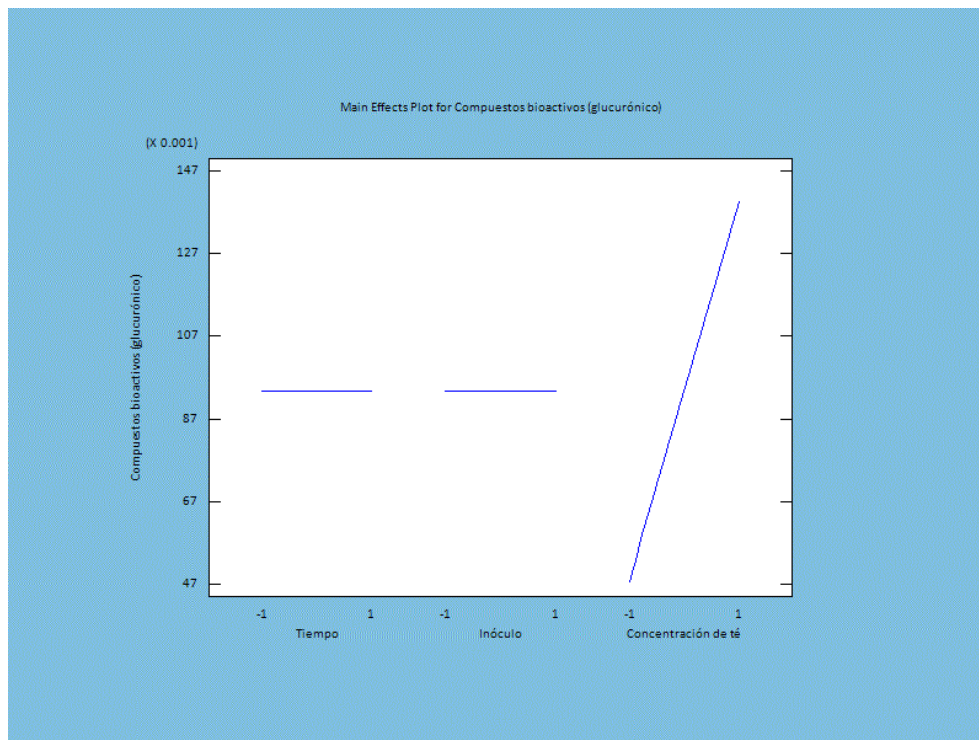


Figura 42. Gráfico de efectos principales establecido para el modelo de la infusión en base de té para la respuesta producción de compuestos bioactivos.

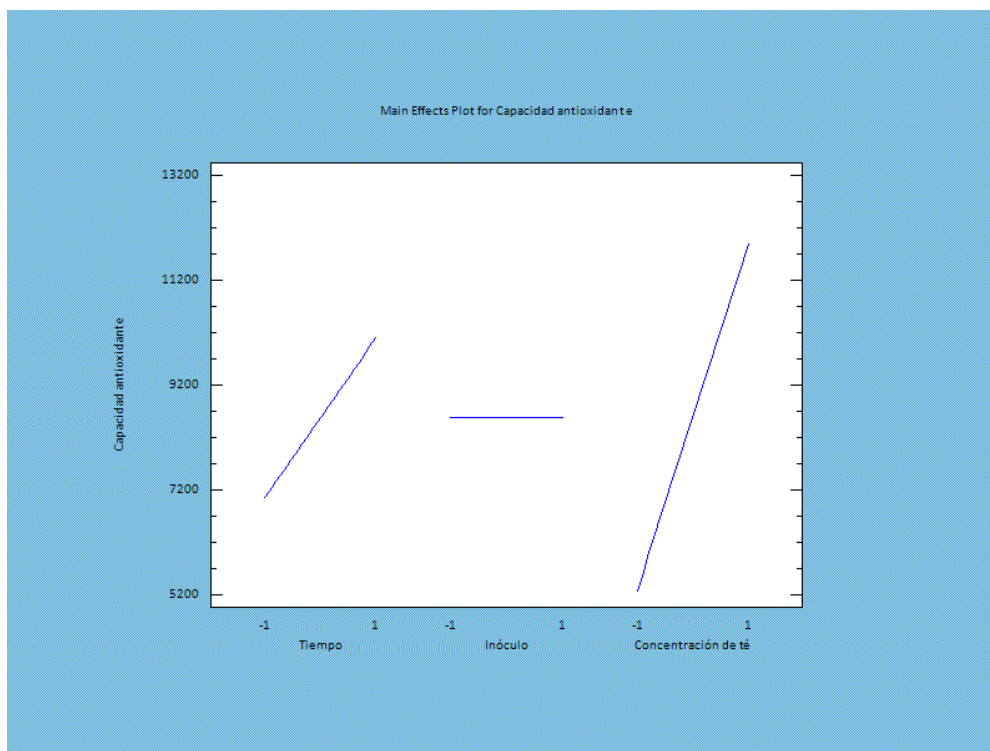


Figura 43. Gráfico de efectos principales establecido para el modelo de la infusión en base de té para la respuesta capacidad antioxidante.

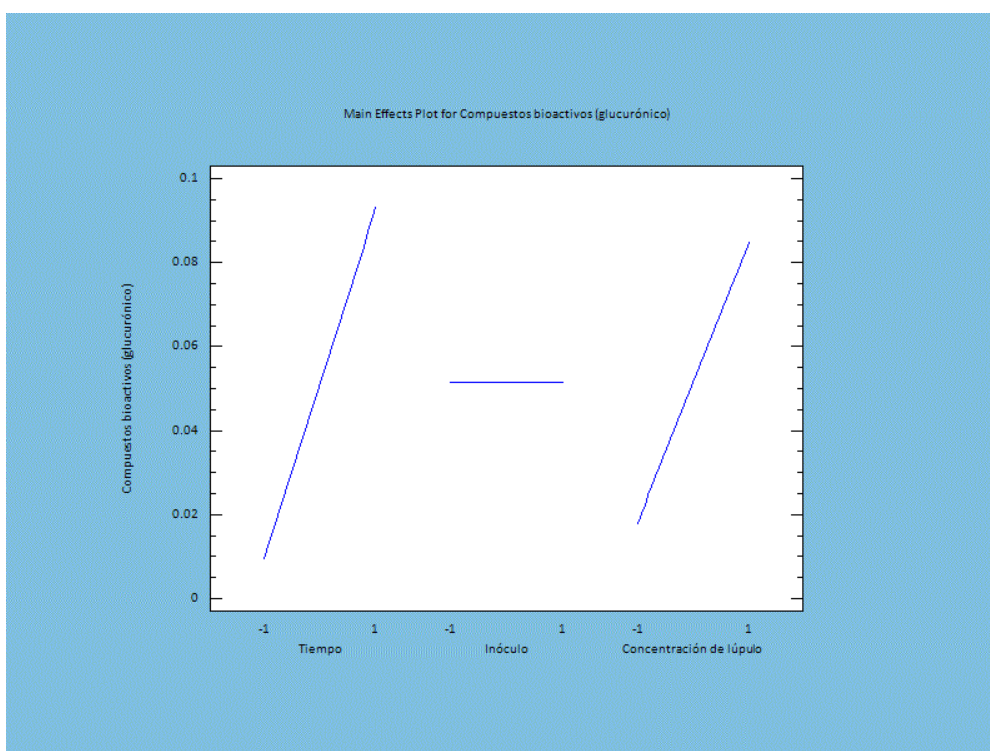


Figura 44. Gráfico de efectos principales establecido para el modelo de la infusión en base a lúpulo 12 para la respuesta producción de compuestos bioactivos.

