

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de cuantificación de carotenoides (Bunea *et al.*, 2008)

En la extracción de los carotenoides se trabajó con 1 g de las muestras de polvo seco y liofilizado y se añadieron 25 mL del disolvente de extracción, en este caso constituido por la mezcla CH₃OH /acetato de etilo/éter de petróleo (1:1:1 v/v/v). La mezcla se homogenizó en un ultraturrax a 10000 rpm durante 10 minutos a 10 °C y se repitió el proceso las veces necesarias hasta obtener un sobrenadante incoloro. Seguidamente, se separó el sobrenadante, se recogió en un embudo de decantación y se lavó un par de veces con 100 mL de disolución salina saturada (36 g NaCl en 100 g de agua) hasta la separación completa de las fases acuosa y etérea. Se añadieron 50 mL de dietil éter para lavar el embudo. Seguidamente, se trasladó la fase etérea, que es la que contiene los carotenoides, a un embudo de decantación tapado con algodón y que contenía una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄). A continuación, se evaporó a 35 °C en condiciones de vacío en un rotavapor, obteniendo un extracto seco al final del proceso.

El proceso de saponificación se llevó a cabo para eliminar los lípidos, clorofilas y ésteres no deseados presentes en la muestra, ya que pueden interferir en la columna cromatográfica y reducir la vida útil de la misma.

Para ello se añadió éter dietílico al extracto seco y se dejó 16 horas en ausencia de luz, a temperatura ambiente y añadiendo una solución al 30% de KOH metanólico. A continuación, se lavó el extracto saponificado alternando una solución salina saturada y agua destilada, con volúmenes de unos 70 mL, hasta que las fases acuosa y etérea quedaron separadas y el pH se neutralizó. La fase etérea se secó sobre sulfato de sodio anhidro y posteriormente fue evaporada en un rotavapor (T<30 °C).

Finalmente, se realiza la identificación y cuantificación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (Waters TM) acoplada a un detector de fotodiodos modelo 2998 (HPLC-PDA) y equipada con una bomba 600E.

La separación cromatográfica de los compuestos se realizó con una precolumna C30 (20 mm x 4.0 mm x 5 m) y una columna C30 (250 mm x 4.6 mm x 5 m) (YMC Europa GMBH).

La elución se llevó a cabo a temperatura ambiente con una fase móvil que consistía en mezclas de acetonitrilo: agua (9:1, v / v) con trietilamina (C₆H₁₅N) al 0,25% (disolvente A) y acetato de etilo (C₄H₈O₂) con 0,25% trietilamina (disolvente B). Este sistema de elución de gradiente empezó con un 90% de A a tiempo 0, y se fue reduciendo con el tiempo, alcanzando un porcentaje del 50% a los 10 minutos, y del 10% a los 20 minutos. Se empleó un caudal de 1 mL/min y se monitorizaron los cromatogramas a 450 nm. Los carotenoides identificados fueron β- caroteno, α- caroteno y la β- criptoxantina. La determinación se realizó por triplicado.

Anexo 2. Protocolo de cuantificación de antocianinas (Cătunescu *et al.*, 2019)

Para la extracción de antocianinas se partió de 0,1 g de muestra seca que se mezclaron con 10 mL de CH₃OH (1% HCl) y se dejó reposar toda la noche en la nevera. Posteriormente se sometió a ultra-sonidos durante 30 segundos y se centrifugó a 5000 rpm, a 4 °C, durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y seguidamente se mezclaron 5 mL de CH₃OH (+1% HCl)

con el pellet y se agitó en un vórtex durante 1 minuto. Esta etapa se repitió las veces necesarias hasta que el solvente se volvió incoloro. A continuación se filtra a través del algodón y este se lava. Se recogió todo el extracto y se evaporó a 35 °C.

La cuantificación e identificación de antocianinas se realiza por cromatografía líquida de alta resolución (Waters TM) acoplada a un detector de fotodiodos modelo 2998 (HPLC-PDA) y equipada con una bomba 600E.

