

# “Implementación de procesos inteligentes de producción de complementos nutricionales”

**Acrónimo: NUTRIGEN 4.0**



UNIÓN EUROPEA

FONDO EUROPEO DE  
DESENVOLVEMENTO  
REXIONAL  
"Unha maneira de facer Europa"



AXENCIA  
GALEGA DE  
INNOVACIÓN



Nº Expediente: IN854A 2020/05

Fecha Inicio: 01/10/2020

Fecha Fin: 30/04/2023

Presupuesto: 2.017.014,76 €

Financiación (75%): 1.512.761,07 €

Proyecto englobado dentro del **Programa Industrias del Futuro 4.0 - Fábrica Inteligente y Sostenible de la Industria 4.0** de la **Axencia Gallega de Innovación (GAIN)** de la **Consellería de Economía, Empleo e Industria**, cofinanciado por el **Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)**, y con el apoyo de la **Vicepresidencia Primera y Consellería de Economía, empresa e Innovación**.

## Objetivo

**ANFACO-CECOPESCA** colabora con **Hifas da Terra** para llevar a cabo la implementación de procesos inteligentes de producción de complementos nutricionales en base al análisis de nuevas rutas biosintéticas en genomas de cepas de hongos comestibles de Galicia.

**Resultados** más destacables obtenidos durante el proyecto:

### Actividad 1. Ingeniería avanzada de procesos.

Durante el proyecto se han recogido imágenes NIR e hiperespectrales de 154 muestras de micelio de la cepa *Ganoderma lucidum* propiedad de Hifas da Terra crecido sobre cereal de diferentes lotes de producción. Los datos obtenidos a partir de las cámaras hiperespectrales Specim FX10 y Specim FX17 y del equipo NIR FOSS XDS se han procesado con las herramientas de modelado quimiométrico MATLAB y UNSCRAMBLER X. Paralelamente, ANFACO-CECOPESCA ha determinado el contenido en ergosterol y ergotioneina en estas mismas muestras mediante HPLC. A partir de los datos disponibles, se busca hallar los modelos que correlacionan la información espectral con los parámetros de referencia.

ANFACO ha desarrollado una aplicación para la captura de muestras con cámara FX17 y un carrito de presentación de las muestras para predicción de la cantidad de ergosterol. Esta

aplicación podría adaptarse de manera sencilla para la detección de otros compuestos en el futuro.

Para el presente caso de estudio, **la tecnología NIR ofrece mejores resultados para la predicción del contenido en ergosterol**. En el caso de los datos adquiridos con las cámaras HSI, no se han conseguido modelos predictivos fiables; **pero sí, la distinción entre diferentes lotes productivos**.

### **Actividad 2 Smart biofactory.**

El objetivo de esta actividad es la creación de una plataforma de adquisición, procesamiento y visualización de datos en relación con el proceso. Dichos datos permiten la toma de decisiones de manera automatizada y la generación de alarmas.

Durante el proyecto, desde ANFACO-CECOPESCA se ha desarrollado una plataforma de trazabilidad HMI y el testeado de la misma. Además, tras la instalación de los sensores en las instalaciones de Hifas da Terra, se están recogiendo dichos datos en la BBDD. Estos datos se pueden consultar de manera local en el panel PC a través de un dashboard generado en Grafana, y a través de internet por medio de la plataforma de trazabilidad.

ANFACO y la entidad subcontratada MUUTECH han colaborado para lograr la integración del sistema de datos de ANFACO dentro de la plataforma MINERVA de MUUTECH. Actualmente la herramienta es empleada por el personal de Hifas para controlar el correcto desempeño de su proceso productivo.

En concreto, se han llegado a los siguientes resultados en esta actividad:

