

11. LA BIOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA DE DESARROLLO DEL SECTOR AGROALIMENTARIO DE EXTREMADURA

*Daniel Martín Vertedor
Francisco Pérez Nevado
Jonathan Delgado Adámez*

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología es una ciencia aplicada que actualmente se encuentra en auge, la cual, mediante el empleo de organismos vivos y sus características, tiene como finalidad la obtención, creación y/o modificación de productos alimentarios. Esta tecnología comprende una amplia variedad de métodos que utilizan sistemas biológicos, organismos vivos o sus componentes, para la obtención de alimentos. En los últimos años, ha experimentado un crecimiento y desarrollo muy rápido, debido a las nuevas demandas de los consumidores y de las industrias agroalimentarias en los procesos de producción.

Esta ciencia, aunque pueda parecer un concepto nuevo, ha estado presente en la vida cotidiana del hombre desde hace miles de años. A pesar de que en esa época el hombre no conocía la existencia de los microorganismos, ni entendía cómo ocurrían los distintos procesos de fermentación, hacía uso de los diversos microorganismos que existían en la naturaleza para su propio beneficio fabricando productos como vino, cerveza, sidra, o yogur. Es decir, desde el punto de vista bioquímico los microorganismos realizan fermentaciones mediante las que obtienen energía a partir de compuestos orgánicos como azúcares y los transforman en compuestos más simples como CO_2 , ácidos, alcoholes, etc. Existen distintos tipos de fermentaciones, siendo las de mayor interés las siguientes:

- Fermentación alcohólica: es la realizada fundamentalmente por levaduras, que en ausencia de oxígeno transforman el azúcar de la materia prima en alcohol y un gas conocido como dióxido de carbono (CO_2). Además, utilizan parte de las proteínas y azúcares para desarrollarse y multiplicarse. Algunas aplicaciones de este tipo de fermentaciones son la elaboración de pan y bebidas alcohólicas como cerveza, vino, sidra, etc.
- Fermentación láctica: se lleva a cabo fundamentalmente por bacterias ácido lácticas (BAL) que en ausencia de oxígeno transforman el azúcar de la materia prima en ácido láctico, etanol, CO_2 , ácido fórmico y/o compuestos de aroma. Sus aplicaciones son la elaboración de productos lácteos, embutidos, aceitunas, etc.
- Fermentación acética: Resulta de la oxidación del alcohol por la bacteria *Acetobacter aceti* en presencia del oxígeno (O_2) del aire. Estas bacterias, a diferencia de las levaduras productoras de alcohol, requieren un suministro generoso de oxígeno para su crecimiento y actividad. En esta fermentación se basa la elaboración de vinagre.

Las industrias en Extremadura están desarrollando planes dirigidos al empleo de estas tecnologías en sus cadenas de producción por las múltiples ventajas que aporta en la productividad y competitividad. Es por ello, que las nuevas tendencias en la producción de alimentos y bebidas contempla la biotecnología como una herramienta que mejora los procesos productivos tanto a nivel técnico (aportando nuevas ventajas en los sistemas productivos de alimentos), como en la obtención de alimentos mejorados sensorialmente o concerniente a la calidad final del mismo. Además, las industrias cuentan con el apoyo y asesoramiento tanto de los organismos públicos de investigación extremeños (Universidad de Extremadura y CICYTEX, de la Junta de Extremadura), como del ámbito privado (CTAEX y otros). Los grupos de investigación que los integran, están desarrollando investigaciones punteras, que en muchos casos son transferidas directamente a la industria.

Este capítulo de libro recoge las nuevas tendencias y hallazgos en este campo de conocimiento, prestando especial interés en las diferentes aplicaciones de la biotecnología en la industria agroalimentaria extremeña, y el impacto socioeconómico que supondría el desarrollo pleno de esta tecnología en los diferentes sectores: i) producción de pan; ii) producción de bebidas alcohólicas; iii) otros productos fermentados de origen vegetal; iv) producción de derivados lácteos; y v) derivados cárnicos fermentados.

2. MEJORA BIOTECNOLÓGICA DE LEVADURAS PANARIAS

Gracias a los estudios de Pasteur, las industrias del sector del pan fueron pioneras en el siglo XIX en la utilización de levaduras seleccionadas para la fermentación. Se generó una potente industria de producción de levaduras de panadería que se mantiene hasta nuestros días. En la actualidad, este sector busca nuevas oportunidades para la innovación biotecnológica de las levaduras panarias. Las mejores técnicas para obtener nuevas variedades de levadura de panadería, puesto que imitan a la naturaleza, son la evolución adaptativa de levaduras salvajes y/o de híbridos, seguidas de fuerte presión de selección (crecimiento en melazas, fermentando nuevas harinas, bajas temperaturas) y buenos procedimientos de cribado o screening, que permiten la selección rápida y eficiente de los microorganismos de interés.