La separación cromatográfica de los compuestos se realizó con una columna RPC 18 (DAD). Las antocianinas identificadas fueron la cianidina, delphinidina y malvidina. La determinación se realizó por triplicado.

Anexo 3. Concentración de DNA de las bacterias intestinales

Tabla 1. Concentración (ng/μl) del DNA de las bacterias intestinales, medido antes y después de la fermentación de las cuatro muestras de polvo digeridas.

Individuos	Tiempo 0	Arándano LIO	Arándano SAC	Caqui LIO	Caqui SAC
A	1,83	0,977	3,85	4,22	2,14
B	1,56	2,76	1,75	6,44	5,62
C	2,01	2,83	3,25	3,35	5,57
D	1,49	0,809	1,03	3,73	3,03
E	0,837	0,972	6,15	9,51	7,99
F	2,09	1,05	1,08	4,1	4,16
G	4,64	1,49	2,17	4,49	8,59
H	2,38	5,34	6,67	4,5	3,4

Anexo 4. Gel electroforesis de las muestras de DNA tras la fermentación intestinal *in vitro*

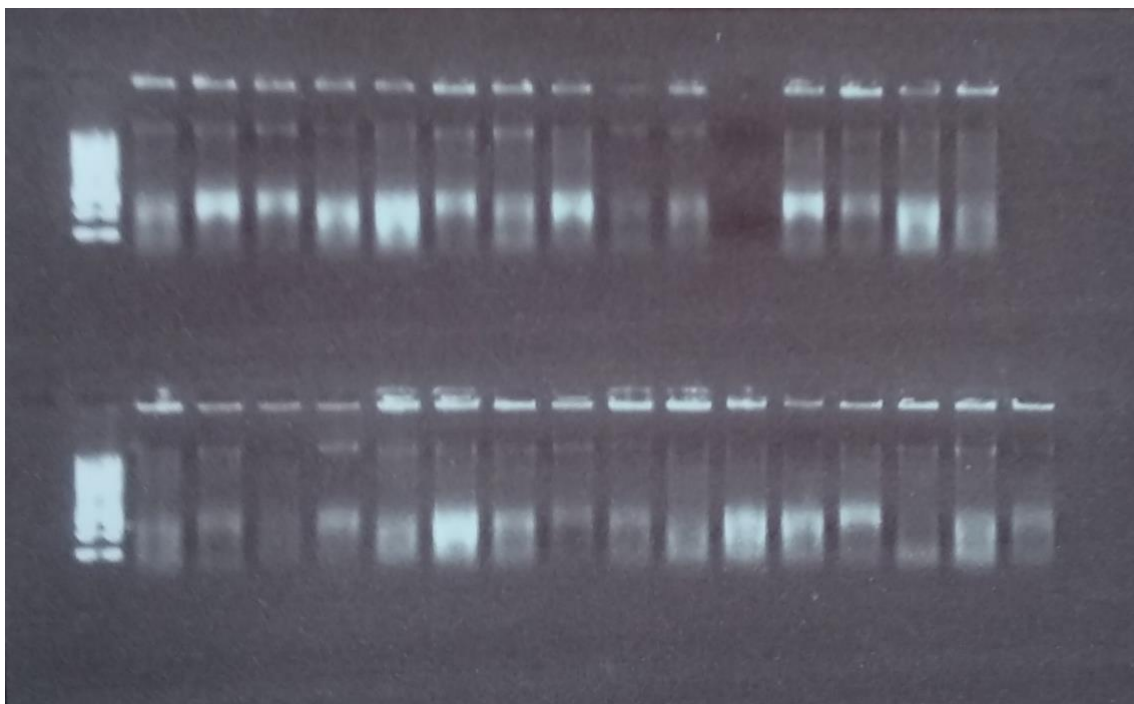


Imagen 1. Gel electroforesis de las muestras de DNA tras la fermentación del polvo de caqui LIO, el polvo de caqui SAC, y sus respectivos controles de inulina.