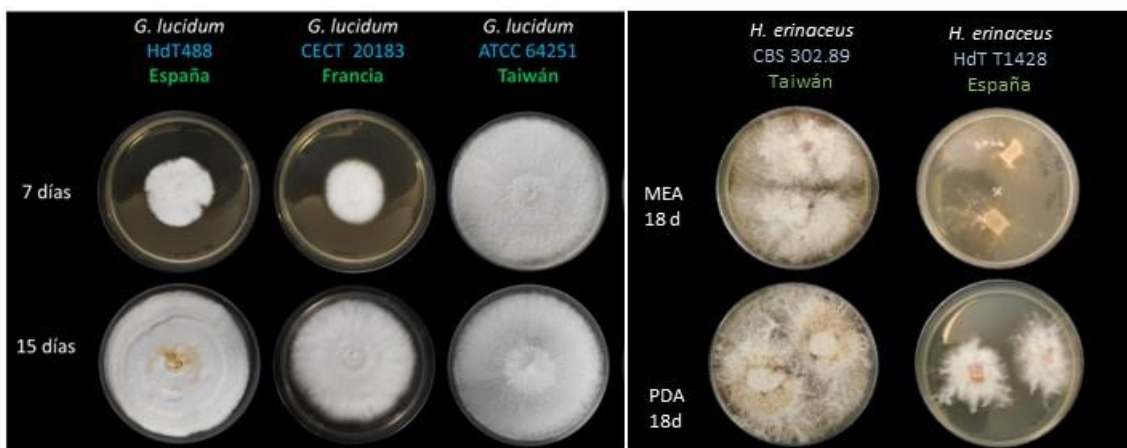
1. Para tener un seguimiento de las condiciones del cultivo, se ha implementado un sistema de trazabilidad apoyado en etiquetas con un código QR para identificar los diferentes productos.
2. Todos los datos, tanto los que registran los sensores, como los que proceden de la trazabilidad, se recogen en una BBDD local, pero también se pueden consultar en remoto a través de una plataforma de monitorización en la nube.
3. Se han analizado los datos recogidos lo que ha permitido detectar malfuncionamientos y detectar posibles mejoras del proceso productivo y del sistema de monitorización. Para extraer otras conclusiones significativas sobre el proceso de cultivo se requieren un mayor número de producciones.
4. Se ha implantado una solución de **Realidad Aumentada** que ayuda al operario a trabajar con el Biorreactor que se emplea para el cultivo de micelio líquido.



Solución de Realidad Aumentada que ayuda al operario a trabajar con el Biorreactor que se emplea para el cultivo de micelio líquido

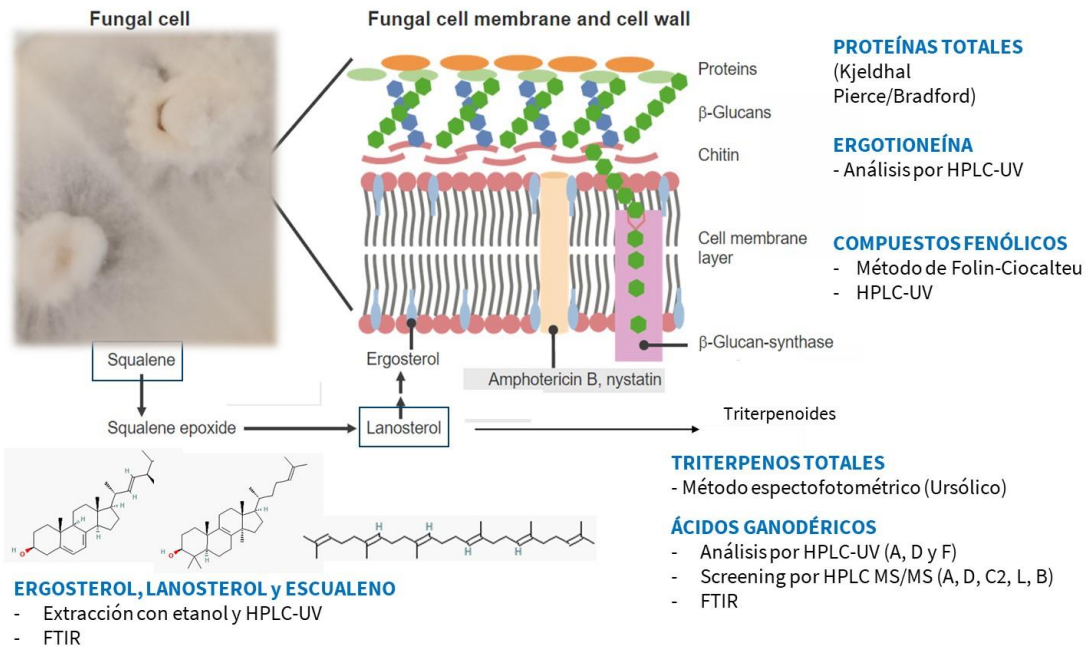
### Actividad 3. Integración de herramientas 4.0 y tecnologías ómicas para el estudio de nuevas rutas metabólicas durante el proceso de cultivo de hongos.

Durante el proyecto ANFACO ha generado de forma continua micelio de 5 cepas (3 *Ganoderma* y 2 *Hericium*) tanto en estado sólido como líquido para realizar ensayos de funcionalidad.



Crecimiento de *G. lucidum*, la cepa propiedad de Hifas y las de referencia crecidas en Malt agar a 25°C (izquierda) y crecimiento a los 18 días de *H. erinaceus*, la cepa propiedad de Hifas y la de referencia crecidas en Malt agar y potato dextrose agar a 25°C (derecha).