La evolución adaptativa se basa en el principio por el cual las poblaciones de levaduras se adaptan a su medio ambiente a través del tiempo por selección natural. Está relacionada con la variabilidad genética y los procesos que la generan y permite seleccionar cepas con mejores propiedades bien adaptadas a determinadas condiciones. La tasa de evolución de las poblaciones diploides es mayor que la de las haploides en condiciones prolongadas de carencia de nutrientes, se estima que ocurre un cambio adaptativo en un número discreto de aproximadamente 40 generaciones. La evolución adaptativa se puede utilizar como herramienta para mejorar el rendimiento en la manufactura del pan, obteniendo cepas mejor adaptadas a los diferentes hábitats que se producen durante la elaboración del pan.

En Extremadura, como en el resto de nuestro país, nos encontramos dos vertientes diferentes; por un lado, se produce pan a escala industrial que se basa en el empleo de cepas comerciales de levaduras seleccionadas, producidas industrialmente, y en la que no hay una investigación significativa a nivel regional. Mientras que, por el otro, nos encontramos cada vez

un mayor número de panaderías, la mayoría artesanales, que trabajan con “masa madre”, basada en el uso de levadura natural o levadura de masa, preparada a partir de las levaduras fermentativas y/o BAL, que se desarrollan de forma espontánea en una masa de panadería. Por tanto, cada una de esas panaderías tendría una microbiota diferenciada, que aportaría características propias a su producto y que sería de gran interés estudiar. Sin embargo, en este sector queda aún mucho camino por recorrer para aplicar la biotecnología para la mejora de la calidad del producto, mediante su aplicación a la caracterización, identificación y modificación genética de los microorganismos implicados en este proceso. Esta es una herramienta fundamental para conocer qué microorganismos estamos realmente utilizando en estas panaderías, asegurarnos un producto siempre de calidad y determinar las posibles mejoras a implementar en este proceso para optimizarlo en la medida de lo posible.

3. MEJORAS BIOTECNOLÓGICAS EN LA ELABORACIÓN DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS

El sector **vitivinícola** tiene una gran relevancia, tanto a nivel nacional, como para nuestra región. El vino es un producto desarrollado por levaduras que transforman y fermentan los azúcares del mosto en alcohol, además de producir compuestos esenciales en el aroma. Por tanto, la biotecnología cobra aquí una importancia grande para la mejora de la calidad del vino, pudiendo aplicarse no sólo para modificar las características de las levaduras vínicas, sino también a nivel de la vid. Los mayores avances en investigación de los últimos años tienen que ver con el empleo de levaduras recombinantes en la elaboración del vino. Para ello, se están realizando estudios para la introducción de uno o varios genes exógenos en las levaduras a utilizar como cultivos iniciadores, analizando su imposición en el medio, si se produce la expresión de dichas características a lo largo del proceso fermentativo y, por tanto, el efecto que esta mejora tiene sobre el producto final. Esto permite que los genes se expresen en el momento adecuado del proceso de elaboración. Para la mejora de los procesos fermentativos se han desarrollado levaduras recombinantes en las que se han insertado genes exógenos provenientes de BAL, mohos y otras levaduras:

- *Lactobacillus casei*: permite la producción de ácido láctico y se utilizan en vinos que presentan problemas de baja acidez. La levadura transgénica es así capaz de llevar a cabo la fermentación láctica y la alcohólica, con lo que se resuelve este problema.
- *Lactococcus lactis* y *Schizosaccharomyces pombe*: la levadura modificada llevaría a cabo la fermentación maloláctica (conversión del ácido málico en ácido láctico), la cual produce una disminución de la acidez y una mayor estabilidad microbiológica del vino.
- *Aspergillus niger* y *C. molischiana*: la levadura se transforma con dos genes exógenos, los cuales codifican para dos enzimas: una arabinofuranosidasa del hongo *A. niger*, corta el enlace entre la arabinosa y la glucosa. Así se posibilita la acción de la segunda enzima, una β -glucosidasa aislada de la levadura *C. molischiana* capaz de cortar el enlace entre la glucosa y el terpeno. De este modo, los terpenos quedan libres, incrementando los aromas varietales.

De igual forma, se han producido en levaduras vínicas, enzimas recombinantes celulasas y hemicelulasas, y se han logrado resultados comparables a los obtenidos tras la adición convencional de los preparados enzimáticos comerciales durante la vinificación. Actualmente se está investigando sobre los genes que regulan la floculación de las levaduras, la construcción de levaduras recombinantes incapaces de producir urea o la modificación de las características metabólicas para optimizar las tasas de fermentación y la producción de metabolitos de interés.