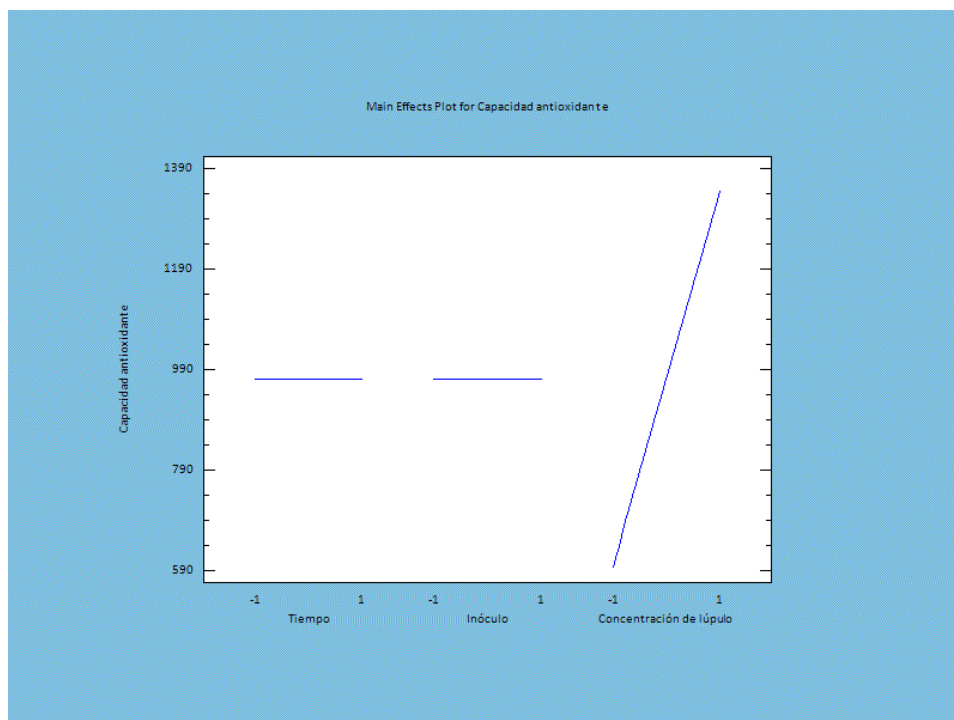


Figura 45. Gráfico de efectos principales establecido para el modelo de la infusión en base a lúpulo 12 para la respuesta capacidad antioxidante.

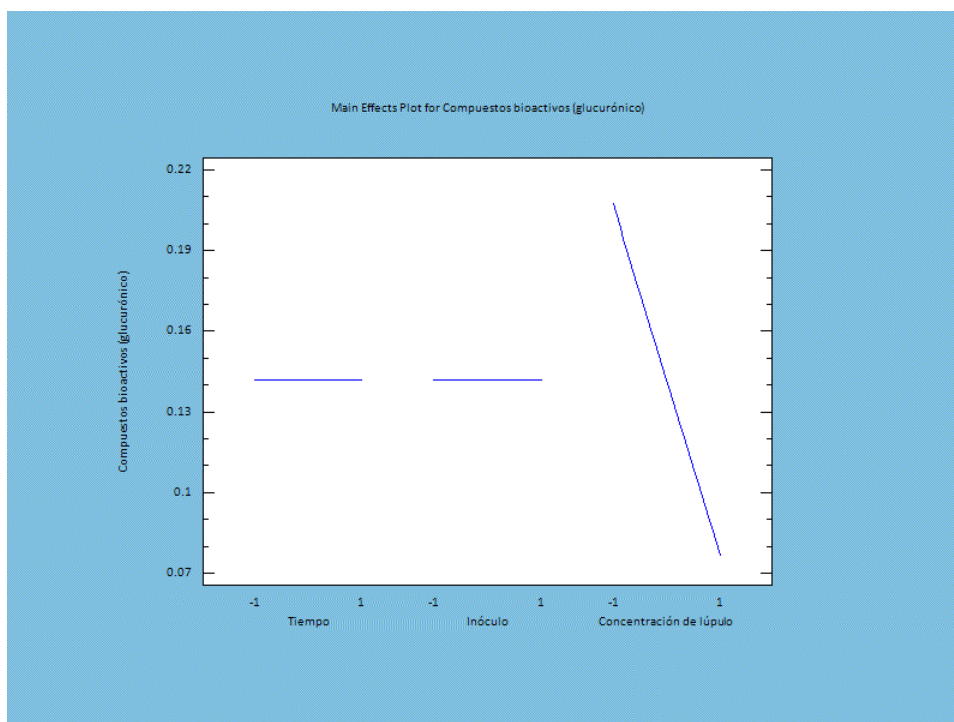


Figura 46. Gráfico de efectos principales establecido para el modelo de la infusión en base a té y lúpulo 12 para la respuesta producción de compuestos bioactivos.

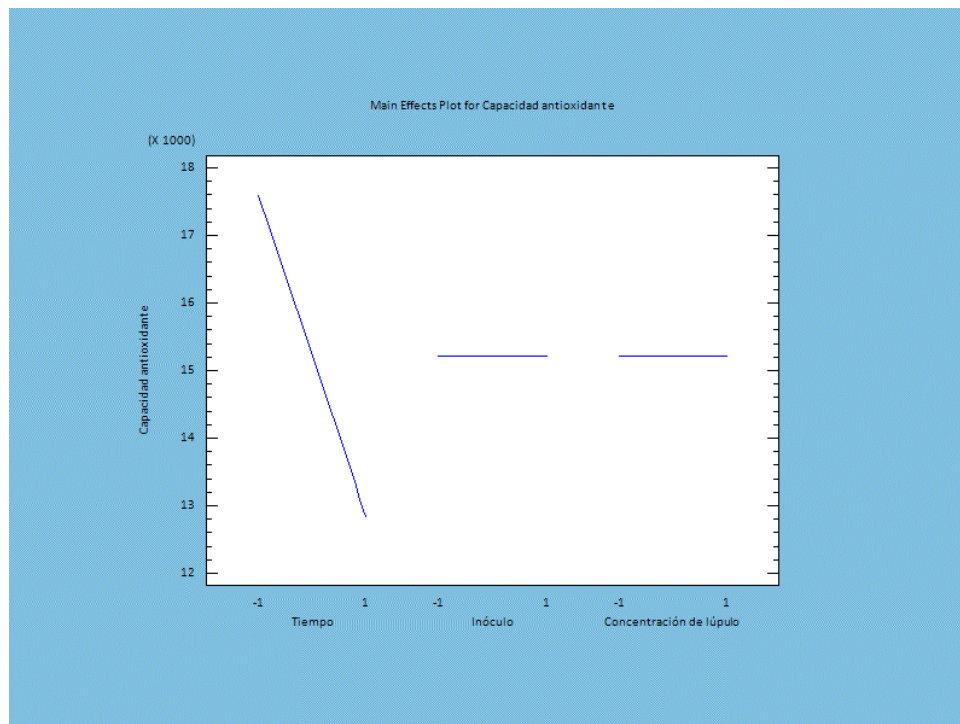


Figura 47. Gráfico de efectos principales establecido para el modelo de la infusión en base a té y lúpulo 12 para la respuesta capacidad antioxidante.