A continuación se resumen todos los compuestos bioactivos y metodologías que se han estudiado en el proyecto NUTRIGEN sobre micelio.



Compuestos bioactivos estudiados en micelio.

En la siguiente figura se resumen las funcionalidades estudiadas en el marco del proyecto NUTRIGEN en ambas cepas, *Ganoderma lucidum* y *Hericium erinaceus*, aunque el estudio ha sido más profundo con la cepa de *Ganoderma*.

### *Ganoderma lucidum*

- Cepa ATCC 64251 (origen: Taiwán)
- Cepa CECT 20183 (origen: Francia)
- Cepa Hifas da Terra T488



### *Hericium erinaceus*

- Cepa Hifas da Terra T1428



**Anti-inflamatoria** (Macrófagos murinos **Raw 264.7**)

**Inmunomoduladora** (Macrófagos murinos **Raw 264.7**)

Modular liberación factores de inflamación (IL-6, TNF-α, nitritos)

Efecto sobre la fagocitosis

**Antimicrobiana** (*Listeria*, *E. coli*, *Shigella*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Clostridium*)

**Citotóxica** (Líneas de cancer de mama y útero **HTB-26 y CCL-2**)

**Antioxidante**

Métodos bioquímicos (DPPH, TEAC, ORAC, FRAP, TPC)

Actividad antioxidante celular (carcinoma hepatocelular **HepG2**)

**Antiosteoporótica**

Línea celular precursora de osteoblastos (**MC3-T3**)

Funcionalidades estudiadas por ANFACO en las cepas fúngicas.

En el caso de *G. lucidum* empleando como referencia la secuencia del genoma completo de la cepa Lingjian-2 se seleccionaron genes identificados previamente en la ruta de la biosíntesis de los terpenoides. Las secuencias de estos genes sirvieron como base para elaborar varios sistemas de qPCR y se ha cuantificado su expresión a través de la técnica de la PCR cuantitativa (qPCR). Además de estos diseños, se tomaron múltiples sistemas de qPCR de la bibliografía, para poder realizar una estimación precisa de los niveles de expresión de distintos genes implicados en la ruta de los terpenos. También se han tomado genes normalizadores de la bibliografía, sumando en total por encima de los 40 genes. El cálculo de la expresión relativa de estos genes se realizó por el método del  $\Delta\Delta C_t$ , utilizando el software qBase+.

Una vez seleccionados los sistemas de PCR para evaluar la expresión relativa de los genes relacionados con la síntesis de terpenos, se evaluó el funcionamiento de estos sistemas en las tres cepas (la de Hifas da Terra; la de Francia, CECT; y la de Taiwán, ATCC). **De los 41 sistemas de qPCR evaluados, solo 14 funcionan correctamente en la cepa de Hifas da Terra**, mientras que la cepa de la CECT (con origen en Francia) funcionan correctamente 18 sistemas, y con la cepa de la ATCC (con origen en Taiwan) funcionan bien 27. Este comportamiento diferencial de los sistemas de qPCR en las 3 cepas podría explicarse por la divergencia existente entre éstas, debido a su origen geográfico. Los sistemas utilizados, tanto los diseñados en el presente proyecto como los tomados de la bibliografía, han sido realizados a partir de genomas/secuencias obtenidas de cepas con origen asiático, por ello funcionan mejor con estas cepas.

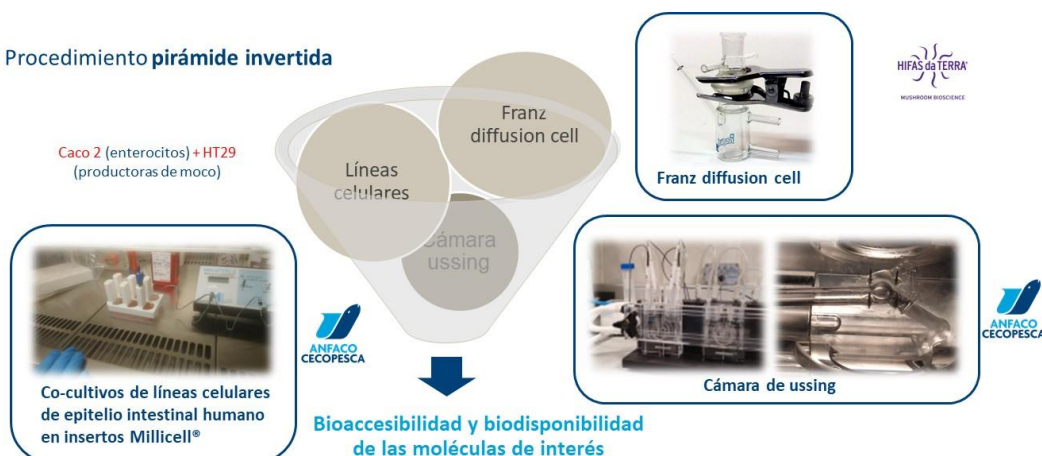
Como resumen, se han definido una serie de cebadores por parte de ANFACO-CECOPESCA para la realización del análisis transcriptómico de genes de síntesis de de triterpenos en el genoma de la cepa *Ganoderma lucidum* HdT 488 y se han visto diferencias en la expresión de los genes en función de las condiciones de cultivo empleadas.