Anexo 5. Composición a nivel de género bacteriano del sustrato sin fermentar, el sustrato fermentado y el control positivo fermentado

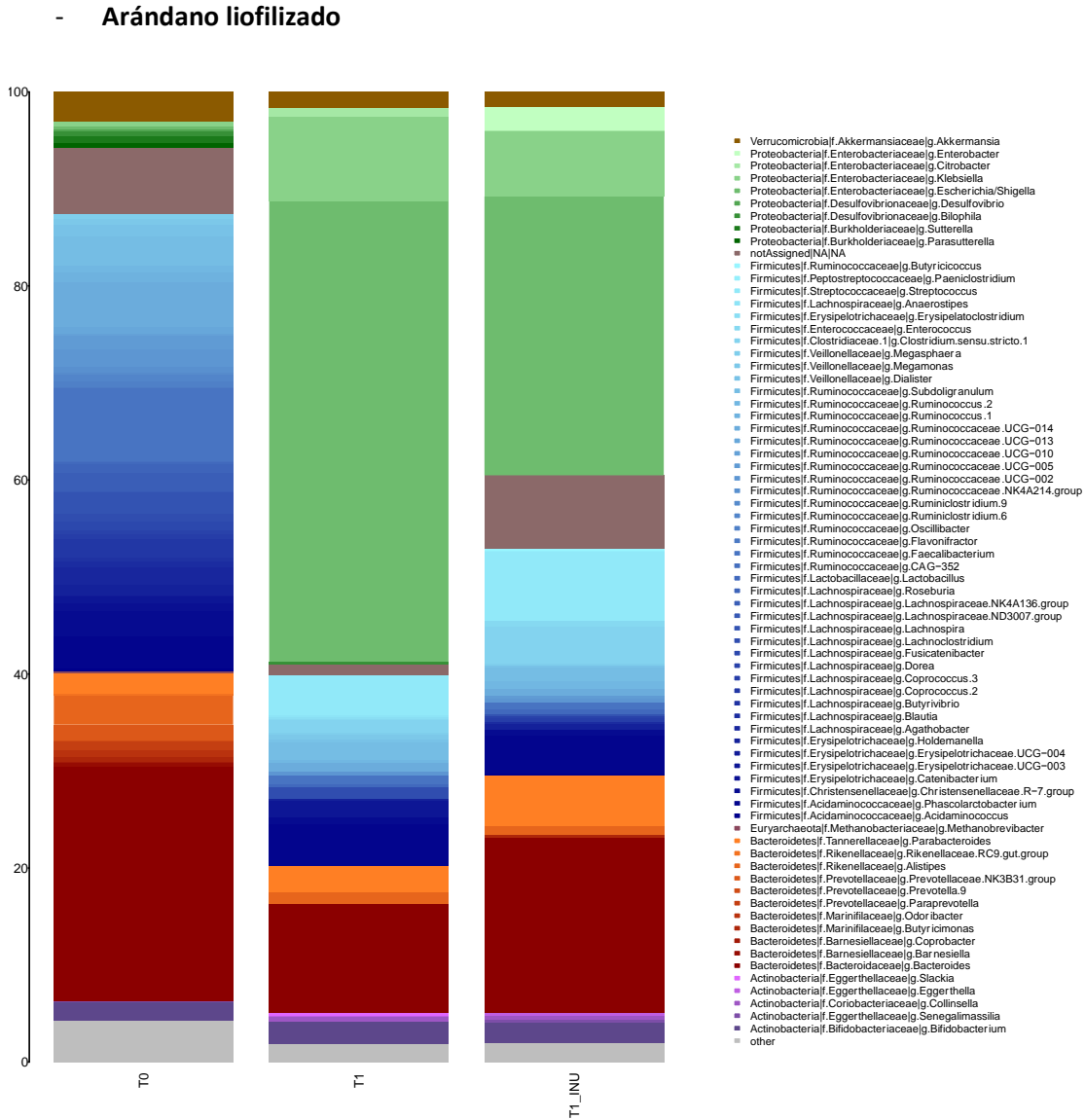


Figura 2. Composición a nivel de género bacteriano del polvo de arándano liofilizado sin fermentar, fermentado y el control positivo de inulina fermentada.