Aplicando las ecuaciones generadas para los diferentes modelos, se pueden obtener superficies de respuestas, planos definidos por 2 variables manteniendo fija la tercera variable en el punto central, representativas (**figura de 48 a 53**). Se observa en la **figura 48** que la respuesta, producción de compuestos bioactivos, para el modelo de la infusión en base a té, aumenta a medida que aumenta la concentración de té ($C=+1$). Mientras que para incrementar la capacidad antioxidante total (**figura 49**) hay que trabajar a concentraciones de té altas y mayores tiempos de incubación ($C=+1$; $T=+1$).

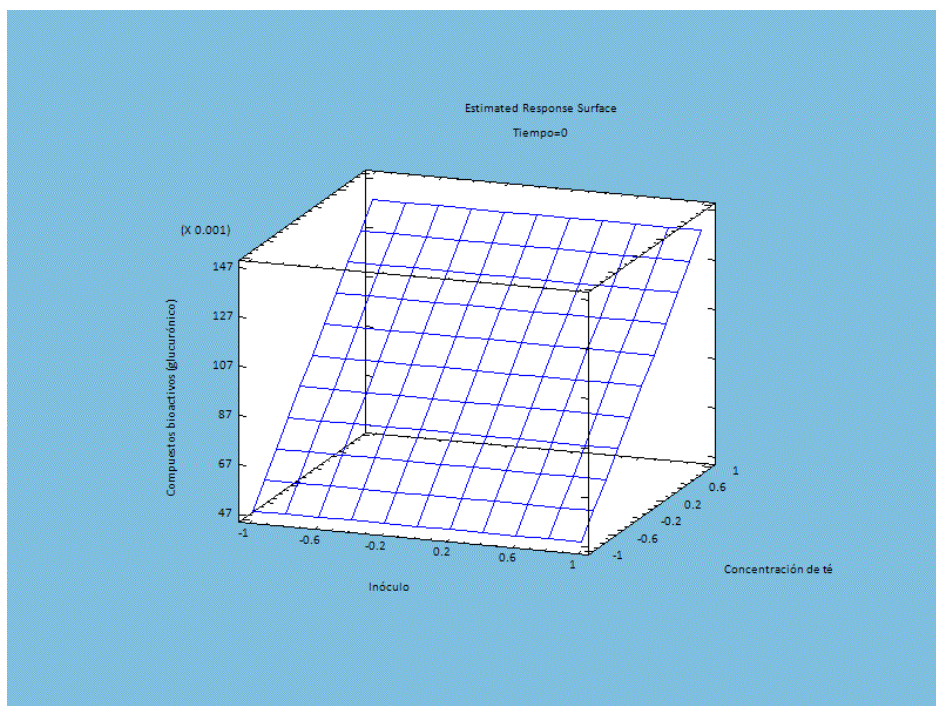


Figura 48. Superficie de respuesta obtenida para la producción de compuestos bioactivos para el modelo de la infusión en base a té. La respuesta viene dada en g/L.

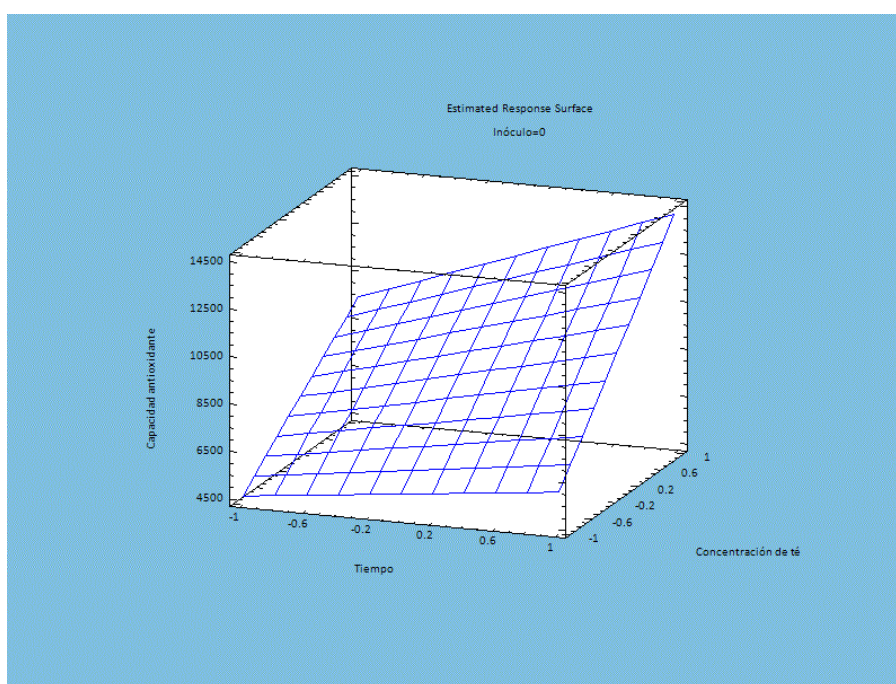


Figura 49. Superficie de respuesta obtenida para la capacidad antioxidante total para el modelo de la infusión en base a té. La respuesta viene dada en μM .

En cuanto al modelo generado para la infusión en base a lúpulo 12, la producción de compuestos bioactivos se incrementa con el tiempo y con la concentración de lúpulo (**figura 50**) ($C=+1$; $T=+1$). Y el poder antioxidante, aumenta al aumentar la concentración de lúpulo (**figura 51**) ($C=+1$).

