

Biotecnología

La biotecnología según definición del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) es “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos”. A la luz de esta definición, se puede deducir que la biotecnología, en su sentido más amplio, **viene acompañando el desarrollo agroalimentario de la humanidad ya desde el Neolítico, en procesos tan cotidianos como la elaboración de queso, yogurt, vino, cerveza, o en la panificación.** En todos estos procesos, la utilización de bacterias y levaduras vivas tiene como fin la obtención de un producto totalmente distinto del original mediante procesos biológicos.

Javier Butrón, Javier I. Jáuregui
Centro Nacional de Tecnología y Seguridad
Alimentaria (CNTA)-Laboratorio del Ebro

La biotecnología en la industria agroalimentaria

Este concepto de “biotecnología” se ha ido manteniendo relativamente estable durante milenios evolucionando hacia la mejora de todos estos procesos de una manera paulatina. Sin embargo, a partir del siglo XX, la revolución en el conocimiento biológico de los mecanismos bioquímicos, enzimáticos, microbiológicos o genéticos, así como los avances en las tecnologías del DNA ha dado origen a una gran aceleración en el campo de la biotecnología agroalimentaria y su aplicación a la producción o transformación de alimentos.

Algunas de las aplicaciones, o campos de trabajo, que han ido surgiendo se concretan a continuación.

Mejora y control de procesos agroalimentarios:

Un ejemplo de productos que tradicionalmente ha utilizado sistemas biológicos en su producción son los derivados de fermentaciones. De ellos, los más extendidos por el planeta a lo largo de la historia son los productos de fermentación alcohólica como el vino, la cerveza y los distintos licores, los productos de panificación, los productos cárnicos curados y los derivados lácteos procedentes de la fermentación. La mayoría de ellos surgían de procesos espontáneos desencadenados por la presencia de microorganismos en las materias primas, las superficies de elaboración, el ambiente de la zona, etc... Ello ha dado lugar de forma involuntaria a las múltiples variedades y riquezas de cada uno de estos productos (los diferentes vinos, quesos, embutidos y toda la diversidad de matices en el sabor, cuerpo, textura, etc... dependiendo de su ori-

gen y elaboración), pero también tenía la contrapartida de efectos no deseados cuando los microorganismos existentes en el inicio desviaban el proceso de fermentación a otras rutas diferentes de las deseadas.

Desde finales del siglo XIX, los avances en el conocimiento biotecnológico de procesos como el de la vinificación demostraron la importancia de algunas especies de microorganismos como las levaduras en la fermentación alcohólica, entre las que destaca de forma estelar *Saccharomyces cerevisiae* (también implicada en la panificación y la elaboración de cervezas y otras bebidas espirituosas), o de diferentes bacterias lácticas en la subsiguiente fermentación maloláctica, así como el efecto alterante de otros como las bacterias acéticas (que daban origen a los “vinagres”) y algunos tipos de mohos. Lo que hasta ese momento podía realizarse siguiendo los métodos aprendidos mediante la herencia tecnológica, ahora podía ser dirigido de forma más específica. Aparecen los cultivos iniciadores o “starters” que permiten iniciar y/o controlar los procesos fermentativos. Después de una selección de cepas fermentadoras, de entre las existentes en la población autóctona, se pueden elegir aquellas que ofrecen las características más deseables en el producto, bien sea un queso, un vino o un cárnico, y utilizarlas para obtener un producto final de calidad.

La importancia que tiene no ya la especie, sino las diferentes variedades y cepas de microorganismos, hace de las técnicas de biología molecular una herramienta importante en el desarrollo de estos procesos. Así pues, a técnicas de mejora y selección de cepas como

pueden ser la selección clonal, la inducción y selección de mutantes, la hibridación de cepas, transformación o fusión de proplastos, e incluso las técnicas de DNA recombinante, se unen técnicas de identificación molecular basadas en polimorfismos, que permiten diferenciar distintas cepas incluso con características fisiológicas similares. A la hora de dicha identificación, han sido de utilidad las distintas técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tanto en su variante cualitativa como en tiempo real utilizadas sobre genes específicos o incluso en SNPs (single nucleotide polymorphism). Éstas se han aplicado en solitario o en conjunción con electroforesis diferenciales en función de secuencia como pueden ser la electroforesis en geles de gradiente de temperatura o de desnaturalización (TGGE, DGGE) o electroforesis en campo pulsante (PFGE). El estudio de los genes que codifican para los RNAs ribosomales propios de eucariotas o de procariotas, así como los ITS (Internal Transcribed Spacers) localizados entre ellos, o de genes específicos como el MET2 en estudios del género *Saccharomyces*, ha permitido desarrollar herramientas de identificación muy útiles tanto por secuenciación como por restricción enzimática de los amplificadores (RFLP). En enología, ha demostrado ser de especial utilidad a la hora de diferenciar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* el uso del patrón de corte por RFLP del DNA mitocondrial. No hay que olvidar tampoco la secuenciación de regiones diferenciales, el uso de tecnología de DNA microarrays, o el estudio de polimorfismos con variantes de la PCR como los RAPDs (Random amplified polymorphic DNA).