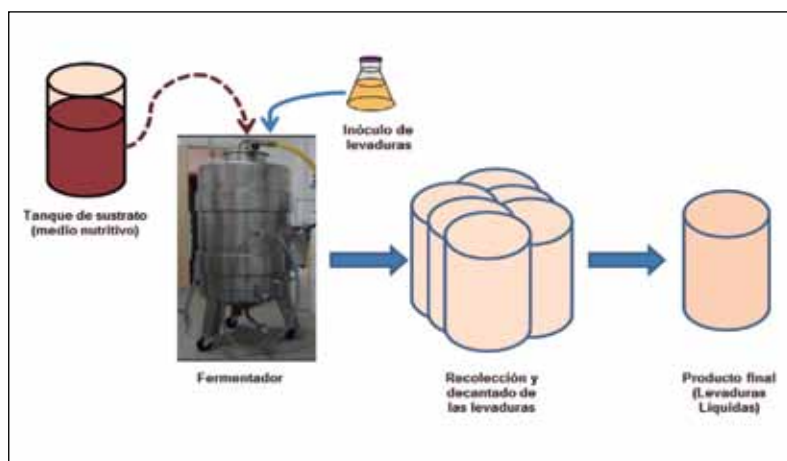
En Extremadura se llevan desarrollando diferentes investigaciones para la mejora de levaduras vínicas, algunas de las cuales se han traducido en patentes de invención con su posterior transferencia a la industria vitivinícola. A este respecto, el grupo de investigación de Microbiología Enológica, Edáfica y Acuática (MICROENO) de la Universidad de Extremadura, ha seleccionado levaduras de diferentes especies, *S. cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*, para su aplicación en la elaboración de vinos. Este grupo, mediante un método de mejora genética, aislaron mutantes espontáneos resistentes a diferentes drogas (cicloheximida y sulfometurón) a partir de levaduras vínicas seleccionadas, a los que se les introdujo el fenotipo *killer*, que les permite eliminar a otras levaduras sensibles. Además, dichas levaduras, que mantenían las características tecnológicas de las originales, eran fácilmente detectables durante la fermentación. En los últimos años, este grupo ha seleccionado y caracterizado dos nuevas cepas de levaduras vínicas *killer* para mejorar el proceso de elaboración y la calidad de vinos tranquilos y de vinos espumosos. Estas levaduras vínicas, que tienen un amplio espectro antifúngico son una cepa de *S. cerevisiae* Klus y otra de *T. delbrueckii* Kbar. Su uso sería de gran utilidad para mejorar el control de las fermentaciones de mosto y la calidad de los vinos espumosos.

Desde la Universidad de Extremadura también se han desarrollado diferentes trabajos en los que se optimiza la producción de levaduras para su uso como cultivos iniciadores en bodegas. Para la producción se han empleado subproductos de la industria azucarera, las melazas, además de mosto de uva, y se han optimizado las condiciones a utilizar en el proceso de producción (Figura 1). Como consecuencia de toda esta actividad investigadora, se han desarrollado dos patentes de invención, que están siendo aplicadas por la empresa extremeña HERAL Enología S.L. Esta empresa produce diferentes cepas de levaduras, todas ellas autóctonas (EX88, E7AR1, SMR16, E3AR1, 7AR), para su venta como levaduras líquidas refrigeradas, y su empleo en bodegas extremeñas. Las levaduras producidas son adecuadas para elaborar vinos tintos, blancos y rosados, siendo en general buenas productoras de aromas fermentativos, potenciando el carácter varietal de los vinos. Esta empresa oferta incluso la posibilidad de crear colecciones propias de levaduras de cada bodega, realizando un aislamiento y reproducción de levaduras a partir de los viñedos de la misma. Además de esas características tecnológicas inherentes a la levadura, las levaduras líquidas tienen algunas ventajas frente a las levaduras secas, entre las que están el gran vigor, al tener un periodo de latencia muy corto; el ahorro en tiempo y mano de obra al no necesitar rehidratación o su elevada viabilidad al no haber sido desecadas.

A lo largo de la historia, la **industria cervecera** se ha caracterizado por su alto grado de innovación en el proceso tecnológico de elaboración. Para la mejora de este proceso, en los últimos años se están empleando soluciones basadas en el uso de microorganismos, con o sin modificación genética, o de componentes obtenidos a partir de ellos. Un ejemplo de esto es el desarrollado para mejorar la filtración; este es un proceso muy costoso que se ve afectado por la presencia de β -glucanos provenientes de los granos de cebada. Estos compuestos dificultan el filtrado al aumentar la viscosidad del medio y, además, no son fermentables directamente

por las levaduras. En este sentido se han caracterizado y seleccionado enzimas (β -glucanasa) de hongos filamentosos capaces de romper estos polímeros. Pero estos preparados presentan una dificultad, que es su alta heterogeneidad; por este motivo se han obtenido transgénicos de levaduras cerveceras que contienen el gen que codifica para esta enzima. Estas levaduras secretan al mosto la enzima β -glucanasa, obteniendo una cerveza con las mismas características organolépticas y libres de β -glucanos.

FIGURA 1: Proceso de producción de levadura para vinificación en planta piloto



Por otro lado, la elaboración de alimentos más saludables se ha convertido en una prioridad; por ello, la comercialización de alimentos y bebidas, pasa por la obtención de productos bajos en calorías. La cerveza se caracteriza por un alto contenido en hidratos de carbono que no son metabolizados por las levaduras durante la fermentación. Esta problemática puede ser atajada con el empleo de preparados enzimáticos durante la fermentación, encargados de degradar estos compuestos y obteniendo cervezas bajas en calorías. Sin embargo, como ya apuntábamos anteriormente, estos preparados presentan problemas con su homogeneidad, conteniendo impurezas que son costosas de eliminar, haciendo que la elaboración de cervezas pierda competitividad económica. Por ello, nuevamente se ha optado por la obtención de levaduras transgénicas que sintetizan enzimas encargadas de degradar los compuestos residuales altos en energía. Una de las enzimas utilizadas actualmente es la glucoamilasa, cuyos genes se han obtenido de hongos filamentosos (*A. niger*) o de la levadura *S. diastaticus* y son introducidos en *S. cerevisiae*.