- Arándano seco por aire caliente

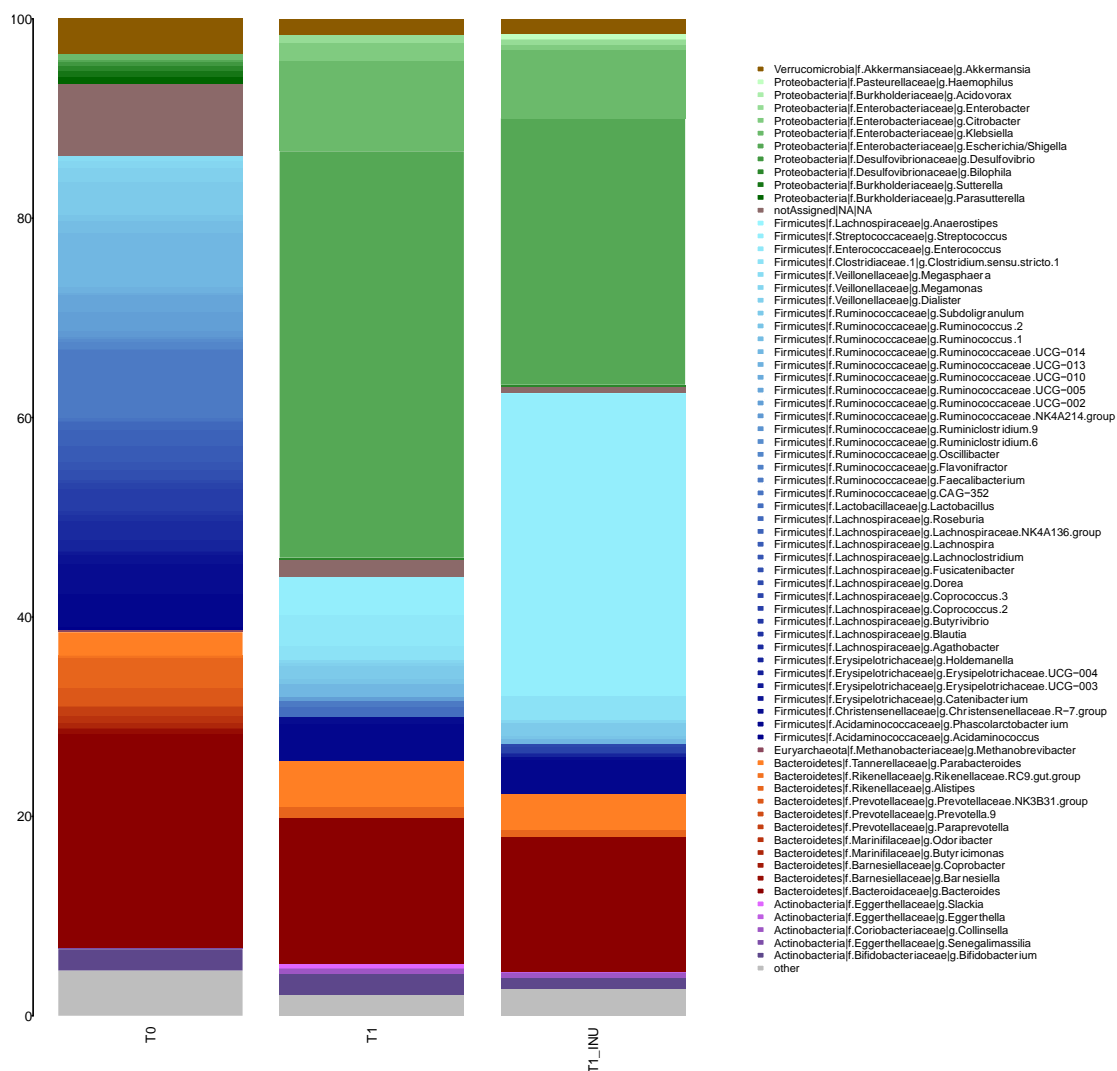


Figura 3. Composición a nivel de género bacteriano del polvo de arándano seco por aire caliente sin fermentar, fermentado y el control positivo de inulina fermentado.