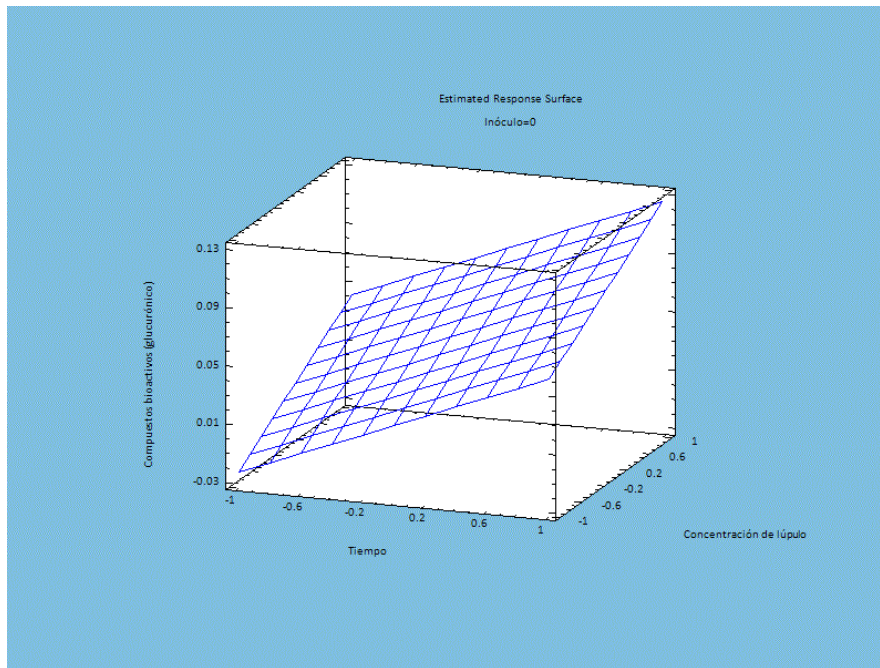


Figura 50. Superficie de respuesta obtenida para la producción de compuestos bioactivos para el modelo de la infusión en base a lúpulo 12. La respuesta viene dada en g/L.

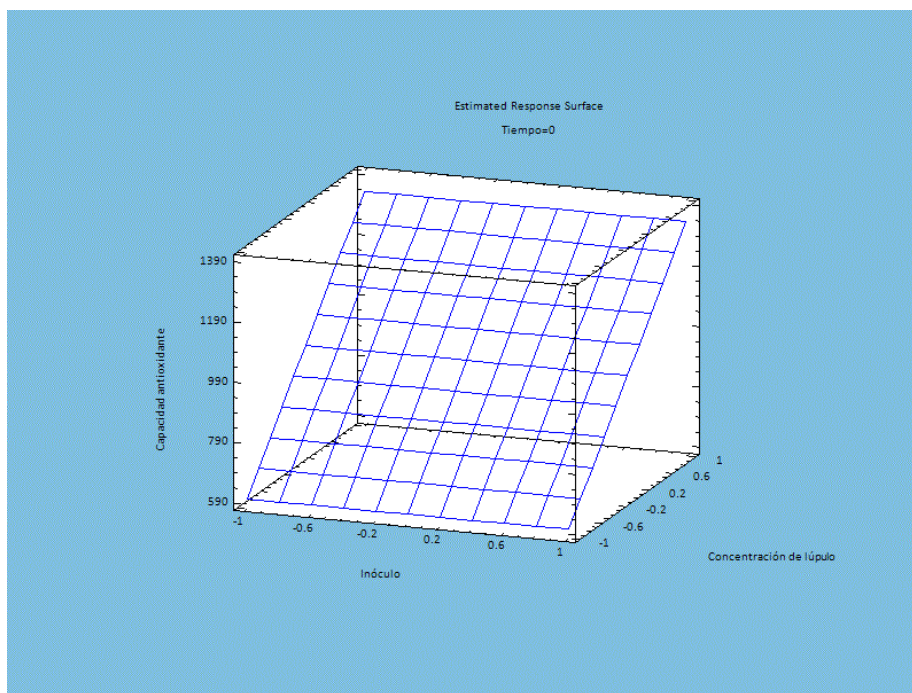


Figura 51. Superficie de respuesta obtenida para la capacidad antioxidante total para el modelo de la infusión en base a lúpulo 12. La respuesta viene dada en μM .

Por lo que respecta al modelo generado para la infusión en base a té y lúpulo 12, la producción de compuestos bioactivos se incrementa con el tiempo y disminuyendo la concentración de lúpulo (**figura 52**) ($C=-1$; $T=+1$). Y el poder antioxidante, aumenta al disminuir el tiempo (**figura 53**) ($T=-1$).

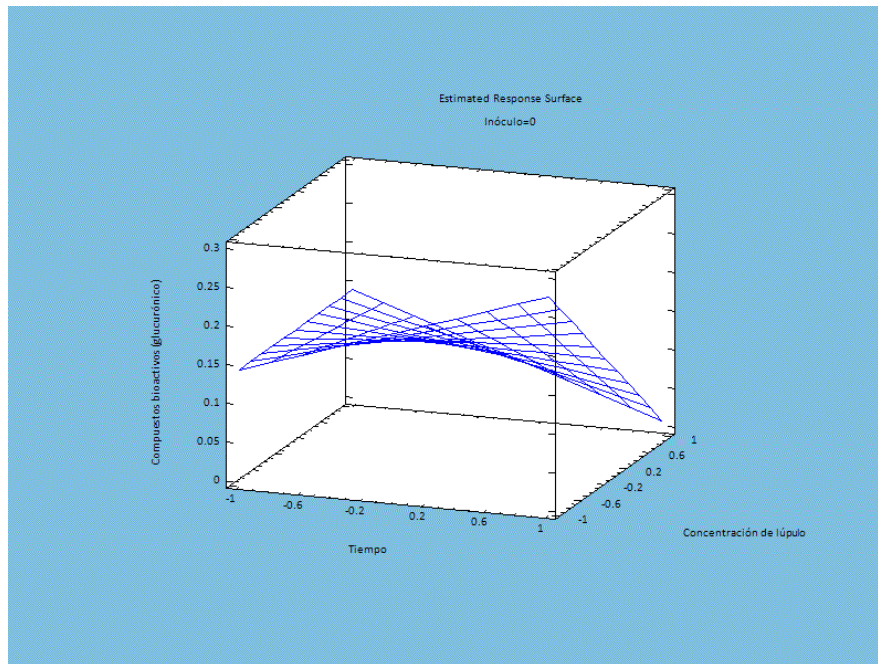


Figura 52. Superficie de respuesta obtenida para la producción de compuestos bioactivos para el modelo de la infusión en base a té y lúpulo 12. La respuesta viene dada en g/L.