Pero no todas las innovaciones biotecnológicas han estado destinadas a la resolución de problemas tecnológicos, sino que en ocasiones se ha buscado una mejora de la calidad sensorial o adaptarse a las nuevas demandas de los consumidores ofreciendo un producto bajo en calorías. En este sentido, se han seleccionado levaduras transgénicas a las cuales se les ha eliminado el gen que codifica para la enzima sulfito reductasa, y por tanto son capaces de acumular sulfito que confieren un sabor y aroma mucho más apreciado por los consumidores. Otro problema que podemos encontrar en la elaboración de cerveza es la acumulación de diacetilo como resultado de la descarboxilación espontánea del α -acetolactato. Este producto que es volátil produce una alteración organoléptica de la cerveza, proporcionándole un aroma lácteo, a mantequilla,

inapropiado para este producto. Al ser volátil, este compuesto puede eliminarse manteniendo la cerveza más tiempo en los fermentadores; sin embargo, esto conlleva una pérdida productiva significativa. En este sentido se han identificados los genes bacterianos, de las bacterias empleadas en la elaboración del vinagre (*Acetobacter acetii*) o de *Enterobacter aerogenes*, capaces de sintetizar una enzima capaz de convertir α -acetolactato en acetoina, un compuesto que no produce alteración organoléptica en la cerveza.

FIGURA 2: Cerveza artesana extremeña (Vinífera) que incorpora en su elaboración mosto de uvas



Fuente: Colabort

En los últimos años, en Extremadura han aflorado microcervecerías, encontrándose alrededor de 15 de este tipo de industrias en nuestra región. Todas ellas ofrecen excelentes productos, con gran sabor, y obtenidos de una forma artesanal. Debido a la gran competencia existente, la tónica general es la búsqueda de un producto distinto a la cerveza comercial; de hecho esta fabricación artesana permite crear recetas diferentes. Algunas como Vinífera (figura 2), que es la primera cerveza artesana extremeña que incorpora en su elaboración mosto de uvas. Es por esto que recibe ese nombre, pues como todo sabemos la uva es el fruto de la planta de vid (*Vitis vinífera* L.). Es una de las cervezas artesanas más jóvenes de Extremadura, nace en 2015 de la mano de un proyecto empresarial, Colabort (Consultoría, laboratorio y productos agroalimentarios), con la intención de fusionar dos sectores, el del vino y de la cerveza, y de dar un valor añadido al producto insignia de la zona. Vinífera se fabrica siguiendo las técnicas artesanales de elaboración de cerveza y utilizando las materias primas habituales como son el agua, la malta, el lúpulo y la levadura pero incorporando a la misma, mosto de uvas de la comarca de Tierra de Barros. Lo peculiar de esta cerveza es que una única levadura (Mauribrew Draught, una cepa de

S. cerevisiae) seleccionada originalmente para elaborar cervezas, fermenta los dos tipos de mostos (mosto de malta y de uva) unificando la calidad del producto final y dando como resultado una cerveza con un punto de acidez mayor que una cerveza convencional, es mucho más fresca, muy aromática y con un agradable carácter afrutado gracias al mosto de uvas, convirtiéndolo en un producto muy peculiar. En origen es una cerveza de estilo english pale ale, de apariencia dorada y espuma blanca persistente, hacia la que asciende una fina burbuja. Sin duda es “una cerveza artesana con alma de vino” que no queda indiferente a nadie.

FIGURA 3: Instalaciones de la microcervecería Ballut, situada en la localidad de Badajoz



Cerex en su fábrica en Zarza de Granadilla elaboran la primera cerveza con sabor a bellota, que fue elegida mejor producto alimentario del 2013. Ballut, que significa bellota en árabe, utiliza en algunas de sus elaboraciones dos maltas, lúpulos con toques cítricos y miel de Fuenlabrada de los Montes, que añaden en el proceso de carbonatación. Estas elaboraciones se caracterizan por una fermentación a pequeña escala (figura 3), muy cuidada, basadas en el uso de cebada, y también de trigo, malteados; aunque algunos emplean arroz en su elaboración, todos evitan el uso de maíz y de enzimas. Podemos considerar que este es el germen necesario para desarrollar nuevos productos y mejorar los existentes mediante el empleo de microorganismos. Sin embargo, y a pesar de basarse en fermentaciones artesanas, hasta el momento, estas microcervecerías no están aplicando todas las mejoras biotecnológicas que podrían. Algunas opciones de interés para mantener la tipicidad del producto pasarían por el uso de levaduras seleccionadas propias de cada industria, adaptadas a las condiciones de fermentación (materias primas, temperaturas, tiempos, etc.) empleadas, o el uso de métodos basados en el ADN recombinante para la introducción de caracteres que afecten a la componente aromática de la cerveza elaborada.