- Caqui liofilizado

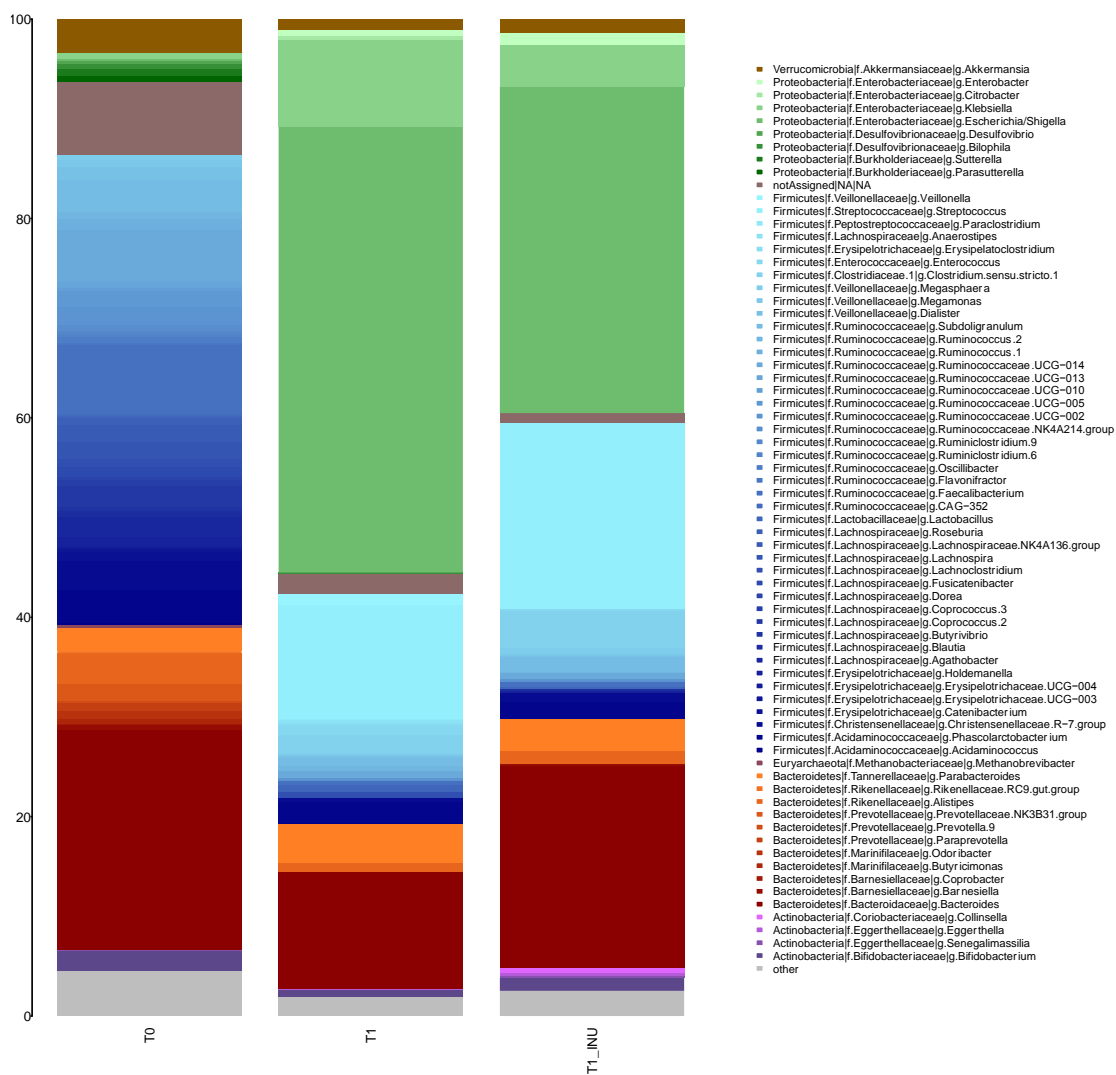


Figura 4. Composición a nivel de género bacteriano del polvo de caqui liofilizado sin fermentar, fermentado y el control positivo de inulina fermentado.