Todas estas técnicas pueden utilizarse, tras estudios en profundidad, para la caracterización y selección de "starters" en alimentos (cárnicos curados, lácteos, vinos, vinagres, alimentos fermentados, etc...), pudiendo llegar a conseguirse la asignación de características organolépticas determinadas a un microorganismo concreto, potenciándose o impidiéndose su uso en un producto concreto. El estudio detallado de las floras existentes en fermentaciones y su evolución en función de las condiciones del proceso permite ver qué floras son las más interesantes a la hora de conseguir las características deseadas, o el posible interés de introducirlas en determinados puntos del proceso. Controlando las condiciones del proceso se puede favorecer, a su vez, el desarrollo de las poblaciones de interés o la inhibición de posibles microorganismos indeseables o incluso patógenos. Por su parte, el estudio detallado de las floras iniciales y del entorno, en la elaboración de "productos tradicionales", puede ayudar a caracterizar los microorganismos del medio o de la materia prima, responsables de parte de las propiedades diferenciadoras del producto característico de una región, así como su relación con unas prácticas características de elaboración. Estos estudios abren las puertas a la posibilidad de identificarlos y usarlos como "starters" para homogeneizar la calidad del producto final.

Control del fraude:

El desarrollo de las técnicas de biología molecular, por su parte, ha permitido obtener una valiosa herramienta a la hora de identificar si las especies presentes en un producto son o no las declaradas. La sustitución de unas especies animales o vegetales por otras de menor valor comercial no sólo es un fraude económico al consumidor sino que incluso puede tener repercusiones de carácter religioso, en cuanto a la calidad final del producto o de presencia de alérgenos inesperados. A la hora de abordar el problema se eligieron dos vías fundamentales: el estudio de la proteína y el del DNA.

La determinación de especies animales mediante proteínas características de cada especie ha utilizado fundamentalmente técnicas como el IEF (Isoelectric Focusing) o los inmunoensayos de tipo ELISA. A este respecto la FDA estadounidense posee, por ejemplo, una enciclopedia de referencia de perfiles IEF con los perfiles de las especies marinas comerciales más relevantes en su mercado y que puede encontrarse en la dirección <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/rfe5prsm>

.html. En cuanto a las técnicas ELISA existen toda una serie de kits comerciales orientados a la identificación de distintas especies. Una de las problemáticas de la utilización de las proteínas es que en el caso de productos procesados las desnaturalizaciones incluso en tratamientos de baja intensidad pueden ser lo suficientemente severas como para no permitir identificaciones adecuadas. También la presencia de proteínas con estructuras parcialmente análogas puede originar reacciones cruzadas que dificulten la identificación.

La otra vía de trabajo es la utilización de técnicas basadas en el DNA. A la hora de la identificación de las especies presentes en un producto las técnicas de detección genéticas han ido de la mano de la taxonomía molecular. Se ha trabajado para ello con genes que presentan zonas muy conservadas y que permitan la mayor variabilidad entre especies pero con la menor variabilidad intraespecífica posible. La presencia de múltiples copias por célula también ha sido un punto a tener en cuenta. De este modo, la mayor parte de los esfuerzos se ha centrado en el DNA mitocondrial para el análisis animal y el de los cloroplastos en el caso de los vegetales. A este respecto, la región más utilizada a la hora de la identificación de especies animales ha sido el gen del citocromo b, si bien en la actualidad proyectos como el Consortium for the Barcode of Life (CBOL) parecen estar consiguiendo una mayor relevancia para el gen de la citocromo c oxidasa I. Otras secuencias de interés han sido las de los genes relacionados con los RNAs ribosomales. En el caso de los vegetales, se ha trabajado principalmente con genes como el de la rubisco (rbcl) o los de RNA transferentes como trnF, trnL, trnT y sus espacios intergénicos. En cuanto al tipo de técnicas utilizadas se pueden destacar por ejemplo el uso de PCR específicas, tanto cualitativas como en tiempo real, para determinadas especies cuando se han buscado restos de un organismo determinado en un producto, como pueda ser restos de material bovino en un pienso, mezclas con cerdo en un producto de vacuno. Otra metodología muy extendida es el uso de la PCR en combinación con enzimas de restricción para generar un perfil de bandas específico (RFLP). En este caso se obtendría una especie de código de barras en función de las especies presentes. La secuenciación de productos de PCR derivados de algunos de los genes antes mencionados y su comparación con las secuencias existentes en bases de datos, también sería una vía de trabajo. Una metodología más sofisticada sería el uso de FINS (Forensically Informative Nucleo-

tide Sequencing) que combina la secuenciación de fragmentos informativos con un estudio filogenético mediante algoritmos de las secuencias comparándolas con las existentes en bases de datos específicas. Existen en este campo también Arrays comercializados con sondas de DNA que permiten, con el equipo adecuado, el rastreo y detección de un gran número de especies en una muestra.