4. OTROS PRODUCTOS FERMENTADOS DE ORIGEN VEGETAL

El desarrollo de la biotecnología está también encaminado al estudio de la diversidad microbiana asociada a productos fermentados de origen vegetal; su resultado es una amplia colección de microorganismos, bacterias y/o levaduras que son objeto de explotación biotecnológica tanto *in vivo* (cultivos iniciadores, probióticos...) como de sus metabolitos (bacteriocinas, exopolisacáridos, carotenoides, enzimas...).

Las BAL juegan un papel esencial en la elaboración de los encurtidos vegetales, incluidas las aceitunas verdes elaboradas al estilo español o sevillano. El principal género aislado para la fermentación de estos productos de origen vegetal es *Lactobacillus*. En menor número se han aislado los géneros *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Un gran número de investigadores recomiendan el empleo de inóculos para fermentar estos encurtidos aderezados; el empleo de cultivos iniciadores hace que se mejore la calidad y seguridad de la fermentación láctica, particularmente en aceitunas de mesa ya que al inocular con microorganismos seleccionados se producirá una estandarización y homogeneización del producto final, consiguiéndose aceitunas de la misma calidad en cada temporada. Sin embargo, a nivel industrial esta práctica continúa no estando muy extendida, realizándose la mayoría de los procesos mediante fermentación espontánea.

El objetivo final de una fermentación es tanto preservar las características del producto final, como mejorar sus propiedades. Varios son los factores que influirán en el correcto desarrollo de la fermentación ya que afectan el crecimiento de los microorganismos y que se deben evaluar para controlar el ecosistema: temperatura, pH, actividad del agua, oxígeno, radiación, presión y agentes estáticos. Un aspecto esencial del éxito de las BAL como agente protector en la industria fermentadora es la enorme variedad de maneras de contrarrestar el crecimiento de organismos competidores. Las BAL producen sustancias antimicrobianas conocidas por bacteriocinas. De entre estas sustancias, la mejor conocida es la nisina, antimicrobiano que destruye organismos Gram-positivos abriendo poros en sus membranas, y que además ha sido utilizada sustancialmente como un agente antimicrobiano "natural". Además de la nisina y otros bacteriocidas también debemos considerar la producción de ácidos orgánicos, como el ácido láctico, acético y propiónico, peróxido de hidrógeno, derivado activo del oxígeno (y potencialmente dañino) y diacetilo y acetaldehído.

Hay que destacar que estas bacterias generalmente prefieren un pH en el intervalo de 4,0 - 4,5 aunque ciertas cepas pueden tolerar y crecer en pH superiores a 9,0 o tan bajos como 3,2. Sin embargo, concentraciones de NaCl superiores al 8% en las fermentaciones de aceitunas son prácticamente inhibitorias de las BAL. No obstante, a pesar de ese carácter inhibitorio hacia las BAL, se ha informado de la existencia de cepas de *Lb. plantarum* que poseen la capacidad de hidrolizar *in vitro* la oleuropeína e, incluso, su aglucona.

De forma general, se establece que las BAL son las responsables de la fermentación de los encurtidos vegetales mientras que en la fermentación de aceitunas al natural se establece una competencia entre BAL y levaduras, pudiendo estas últimas llegar a ser las responsables únicas de la fermentación. Por tanto, es necesario destacar el papel desarrollado por las levaduras en fermentaciones de aceituna de mesa, en particular en las elaboradas al natural o aderezadas. Hasta hace pocos años el papel de las levaduras en las aceitunas de mesa aderezadas se había considerado poco importante, e incluso negativo para la calidad del producto final. Aunque, como ya

se ha indicado, la fermentación de las aceitunas aderezadas es llevada a cabo mayoritariamente por BAL, se pueden detectar poblaciones de levaduras entre 10^4 y 10^6 ufc/ml. Al igual de lo que ocurría con las BAL, su utilidad como agente de biocontrol es considerado un factor determinante para su selección. Sería interesante el uso de levaduras con capacidad para controlar el desarrollo de microorganismos considerados alterantes, evitando así la utilización de compuestos químicos. Otro aspecto interesante desde el punto de vista del aroma de las aceitunas es la capacidad de las levaduras de producir catalasa. Esta enzima evita la acción de los peróxidos sobre las grasas, protegiendo las aceitunas de fenómenos de enranciamiento. Al mismo tiempo, su uso aseguraría la obtención de aceitunas de mesa con unas características propias y de una elevada calidad físico-química y sensorial. En estudios realizados por el grupo de investigación CAMIALI de la Universidad de Extremadura se han aislado, caracterizado y seleccionado cepas de levaduras de interés para la elaboración de este producto. Asimismo, se han realizado estudios a escala piloto con cepas de levaduras pertenecientes a varias especies (*Kluyveromyces marxianus*, *C. pelliculosa*, *Pichia anomala* o *S. cerevisiae*), habiéndose encontrado que todas ellas cumplen las condiciones para su empleo como cultivos iniciadores para la elaboración de un producto seguro y de elevada calidad sensorial. Estas cepas se caracterizan por no producir ablandamientos de las aceitunas (relacionado con bajas actividades pectinasa y xilanasas); además, producen una mejora de aromas y permiten mantener el color del producto final.