- Caqui secado por aire caliente

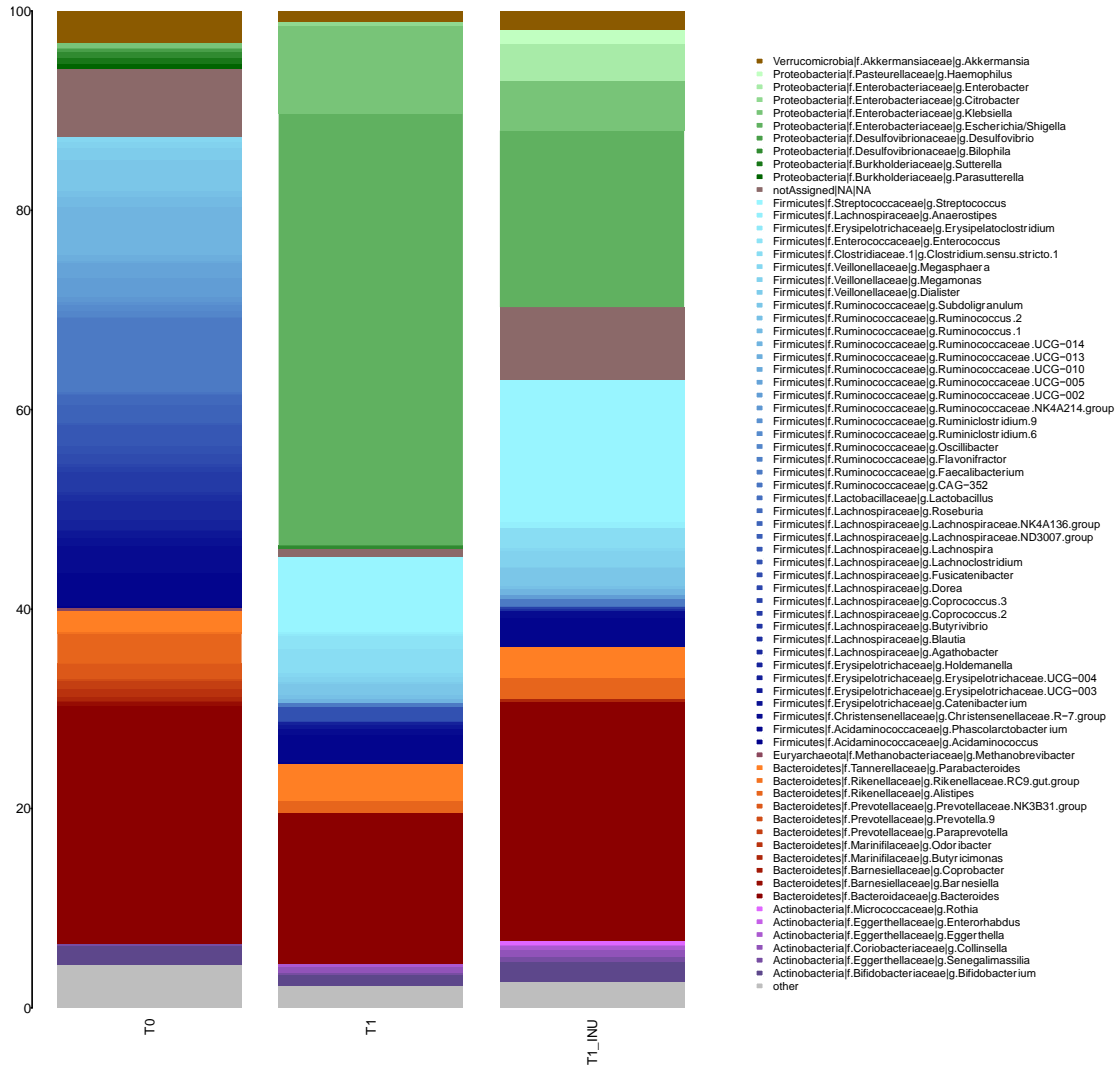


Figura 5. Composición a nivel de género bacteriano del polvo de caqui secado por aire caliente sin fermentar, fermentado y el control positivo de inulina fermentado.