#### **Actividad 4. Validación de modelos desarrollados**

Durante el proyecto se han realizado diferentes ensayos para medir la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de las muestras: i) screening realizado por HIFAS mediante equipamiento *Franz Diffusion Cell*. ANFACO ha prestado apoyo a HIFAS para medir compuestos bioactivos mediante HPLC. ii) Paralelamente ANFACO ha realizado un screening *in vitro* en cultivos de líneas celulares de epitelio intestinal humano en insertos millicell. iii) Por último, análisis *ex vivo* en tejido de roedor mediante cámara de ussing en aquellas muestras que presentaron resultados prometedores.



### Procedimiento pirámide invertida



## Principales conclusiones

- ❑ Los nuevos procesos productivos de HIFAS están monitorizados en todas sus salas con la integración de sensorica de control que ha sido instalada y cuyos datos son registrados por parte de ANFACO.
- ❑ ANFACO ha desarrollado una aplicación para la captura de muestras con cámara FX17 y **predicción de la cantidad de ergosterol**. Esta aplicación podría adaptarse de manera sencilla para la detección de otros compuestos en el futuro ya que con ergosterol los resultados obtenidos no han sido óptimos, debido a las bajas concentraciones de este metabolito en la muestra.
- ❑ ANFACO ha realizado las primeras pruebas con célula NIR para generar espectros a partir de micelio líquido de cara a la posible **monitorización de parámetros de interés en el biorreactor** en el futuro.
- ❑ En el caso de los datos adquiridos con las cámaras HSI, no se han conseguido modelos predictivos fiables; pero sí, la **distinción entre diferentes lotes productivos**.
- ❑ Se han definido una serie de **cebadores** por parte de ANFACO-CECOPESCA **para la realización del análisis transcriptómico de genes de síntesis de triterpenos** en el genoma de la cepa *Ganoderma lucidum* HdT 488 y se han visto diferencias en la expresión de los genes en función de las condiciones de cultivo empleadas.
- ❑ Se ha puesto en evidencia la presencia de diferentes compuestos bioactivos en el micelio de *Ganoderma lucidum* y *Hericium erinaceus* y se ha demostrado su funcionalidad (actividad antioxidante, antimicrobiana, inmunomoduladora...) *in vitro*.
- ❑ **El perfil cromatográfico de la cepa de HdT T488 se podría aplicar como metodología de huella dactilar cromatográfica**, ya que sin necesidad de identificar ni cuantificar los analitos (actualmente desconocidos) contiene información de

interés muy útil puesto que podría emplearse como evaluación de calidad o como determinación del origen geográfico, entre otras.

- ❑ A su vez, los dos compuestos más abundantes particulares de la cepa de HdT podrían considerarse **biomarcadores específicos**, ya que solamente se observan en la cepa de HdT y no en las cepas de colección.

|   |   |  |
|---|---|--|
|  XUNTA<br>DE GALICIA   | <br>UNIÓN EUROPEA |  Xacobeo 21-22          |
|    | <b>Programa Fábrica do futuro, fábrica intelixente e<br/>sostible da industria 4.0</b>              | <br>MUSHROOM BIOSCIENCE |
| <b>NUTRIGEN 4.0:</b><br>Implementación de Procesos Intelixentes de produción de complementos nutricionais en base ó análise de novas rutas biosintéticas en xenomas de dúas cepas de fungos<br>comestibles de Galicia |   |  |
| <b>Promover o desenvolvemento tecnolóxico, a innovación e unha investigación de<br/>calidade</b>  |   |  |
| <b>Operación cofinanciada pola Unión Europea, a través do<br/>FONDO EUROPEO DE DESENVOLVEMENTO REXIONAL (FEDER)</b>   |   |  |
| PROGRAMA OPERATIVO<br><b>FEDER GALICIA</b><br>2014-2020   |   | <i>Unha maneira de facer Europa</i>  |