5. BIOTECNOLOGÍA DE LAS LECHE FERMENTADAS

En los últimos años, algunas de las propiedades tecnológicas de las BAL han sido objeto de estudio con el fin de obtener cultivos iniciadores bioingenierizados que le confieran un valor añadido a los productos lácteos fermentados, tanto leches fermentadas, como quesos. En este sentido, hemos de destacar los avances en los campos que a continuación se desarrollan.

Hay una gran cantidad de estudios en los que se analiza la utilidad del empleo de microorganismos para la biopreservación de los productos alimentarios. El efecto bioconservador que las BAL ejercen en los productos lácteos, no sólo se debe al bajo pH provocado por la formación de ácido láctico. En ocasiones, ciertas BAL pueden producir peróxido de hidrógeno, que puede ejercer un efecto antagonista en otra microbiota alterante o patógena. Así mismo, algunas BAL producen bacteriocinas, moléculas de naturaleza proteica inocuas para el organismo humano, que inhiben el desarrollo de ciertos microorganismos. De entre ellas, la nisina es la más conocida y es la única autorizada actualmente para la bioconservación de alimentos. Hoy día se ha descrito un amplio número de bacteriocinas, algunas de las cuales resultan prometedoras como biopreservadores. En este sentido, la construcción de cepas de BAL multibacteriocinogénicas de grado alimentario mediante biotecnología representa una de las líneas de desarrollo de mayor interés tecnológico en la actualidad.

La proteólisis es producida cuando se degradan las caseínas y por tanto se contribuye decisivamente a la textura y aroma de los productos lácteos fermentados. La utilización de herramientas biotecnológicas ha permitido la caracterización del sistema proteolítico de diversas BAL, lo que abre el camino hacia el desarrollo biotecnológico de nuevos cultivos iniciadores que puedan permitir la generación de compuestos bioactivos a partir de proteínas, como los péptidos inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina I.

Se debe tener presente que algunos microorganismos adicionados a la leche para la obtención de leches fermentadas conducen a la formación, además de ácido láctico, de alcohol etílico y de dióxido de carbono, ya que se producen dos fermentaciones, una de tipo láctica y otra de tipo alcohólica. Un ejemplo es el kéfir, en el que se produce una fermentación láctica por *L. kefir* y especies diversas del género *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*; mientras que la fermentación alcohólica se debe a la acción de levaduras que fermentan la lactosa, como *K. marxianus* y *C. kefir*, y otras que no la utilizan, como *S. unisporus*, *S. cerevisiae* y *S. exiguus*.

Por otra parte, además de en las leches fermentadas, en los últimos años se han realizado diversos estudios de la microbiota de quesos, principalmente quesos artesanos acogidos a diferentes Denominaciones de Origen Protegidas, para la mejora de la calidad de los mismos. En Extremadura se elaboran quesos de pasta blanda acogidos a dos DOP, Torta del Casar y Queso de La Serena. Ambos son elaborados con leche cruda de ovejas, cuya coagulación se realiza con cuajo vegetal procedente del cardo *Cynara cardunculus*. Una vez finalizado el proceso de elaboración, estos quesos de pasta blanda pasan a la fase de maduración. Al igual que ocurre con otros alimentos fermentados, se va a producir una fermentación natural en este caso producido por BAL, debido a que la materia prima empleada es leche cruda sin pasteurizar. El reto biotecnológico sería aislar estas bacterias no entéricas que produzcan la proteólisis que provoca la untuosidad a estos quesos y de este modo poder inocularlas durante el proceso de elaboración de las mismas para conseguir una estandarización del producto sin poner en riesgo la seguridad alimentaria. Es de resaltar que en nuestra Región se han realizado estudios por parte del INTAEX (CICYTEX) y la Universidad de Extremadura para mejorar las características de quesos de cabra de la DOP Ibores basándose en el desarrollo de un cultivo iniciador autóctono. Para ello, se aislaron BAL relacionadas con la elaboración de esos quesos y se desarrolló un cultivo iniciador autóctono, empleando técnicas moleculares de identificación. Este cultivo iniciador tiene como ventajas aumentar la seguridad alimentaria de los quesos, y obteniendo un producto de calidad y con características típicas de los quesos de Ibores. Además, durante el proceso de obtención del inóculo se aislaron más de 300 cepas de BAL, que servirán de base para la realización de posteriores estudios genéticos para su mejora genética.

También por parte del grupo CAMIALI de la Universidad de Extremadura y de CTAEX se han realizado estudios con Torta del Casar en los que se han determinado la influencia de diferentes grupos microbianos sobre las características del producto final. El grupo de bacterias mayoritario encontrado en estos quesos ha sido el de las BAL, siendo los principales géneros encontrados *Lactococcus* y *Enterococcus*; sin embargo, otros grupos microbianos, incluyendo algunas enterobacteria como *Serratia*, parece claro que participan en el aroma y sabor finales del mismo.