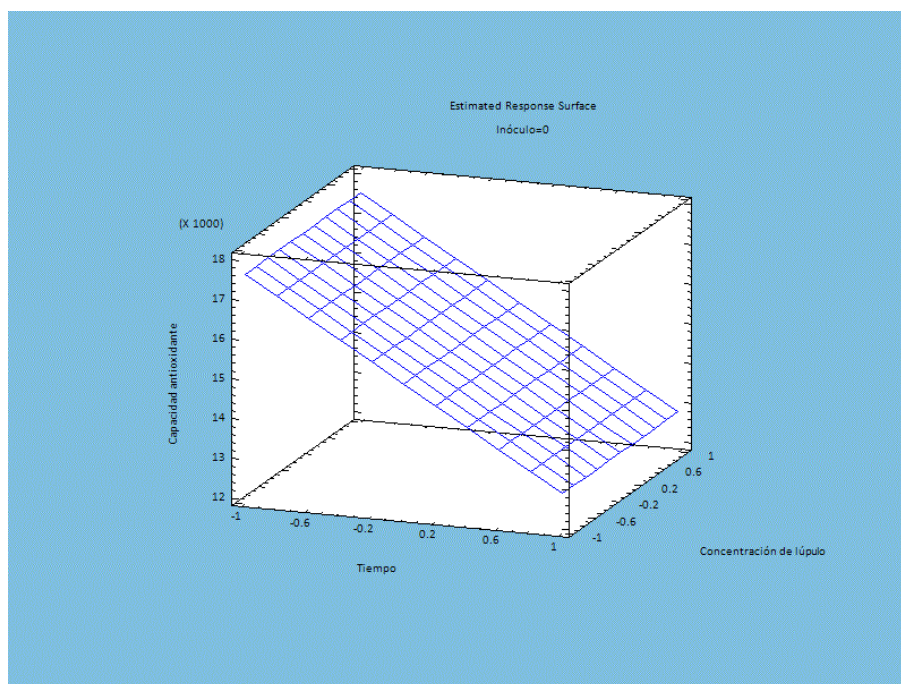


Figura 53. Superficie de respuesta obtenida para la capacidad antioxidante total para el modelo de la infusión en base a té y lúpulo 12. La respuesta viene dada en μM .

Método de la máxima pendiente

La UDC con la intención de encontrar óptimos fuera del dominio experimental, aplicó el método de la máxima pendiente, incrementando los valores de las variables en la dirección del incremento de la respuesta.

En el caso de la infusión en base a té para intentar maximizar la cantidad de compuestos bioactivos y poder antioxidante total se incrementó la concentración de té (ya que parece ser el factor más importante para ambas respuestas), incrementando ligeramente el tiempo de fermentación y manteniendo un inóculo intermedio. Por lo que se realizó un nuevo ensayo fuera del dominio experimental en el que las variables tomaron los siguientes valores: $T=1,21356$, $I=0,163152$ y $C=2,0$. Esto significó un tiempo de 6,4 días, un inóculo de 0,6 (OD_{600nm}) y una concentración de té de 1,2% p/V. Bajo estas condiciones se obtuvo al cabo de los 6,4 días una concentración de ácido glucurónico de $0,0556 \pm 0,00363$ y una capacidad de poder antioxidante total de $16673,088 \mu M \pm 149,127$, por lo que no se consiguió incrementar los valores de ácido glucurónico obtenidos dentro del plan factorial pero se incrementó en 1,14 veces la capacidad de poder antioxidante total (de $14610,7 \mu M$ se pasó a $16673,088 \mu M$).

Para la infusión en base a lúpulo 12, también se aplicó el método de la máxima pendiente y se realizó un nuevo ensayo fuera del dominio experimental en el que incrementó el factor más importante para ambas respuestas (la concentración de lúpulo) y las variables tomaron los siguientes valores: $T=0$, $I=0$ y $C=2,0$. Esto significó un tiempo de 4 días, un inóculo de 0,5 (OD_{600nm}) y una concentración de lúpulo de 1,2% p/V. En estas condiciones se obtuvo al cabo de 4 días una concentración de ácido glucurónico de $0,0447 \pm 0,0379$ y una capacidad de poder antioxidante total de $1705,25 \mu M \pm 207,61$, por lo que de nuevo no se consiguió incrementar los valores de ácido glucurónico obtenidos dentro del plan factorial, pero se incrementó en 1,16 veces la capacidad de poder antioxidante total (de $1470,45 \mu M$ se pasó a $1705,25 \mu M$).

Por último, se aplicó el método de la máxima pendiente para la infusión en base a té y lúpulo 12, realizando un nuevo ensayo fuera del dominio experimental en el que se disminuyó la concentración de lúpulo (factor más importante). Se exploró la condición de un tiempo de 2 días, un inóculo de 0,6 (OD_{600nm}) y una concentración de lúpulo de 0,15% p/V (manteniendo 1,2% p/V de té). En estas condiciones se obtuvo al cabo de los 2 días una concentración de ácido glucurónico de $0,1572 \pm 0,072$ y una capacidad de poder antioxidante total de $16570,4152 \mu M \pm 1433,72$, por lo que nuevamente no se consiguió incrementar los valores de ácido glucurónico obtenidos dentro del plan factorial y en este caso tampoco se incrementó la capacidad de poder antioxidante total. Esto implica que las condiciones que maximizan ambas respuestas se encuentran con probabilidad dentro del dominio experimental ensayado.

En resumen, el método de la máxima pendiente aplicado para encontrar óptimos fuera del dominio experimental de los planes factoriales realizados sirvió para mejorar la capacidad antioxidante total de las infusiones en base a té y en base a lúpulo 12. Mientras que la infusión en base a té y lúpulo 12 los óptimos se encuentran dentro del dominio experimental ensayado.

Actividad 4.1. Estudios de escalado, parámetros de influencia.

Escalado de los procesos fermentativos.

En esta última actividad se trabaja con el objetivo de trasladar a escala de producción los desarrollos realizados a nivel de laboratorio con el objetivo de evaluar y solucionar todos aquellos posibles inconvenientes que surjan durante el escalado del proceso, se presta especial atención a aquellas etapas vinculadas con los procesos fermentativos, por ser clave en la bioactividad final.

En esta actividad se intentó escalar los procesos fermentativos optimizados en las actividades previamente descritas (actividad 3.2 y 3.3) realizados por la UDC. Para ello, el grupo de investigación de la UDC realizó cultivos en las condiciones óptimas en fermentadores de 2 litros, analizando al cabo del tiempo la cantidad de compuestos bioactivos presentes (g/L de ácido glucurónico) y el poder antioxidante total (μM).

En el caso del escalado de la infusión en base a té, se observa (**figura 54**) que se mantienen los datos de ácido glucurónico y poder antioxidante total conseguidos a menor escala. Además, para el poder antioxidante se obtuvo en el mejor de los casos (día 2) un incremento de 1,14 veces la capacidad de poder antioxidante tota con respecto al cultivo realizado tras aplicar el método de la máxima pendiente y un incremento de 1,56 veces con respecto al máximo conseguido dentro del dominio del plan factorial.