Organismos genéticamente modificados:

Una de las más controvertidas aplicaciones agroalimentarias de la biotecnología, no solo a nivel social sino incluso dentro de la propia comunidad científica, es el desarrollo de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) como los organismos transgénicos. En Europa, su uso viene regulado principalmente por los Reglamentos 1829/2003, 1830/2003 y 65/2004, así como los subsiguientes reglamentos y recomendaciones que los complementan. En este momento, existen más de 120 variedades de plantas genéticamente modificadas reguladas por diferentes gobiernos para su uso comercial con uso textil, ornamental, o en alimentación humana o animal (<http://www.agbios.com>). La Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo define OGM como el organismo, con excepción de los seres humanos, cuyo material genético haya sido modificado de una manera que no se produce naturalmente en el apareamiento ni en la recombinación natural. Según esta definición, se produce una modificación genética siempre que se utilicen, al menos:

- 1) técnicas de recombinación del ácido nucleico, que incluyan la formación de combinaciones nuevas de material genético mediante la inserción de moléculas de ácido nucleico -obtenidas por cualquier medio fuera de un organismo- en un virus, plásmido bacteriano u otro sistema de vector y su incorporación a un organismo hospedador en el que no se encuentren de forma natural pero puedan seguir reproduciéndose.
- 2) técnicas que suponen la incorporación directa en un organismo de material hereditario preparado fuera del organismo, incluidas la microinyección, la macroinyección y la microencapsulación.
- 3) técnicas de fusión de células (incluida la fusión de protoplasto) o de hibridación en las que se formen células vivas con combinaciones nuevas de material genético hereditario mediante la fusión de dos o más células utilizando métodos que no se producen naturalmente.

Biotecnología

Por el contrario, se considera que las técnicas de fertilización *in vitro*, conjugación, transducción, transformación o cualquier otro proceso natural, o el uso de inducción poliploide, no dan lugar a una modificación genética.

Las características introducidas, más comunes, en los organismos con uso regulado hasta el momento, son las resistencias a insectos, virus o herbicidas, ralentización en la maduración para alargar la vida útil del producto, cambios de color en flores ornamentales o cambios en la composición de algún nutriente, como puede ser el aumento de la presencia de lisina en determinadas variedades de maíz. Muchos de los desarrollos se basan en mejoras de la producción del cultivo evitando plagas o mejorando la optimización de los recursos, pero también se están buscando además introducción de genes para nuevas aplicaciones alimentarias, farmacéuticas o energéticas. De hecho una de las grandes líneas de desarrollo en la actualidad es la búsqueda de variedades con alto valor añadido a la hora de proporcionar materia prima para la obtención de biocombustibles.

Los alimentos funcionales:

En los países industrializados, otra de las aplicaciones en alza de la biotecnología es colaborar en la producción de parte de los llamados alimentos funcionales. Una vez se han superado las necesidades nutricionales básicas de la población de estos países, lo que por desgracia no es aplicable a la mayoría de la humanidad, se ha puesto de manifiesto la importancia de una dieta sana y un estilo de vida saludable. Los alimentos funcionales surgen, por un lado, como un intento de sobrevalorar los alimentos consumidos. En este sentido, se busca obtener con ellos propiedades beneficiosas, más allá de los beneficios nutricionales intrínsecos del alimento, sobre funciones específicas del organismo, mejorando el estado de salud o disminuyendo el riesgo a padecer determinadas enfermedades. Por otro lado, los nuevos hábitos alimentarios de la población de los países occidentales hacen que pese a la disponibilidad de todos los tipos de alimentos, existan una serie de carencias y excesos generalizados en el consumo de determinados nutrientes. Los alimentos funcionales podrían ejercer en este caso un efecto amortiguador, si bien nunca podrían compensar la ausencia de una dieta equilibrada.