6. BIOTECNOLOGÍA EN PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADOS

Además de ser útiles para la obtención de productos lácteos fermentados, las BAL se desarrollan bien en productos cárnicos, habiendo algunas que son utilizadas para la obtención de productos cárnicos fermentados, como el salchichón. Como ya hemos indicado anteriormente, ciertas bacterias producen bacteriocinas, compuestos que se pueden añadir a la masa cárnica para la inactivación de patógenos en productos cárnicos fermentados. La disminución de pH que se alcanza en embutidos en comparación con las carnes frescas puede aumentar la solubilidad de algunas bacteriocinas como la nisina, y probablemente su actividad antimicrobiana también. En diferentes estudios se ha visto que bacteriocinas como la nisina, enterocinas (CCM 4231, A, B y AS-48) o leucocinas mejoraron la reducción de *Listeria monocytogenes* y de *Staphylococcus aureus* en productos fermentados (figura 4).

FIGURA 4. Halo de inhibición producido por una cepa de *Enterococcusfaecium* sobre un césped de *L. monocitogenes*



El empleo de bacteriocinas puede ser una barrera interesante para la inactivación de microorganismos en embutidos ligeramente fermentados, en los que su pH más elevado y el mayor contenido en agua pueden facilitar la supervivencia y proliferación de ciertas bacterias patógenas. Por lo tanto, las cepas de BAL productoras de bacteriocinas, podrían ser empleadas como cultivos iniciadores activos frente a patógenos como *L. monocytogenes*. Diversas cepas de *Lactobacillus* productoras de bacteriocinas (principalmente *Lb. sakei* y *Lb. curvatus*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. plantarum*) han demostrado tener efectos inhibidores frente a *Listeria* en fermentaciones de salchichas o salami, dependiendo en gran medida de la cepa y el tipo de carne.

La cepa *Lb. Sakei* CTC 494 (productora de sakacina K) es un cultivo iniciador interesante con actividad frente a *Listeria*, siendo capaz de inhibir con éxito a *L. monocytogenes* en embutidos fermentados al estilo español y alemán o reducir las poblaciones de *Listeria* en salchichas belgas, salami italiano y salami Cacciatore. La eficacia de *Lb. sakei* está influenciada por factores ambientales tales como ingredientes, sal, grasa, concentraciones de nitrito, nivel de acidificación y temperatura. Debido a que *Lb. sakei* y *Lb. curvatus* pueden hidrolizar las proteínas musculares sarcoplásmicas y, en menor medida, las proteínas miofibrilares, pueden contribuir a la generación de péptidos pequeños y aminoácidos que actúen como potenciadores del sabor o como precursores directos de otros compuestos de sabor durante la maduración de los embutidos fermentados. El estudio de estos procesos podría dar lugar a nuevas aplicaciones de cultivos iniciadores de nueva generación con propiedades funcionales de interés industrial o nutricional.

Los pediococos productores de bacteriocinas pueden reducir las poblaciones de *L. monocytogenes* en productos cárnicos fermentados. Los pediococos son preferidos como cultivos iniciadores (en lugar de los lactobacilos) en ciertos productos, por ejemplo en embutidos al estilo americano fermentados a temperaturas más altas. Las cepas productoras de Pediocina PA-1 no inhiben a bacterias que son importantes para la fermentación de los embutidos como estafilococos y micrococos. Algunas cepas de lactococos productoras de nisina aisladas de embutidos fermentados también se han propuesto como cultivos adjuntos para mejorar la seguridad microbiológica de los productos cárnicos fermentados elaborados en condiciones higiénicas deficientes, tales como en productos tradicionales caseros.

Los enterococos son a menudo parte de la microbiota normal en las fermentaciones de productos cárnicos y han demostrado tener actividad frente a *Listeria* y *S. aureus* en productos fermentados. Sin embargo, su aplicación en alimentos da lugar a controversia debido a su potencial como patógenos oportunistas. En este aspecto, la cepa de *Enterococcus faecalis* CECT7121 (productora de la enterocina de amplio espectro MR99) es interesante porque carece de factores de virulencia como los genes para producción de hemolisina y de gelatinasa y además no produce aminas biógenas. Los embutidos fermentados inoculados con la cepa CECT7121 presentaron una disminución del recuento de células viables de *Staphylococcus*, enterobacterias y otros cocos gram-positivos al final de la fermentación y ausencia de viables de *S. aureus* y enterobacterias al final del proceso.

Los estafilococos y micrococos también pueden ser explotados como fuente de sustancias antibacterianas aplicables en la fermentación de embutidos. El gen que codifica para la lisostafina (una endopeptidasa que rompe específicamente los enlaces glicina-glicina en los puentes transversales de la pared celular de *S. aureus*) se puede introducir en lactobacilos y posteriormente utilizarlos como cultivo iniciador para evitar el crecimiento de *S. aureus* en productos cárnicos. *S. xylosus* aislado de salchicha produce una sustancia antimicrobiana que permite inhibir a *L. monocytogenes* en embutidos estilo Nápoles. Otra bacteria de este grupo, *Kocuria varians*, produce el lantibiótico variacina, pero aún se desconocen los efectos de las cepas productoras de este péptido antimicrobiano en las fermentaciones de embutidos.