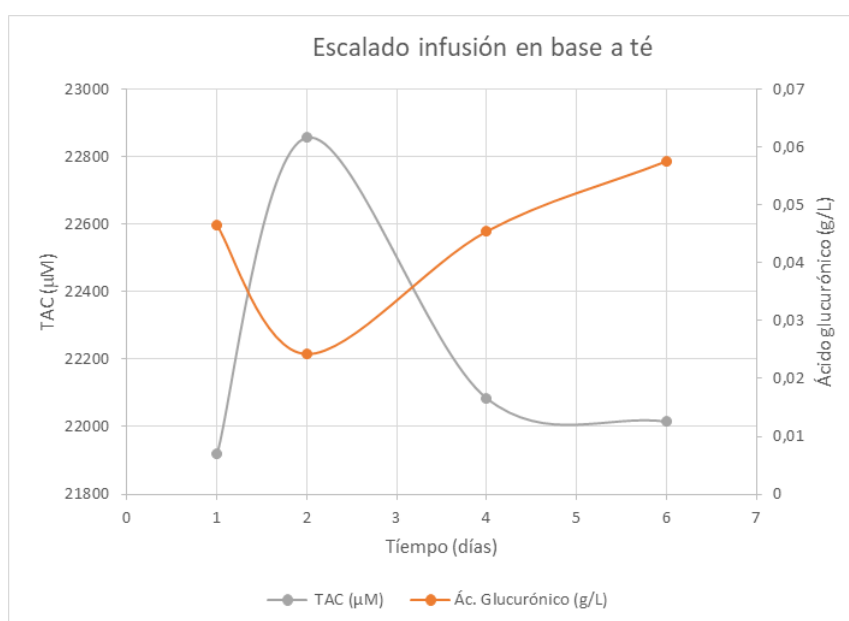


Figura 54. Datos de ácido glucurónico (g/L) y actividad antioxidante total (TAC, μM) obtenidos tras realizar a mayor escala la infusión en base a té.

Con respecto al escalado de la infusión en base a lúpulo 12, se observa (**figura 55**) que disminuyen ligeramente los datos de ácido glucurónico y poder antioxidante total conseguidos a menor escala pero se mantienen dentro del rango de los obtenidos dentro del dominio experimental.

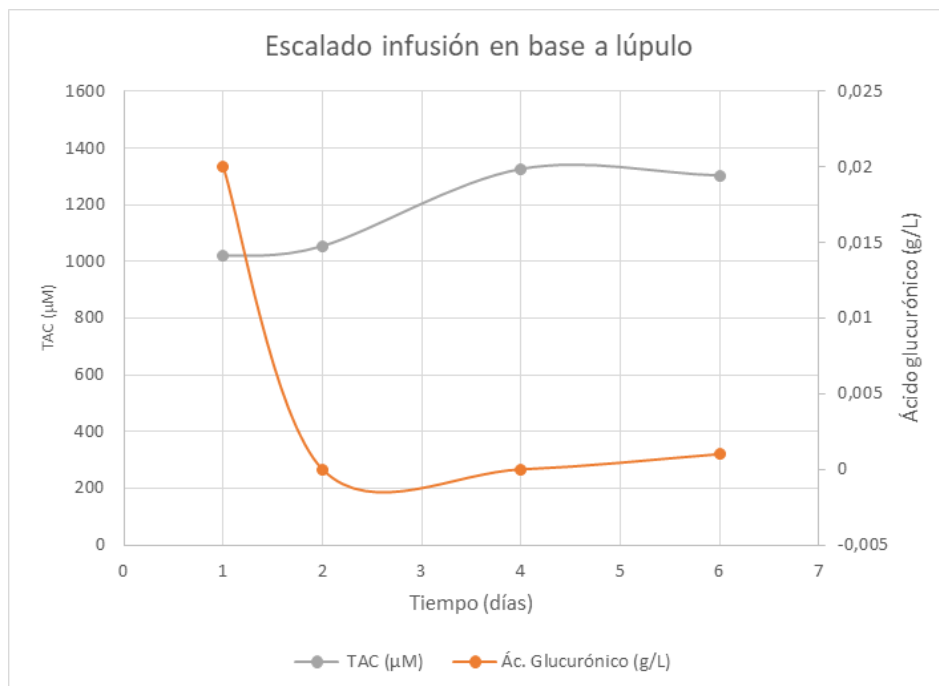


Figura 55. Datos de ácido glucurónico (g/L) y actividad antioxidante total (TAC, μM) obtenidos tras realizar a mayor escala la infusión en base a lúpulo 12.

Por último, en el caso del escalado de la infusión en base a té y lúpulo 12, se observa (**figura 56**) que se mantienen aproximadamente los datos de ácido glucurónico y poder antioxidante total conseguidos a menor escala. Además, para el poder antioxidante se obtuvo para el segundo día un incremento de 1,1 veces la capacidad de poder antioxidante total con respecto al cultivo realizado tras aplicar el método de la máxima pendiente y valores muy similares de TAC a los 4 y 6 días con respecto al máximo conseguido dentro del dominio del plan factorial.

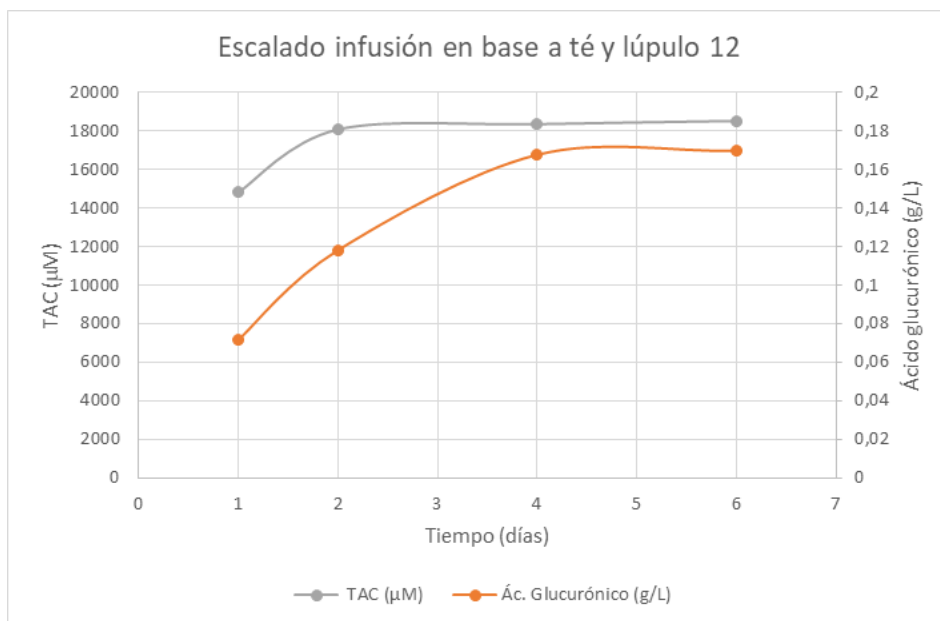


Figura 56. Datos de ácido glucurónico (g/L) y actividad antioxidante total (TAC, μM) obtenidos tras realizar a mayor escala la infusión en base a té y lúpulo 12.

En conclusión, se puede afirmar que la realización a mayor escala de las fermentaciones en condiciones ensayadas no solo mantiene los niveles de compuestos bioactivos presentes y de poder antioxidante total obtenidos a menor escala, sino que en algunos casos se incrementan estos valores, sobre todo con lo que respecta al poder antioxidante total.