Uno de los campos en los que la biotecnología se aplica a la hora de crear estos alimentos funcionales es el de los probióticos. En la actualidad parece ser una de las más prome-

tedoras líneas de aplicación de los organismos vivos en la industria agroalimentaria. Se consideran probióticos los microorganismos vivos que al ser ingeridos proporcionan un beneficio relacionado con el estado de salud más allá del meramente nutricional. Este concepto surgió primeramente al observarse una serie de beneficios en aquellas dietas que incorporaban ciertos tipos de leches fermentadas. Es por ello que gran parte de los desarrollos en este campo se han enmarcado dentro de la industria de los productos lácteos, si bien en la actualidad están apareciendo otros sustratos fermentativos muy prometedores. En este sentido los microorganismos más utilizados han sido las bacterias lácticas, destacando los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*. A algunas especies de bacterias lácticas y más concretamente determinadas cepas de las mismas, se les atribuyen una serie de beneficios para la salud humana, siempre y cuando alcancen en número suficiente, y mediante un aporte continuado las regiones del sistema digestivo donde ejercen su función. Para favorecer la actuación de estos microorganismos con efectos beneficiosos para la salud, y estimular el de algunos otros autóctonos de la flora intestinal, surge otro concepto denominado "prebiótico", y que engloba a aquellas moléculas, generalmente sustratos fermentativos, que favorecen el crecimiento selectivo de los probióticos y otros microorganismos de interés en el sistema digestivo del consumidor.

La aparición y desarrollo de estos conceptos ha sido posible gracias a todos los estudios realizados sobre la ecología de la flora intestinal, las interacciones de las distintas cepas bacterianas entre ellas, con el hospedador, y con los sustratos. En estos estudios ha sido de gran importancia la existencia de herramientas biotecnológicas tanto procedentes de la microbiología clásica como de la biología molecular. La forma de trabajar en estos casos sería similar a la comentada en la mejora de procesos fermentativos. Así, tanto a la hora de identificar cepas ya conocidas como de tipificar otras nuevas como potenciales probióticos, la posibilidad de secuenciar distintos genes identificadores como los relativos al RNA ribosomal e incluso genomas enteros de las cepas de interés es una herramienta de utilidad. Las tecnologías de discriminación de cepas basadas en la técnica PCR combinada con TGGE, DGGE o PFGE, también han sido importantes en este caso. En el desarrollo de nuevos probióticos, a su vez, es clave el desarrollo de nuevos medios específicos de cultivo y el estudio de cepas no cultivables en la

actualidad, por lo que parte de los esfuerzos investigadores de la comunidad científica se basan en la mayor comprensión de la ecología de la flora intestinal.

Aparte de los probióticos otro concepto de alimentos funcionales es aquel que aplica no ya microorganismos sino moléculas de origen biológico para conseguir una valorización de las propiedades de un alimento, tanto para la población en general como para sectores específicos. Un ejemplo de ello sería el uso de moléculas como los fitosteroles vegetales en alimentos con el objeto de reducir la absorción del colesterol, dirigido a grupos de población con problemas de altos niveles de colesterol y potenciales problemas cardiovasculares. Un avance más, en este aspecto, es la revalorización de lo que hasta ahora eran partes desechadas de la cadena alimentaria, y que son fuentes de moléculas como antioxidantes, fibra dietética, compuestos fitoquímicos, de utilidad en la elaboración de alimentos funcionales. En este caso la valorización de alimentos funcionales se acompaña de un reciclaje y revalorización de excedentes agroalimentarios.

Además de los casos comentados, la biotecnología también está cobrando importancia como herramienta de diagnóstico con el desarrollo, por ejemplo, de técnicas rápidas en el control de microorganismos, compartiendo actividad con las técnicas clásicas de microbiología. Otros campos extensos de aplicación son los múltiples desarrollos de productos enzimáticos utilizados en procesos muy variados que van desde la alimentación al desarrollo de productos de limpieza y desinfección. Se puede ver que en conclusión la biotecnología es en la actualidad una importante herramienta de trabajo dentro de la industria agroalimentaria, con innumerables campos de actividad y otros muchos que sin duda irán surgiendo en breve espacio de tiempo.

Enlaces y referencias de interés

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329-337.

<http://www.fao.org/biotech/stat.asp>

<http://www.agbios.com>

Organización Mundial de la Salud. (2005) *Biología moderna de los alimentos, salud y desarrollo humano: estudio basado en evidencias*. ISBN 92 4 159305 9 disponible en http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_sp.pdf

Organización de Naciones Unidas (1993) "Convenio sobre la diversidad biológica". *United Nations-Treaty Series*. Vol. 1760. I-30619

Séller, K.J. (2001) "Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms" *Am. J. Clin. Nutr.* 73:374S-9S.

Wolf, M & Primrose, S. (2004) "Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud" *Trends Biotechnol.* 22(5):222-6