En Extremadura, el grupo CAMIALI de la Universidad de Extremadura lleva trabajando más de quince años en el desarrollo de cultivos iniciadores para la obtención de productos cárnicos de calidad. Se han aislado, caracterizado e identificado una gran cantidad de cepas de BAL y micrococáceas para su posterior uso como cultivos iniciadores. De ellas, cepas de *Pediococcus acidilactici* y *S. vitulus*, se han utilizado en estudios a nivel de planta piloto para

elaborar embutidos, los cuales no presentaron alteraciones negativas sobre las características sensoriales, y sí mejoraron su homogeneidad y salubridad.

Además, componentes de los grupos CAMIALI y de HISEALI (de Higiene y Seguridad Alimentaria) han patentado un enzima proteolítico, EPg222, obtenido del moho *Penicillium chrysogenum* Pg222 aislado de productos cárnicos curados, que presenta una elevada actividad proteolítica frente a proteínas miofibrilares y que puede tener un gran número de aplicaciones en industrias que producen productos cárnicos curados. El gen que codifica este enzima ha sido clonado y expresando como un enzima funcional activo en la levadura *P. pastoris*, pudiendo ser producido en grandes cantidades para su empleo en la elaboración de productos cárnicos curados. En estudios realizados por estos grupos, se ha analizado el efecto conjunto de cultivos iniciadores de BAL y micrococáceas y la proteasa EPg22 sobre la calidad de salchichones, en los que se obtuvo una mejora de la textura final y una menor producción de aminos biógenos que los salchichones no inoculados.

Como ya se ha indicado, las BAL son los microorganismos más estudiados en productos cárnicos, y los que parecen tener una mayor influencia sobre su calidad. Sin embargo, hay estudios en los que queda de manifiesto la importancia de otros tipos de microorganismos. En estudios realizados con jamón ibérico por el grupo de investigación HISEALI de la Universidad de Extremadura se han encontrado una gran cantidad de levaduras durante el procesado del mismo. Estas fueron caracterizadas e identificadas utilizando diferentes técnicas de ácidos nucleicos. Aunque la levadura predominante fue *D. hansenii*, aparecen también levaduras de la especie *C. zeylanoides*. La caracterización de la población levaduriforme predominante en el procesado de jamones de cerdo ibérico sería de gran utilidad para conocer el tipo de levadura más adecuada para su desarrollo en cada industria, y para su empleo como cultivo iniciador. Basándose en los estudios de la población levaduriforme en productos cárnicos, este grupo de investigación ha propuesto el empleo de un cultivo mixto constituido por tres cepas diferentes de *D. hansenii*, ya que se disminuyó la producción de compuestos azufrados.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo hemos realizado un análisis de la importancia de la biotecnología para la mejora de productos alimentarios, y de las principales tendencias que se están desarrollando en este campo. Como ya hemos indicado, en nuestra región hay bastantes estudios en los que se han aislado, caracterizado, identificado y seleccionado microorganismos autóctonos, tanto bacterias como levaduras, para su uso como cultivos iniciadores en diferentes productos alimentarios. Sin embargo, la mejora genética de los mismos, para potenciar la producción de aromas, mejorar su capacidad competitiva frente a otros microorganismos, o facilitar su detección, aún están en una fase preliminar. Por tanto, se requieren más estudios en este sentido para mejorar los microorganismos y, en consecuencia, el producto final. En la medida en que avance la ciencia y el conocimiento básico sobre la fisiología y el engranaje metabólico de los organismos que se quieren modificar, se podrán abordar la mejora genética de estos organismos, con la consiguiente mejora en los procesos de producción de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Andrade M.J., Córdoba J.J., Casado E.M., Córdoba M.G., Rodríguez M. Effect of selected strains of on the volatile compound production of dry fermented sausage “salchichón”, Meat Science, Volume 85, Issue 2, 2010, Pages 256-264, ISSN 0309-1740, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.01.009>.

- Fernández M., Ruiz-Moyano S., Benito M.J., Martín A., Hernández A. and Córdoba M.G. Potential antimicrobial and antiproliferative activities of autochthonous starter cultures and protease EPg222 in dry-fermented sausages. Food Funct., 2016, 7, 2320-2330. DOI: 10.1039/C6FO00236F
- SchaideArruda de Castro, T. Estudio para la mejora de la calidad de aceitunas de mesa mediante el empleo de microorganismos seleccionados y extractos vegetales. Trabajo de Fin de Grado. 2015
- Velázquez Molinero R. Estudio de nuevas levaduras Killer “*Saccharomyces cerevisiae*” y “*Torulaspota delbrueckii*” para elaborar vinos tranquilos y espumosos. Tesis doctoral. 2015.
- Delgado Adámez, J y Rocha Pimenta, J. Biotecnología alimentaria. Madrid España. Editorial síntesis, 2017.