Escalado del cultivo de células vegetales.

El proceso de escalado del cultivo de células vegetales de los matraces Erlenmeyer a un biorreactor a escala de I+D es un proceso clave. Esto se debe a que en el biorreactor es necesario estudiar y optimizar las condiciones fluido-dinámicas del cultivo, ya que son diferentes a las del cultivo en el Erlenmeyer. Entre los principales factores que afectan a las condiciones de cultivo fluido-dinámicas se encuentra el caudal de flujo de gas y la velocidad de agitación, ya que ambos factores tienen efectos en la homogeneización del medio de cultivo y también pueden provocar daños por cizallamiento a las células.

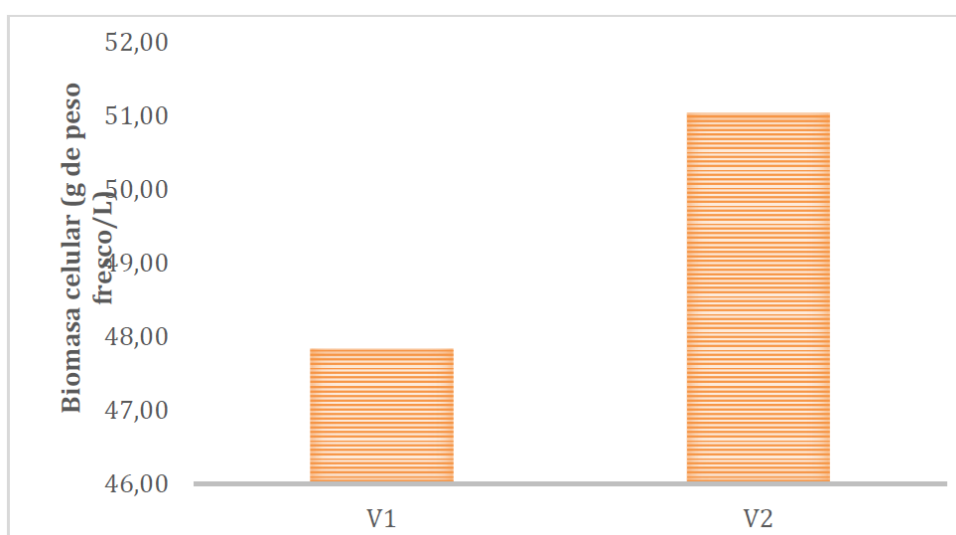
Para poder llevar a cabo esta parte del proyecto, AREEIRO ha considerado diferentes velocidades de agitación, con el fin de estudiar cómo afectan estos factores al crecimiento del cultivo celular, así como al rendimiento de L-teanina.

Todos los experimentos se realizaron en un biorreactor de tanque agitado (**figura 57**), modelo miniBio 500 de la marca Applikon® Biotechnology, compuesto por una cuba de vidrio de borosilicato y una unidad de control my-Control que permite registrar y controlar el pH, el oxígeno disuelto, la temperatura y el flujo molar de gas introducido al cultivo (a excepción del aire que se introduce a través de una válvula de aguja) mediante el software Lucillus.



Figura 57. Cultivo de células desdiferenciadas de *C. sinensis* en un biorreactor de tanque agitado a escala de laboratorio.

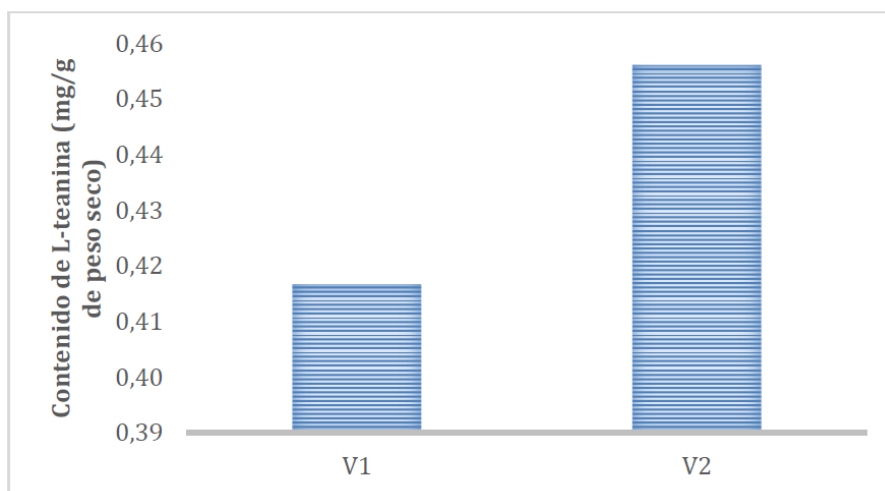
Se seleccionaron dos velocidades de agitación en el biorreactor de tanque agitado durante varias semanas de cultivo de la línea celular de *C. sinensis* desarrollada, para estudiar el efecto de la velocidad de agitación en el crecimiento celular. Se observa que con menor velocidad de agitación se incrementa ligeramente la productividad de biomasa en el biorreactor (**gráfica 6**).



Gráfica 6. Efecto de dos velocidades de agitación (V1 y V2) en el crecimiento de la suspensión celular en el biorreactor.

Asimismo, el rendimiento de L-teanina también está ligeramente influenciado por la velocidad de agitación (**gráfica 7**). Sin embargo, el rendimiento de L-teanina en el biorreactor de tanque agitado mediante el cultivo de células indiferenciadas de té da un rendimiento de en torno a

0,4 mg/g de peso seco, inferior al rendimiento de los brotes de las plantas cosechadas en campo a excepción del mes de julio.



Gráfica 7. Contenido de L-teanina (mg/g peso seco) en biomasa celular de *C. sinensis* cultivada en el biorreactor a diferentes velocidades de agitación (V1 y V2).

Actividad 4.2. Estudios de caracterización del producto final.

El proyecto finaliza con un análisis completo y exhaustivo de las propiedades de los productos desarrollados. Con ello se observa si ha existido alguna pérdida de propiedades con el escalado de la producción y al mismo tiempo permitirá conocer las características finales de los productos desarrollados, tanto en su composición fitoquímica como en sus propiedades funcionales.

GLECEX realizó la determinación del contenido total en polifenoles y la evaluación de la capacidad antioxidante por el ensayo de ORAC de los productos finales preparados a diferentes tiempos:

- **TE_2:** Producto a base de té. Día 2.
- **TE_4:** Producto a base de té. Día 4.
- **TE_6:** Producto a base de té. Día 6.
- **LU_2:** Producto a base de lúpulo. Día 2.
- **LU_4:** Producto a base de lúpulo. Día 4.
- **LU_6:** Producto a base de lúpulo. Día 6.
- **TELU_1:** Producto a base de té (1.2g) y lúpulo (0.15g). Día 1.
- **TELU_2:** Producto a base de té (1.2g) y lúpulo (0.15g). Día 2.
- **TELU_4:** Producto a base de té (1.2g) y lúpulo (0.15g). Día 4.

El contenido polifenólico de los productos a base de lúpulo (LU) es muy inferior al de los productos a base de té (TE), tal y como se muestra en la **figura 58**. No se han encontrado grandes diferencias significativas a los diferentes tiempos de preparación, a diferencia de la muestra TELU_4, preparada durante 4 días con una mezcla de té y lúpulo, que presenta el mayor contenido polifenólico (1653 mg GAE/L).

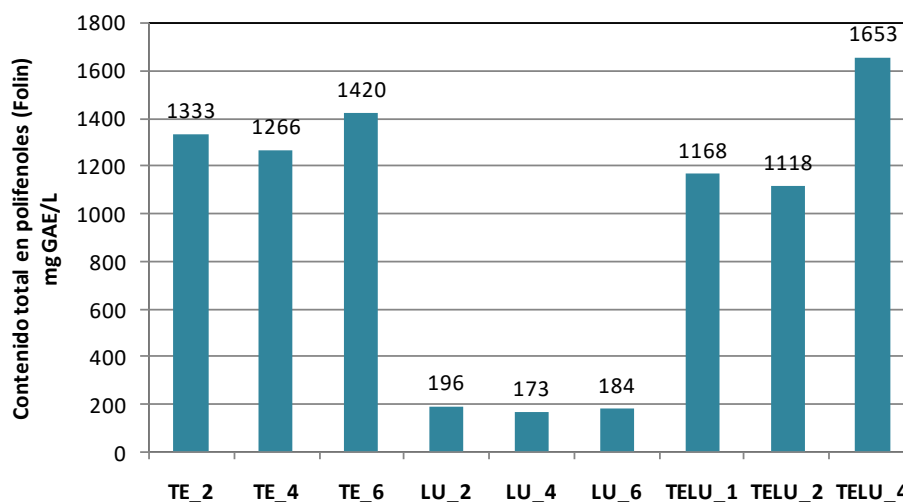


Figura 58. Contenido total en polifenoles de los productos a base de té (TE), lúpulo (LU) y mezclas de té y lúpulo (TELU) preparadas a diferentes tiempos.

La **figura 59** muestra los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante, siendo las muestras a base de lúpulo las menos antioxidantes y las que contienen té las más antioxidantes. La muestra TE_6, preparada durante 6 días con té presenta un valor de ORAC de 28329 $\mu\text{mol TE/L}$, ligeramente superior a la preparada en 2 días.

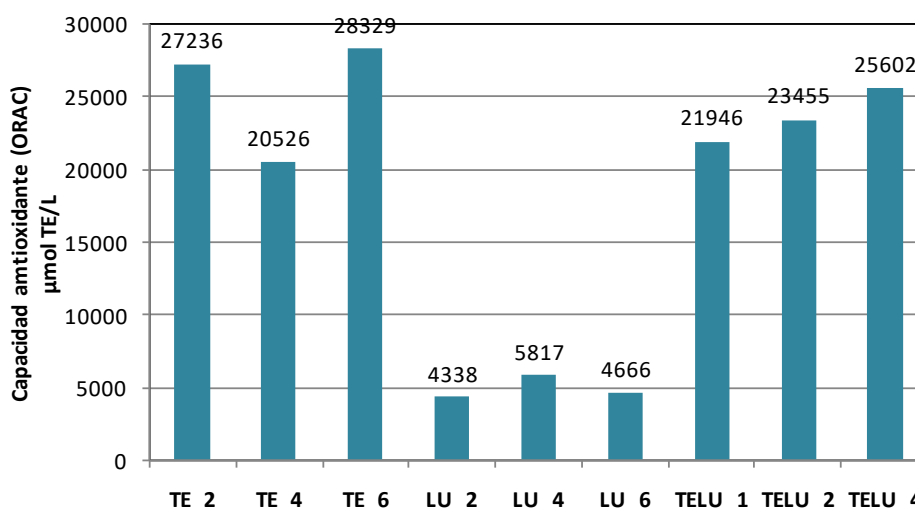


Figura 59. Capacidad antioxidante (ORAC) de los productos a base de té (TE), lúpulo (LU) y mezclas de té y lúpulo (TELU) preparadas a diferentes tiempos.

De acuerdo con el trabajo realizado por AREEIRO se puede concluir que brotes de la planta del té, *C. sinensis*, podrían tener un gran potencial como nutraceutico debido a su elevada concentración de compuestos con capacidad antioxidante como las catequinas, así como por la presencia del aminoácido L-teanina, cuyas propiedades se han asociado con propiedades relajantes y otros beneficios para la salud. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la síntesis de estos compuestos en plantas de campo sufre variaciones estacionales. Debido a ello, el cultivo *in vitro* de células indiferenciadas de *C. sinensis* puede suponer una alternativa para la obtención de biomasa vegetal con potencial nutraceutico ya que esta técnica de cultivo *in vitro* no está sujeta a la variabilidad de las condiciones ambientales. Sin embargo, el cultivo de células desdiferenciadas de té en un minibiorreactor de tanque agitado proporciona un rendimiento bajo de L-teanina, menor que el observado en las hojas de la planta en campo, por lo que sería necesario la realización de más estudios para elicitar la ruta de biosíntesis del aminoácido L-teanina.

REFERENCIAS

- BS ISO 14502-2:2005. (2006). Determination of substances characteristic of green and black tea. (Part 2: content of catechins in green tea Method using high-performance liquid chromatography).
- Cham, H.-H. et al., (2010). Potent α -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* C. A. Meyer var. major. *Phytochemistry*, 71, 1360–1364.
- Collado-González, J. et al., (2017). Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by Spanish extra virgin olive oils: The involvement of bioactive compounds other than oleuropein and hydroxytyrosol. *Food Chemistry*, 235, 298-307.
- COX Fluorescent Inhibitor Screening Assay Kit. Item No. 700100. Cayman Chemical.
- Folin, O., Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 73, 627-650.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer E.K. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J Agric Food Chem.*, 50, 1818-1821.
- Iglesias, I., Graell, J., Echeverría, G., Vendrell, M. (1999). Differences in fruit color development, anthocyanin content, yield and quality of seven “Delicious” apple strains. *Fruit Varieties Journal*, 53(1), 133-145.

- Matsui, T. et al., (1996). In Vitro Survey of α -Glucosidase Inhibitory Food Components. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60 (12), 2019-2022.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3273-3279.
- Ruiz, A., Hermosín-Gutierrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., von Baer, D. (2010). Polyphenols and antioxidant activity of Calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 6081-6089.
- Singleton, V.L., Rossi, S. A. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *J. Enol Vitic* 16:144–15.
- Vinholes, J. et al., (2011). In vitro studies to assess the antidiabetic, anticholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. *Food Chemistry*, 129, 454-462.
- Zhang, G. H., Liang, Y. R., Jin, J., Lu, J. L., Borthakur, D., Dong, J. J., & Zheng, X. Q. (2007). Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* in relation to L-theanine production in *Camellia sinensis*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(4), 636-640.