

# CtC

Diciembre 2005 / N° 26

## alimentación

CENTRO TECNOLÓGICO NACIONAL DE LA CONSERVA Y ALIMENTACIÓN



monográfico

# AgroCSiC



ALGUNOS LO TIENEN  
DIFÍCIL PARA HACER UN  
BUEN ABREFÁCIL



*Las cosas más sencillas de manejar esconden siempre un complejo proceso de trabajo.*

*En Auxiliar Conservera el diseño, la tecnología y el control de calidad se dan la mano para conseguir el sistema de apertura de envases más cómodo, seguro y práctico del mercado.*



SI USTED  
TIENE UN  
PRODUCTO,  
NOSOTROS  
PODEMOS  
ENVASARLO.

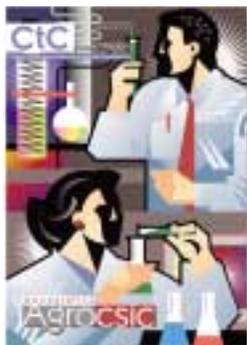


**AUXILIAR CONSERVERA S.A.**

Murcia • Ctra. Torrealta, s.n. • telf.: 968 64 47 88 • Fax: 968 61 06 86 • 30500 Molina de Segura (Murcia - España)  
Sevilla • Ctra. comarcal 432, km. 147 • telf.: 95 594 35 94 • fax: 95 594 35 93 • 41510 Mairena del Alcor (Sevilla - España)

# Agrocsic: dos años de impulso a la transferencia de resultados de investigación

OFICINA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN DEL CTC



Una de las principales actividades del Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación es la Transferencia Tecnológica y de Resultados de Investigación y dentro de este marco se comenzó a trabajar hace ya dos años en el proyecto AGROCSIC, subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia y en colaboración con la Oficina de Transferencia Tecnológica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (OTT CSIC).

AGROCSIC nació con un claro objetivo que era transferir resultados de investigación del CSIC al sector agroalimentario español con un lenguaje siempre claro y directo evitando complicados cálculos, siglas o acrónimos desconocidos, etc., y dando los datos de contacto de los investigadores para facilitar la comunicación entre empresa e investigadores.

A través de este proyecto, cuyas principales herramientas de difusión han sido la revista CTC Alimentación y la página web [www.ctnc.es](http://www.ctnc.es), podemos afirmar que el sector agroalimentario

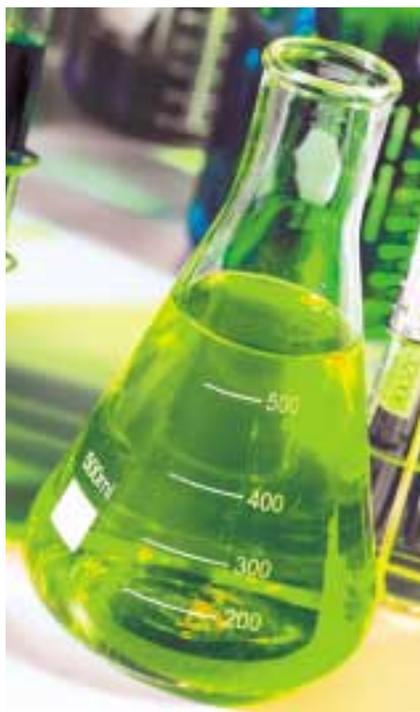
se ha beneficiado por su relación con investigadores del CSIC y por haber tenido acceso a numerosos artículos y noticias de I+D+I a los que sin AGROCSIC hubiese sido difícil acceder. La revista CTC Alimentación ha sido un perfecto puente de transmisión entre las revis-

tas científicas de alto impacto, que generalmente no llegan a las empresas, y los técnicos de las empresas agroalimentarias.

El CTC quiere agradecer la colaboración de la OTT del CSIC y del Ministerio de Educación y Ciencia así como de los investigadores de Centros e Institutos del CSIC de toda España que han confiado en este proyecto aportando sus trabajos, noticias, contactando con empresas, etc.

Y aunque oficialmente AGROCSIC finaliza en 2005, este Centro Tecnológico continuará trabajando en esta línea por lo que invitamos a

los investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas a seguir enviándonos cualquier información que consideren de interés para el sector agroalimentario. ■



HERRAMIENTA DE DIFUSIÓN  
DEL PROYECTO:

**Agrocsic**



## C R É D I T O S

CTC ALIMENTACIÓN  
REVISTA SOBRE AGROALIMENTACIÓN  
E INDUSTRIAS AFINES

Nº 25

PERIODICIDAD TRIMESTRAL

FECHA DE EDICIÓN SEPTIEMBRE 2005

EDITA

Centro Tecnológico Nacional de la  
Conserva y Alimentación  
Molina de Segura - Murcia - España  
tel. 968 38 90 11 / fax 968 61 34 01  
[www.ctnc.es](http://www.ctnc.es)

**DIRECTOR**  
LUIS DUSSAC MORENO  
[ctcluis@ctnc.es](mailto:ctcluis@ctnc.es)  
**CONSEJO EDITORIAL**  
PRESIDENTE: JOSÉ GARCÍA GÓMEZ  
JOSÉ MIGUEL CASCALES LÓPEZ  
JAVIER CEGARRA PÁEZ  
FRANCISCO PUERTA PUERTA  
PEDRO ABELLÁN BALLESTA  
MANUEL HERNÁNDEZ CORDOBA  
ALBERTO BARBA NAVARRO  
FRANCISCO SERRANO SÁNCHEZ  
FRANCISCO TOMÁS BARBERÁN  
JUAN ANTONIO AROCA BERMEJO  
FRANCISCO ARTÉS CALERO

**COORDINACIÓN: OTRI CTC**

ÁNGEL MARTÍNEZ SANMARTÍN  
[ctcangel@ctnc.es](mailto:ctcangel@ctnc.es)

MARIAN PEDRERO TORRES  
[ctcdoc@ctnc.es](mailto:ctcdoc@ctnc.es)

MARÍA ÁNGELES HERNÁNDEZ CUTILLAS  
[ctcmaria@ctnc.es](mailto:ctcmaria@ctnc.es)

ALICIA GARCÍA SEIQUER  
[agarcia@ctnc.es](mailto:agarcia@ctnc.es)

**PERIODISTA**

JOSÉ IGNACIO BORGOÑÓS MARTÍNEZ

**EDICIÓN, SUSCRIPCIÓN Y PUBLICIDAD**

FRANCISCO GÁLVEZ CARAVACA  
[ctcgalvez@ctnc.es](mailto:ctcgalvez@ctnc.es)  
I.S.S.N. 1577-5917

**DEPÓSITO LEGAL**

MU-595-2001

**PRODUCCIÓN TÉCNICA**

S.G. FORMATO, S.A.

El Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación no se hace responsable de los contenidos vertidos en los artículos de esta revista.



# Contenidos

## PRESENTACION

### 3 Agrocisic: dos años de impulso a la transferencia de resultados de investigación

Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación del CTC

## INSTITUTO DEL FRÍO

### 8 Incorporación de fibra dietética a productos pesqueros reestructurados: una posibilidad

Isabel Sánchez, Miriam Pérez-Mateos y A. Javier Borderías. Instituto del Frío. CSIC. Madrid.

### 12 Productos cárnicos funcionales preparados con nuez. Parte 1.

Francisco Jiménez Colmenero. Instituto del Frío (CSIC). Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. Begoña Olmedilla. Hospital Universitario Puerta de Hierro. San Martín de Porres, 4. 28035 Madrid.

### 16 Desarrollo de derivados cárnicos funcionales preparados con nuez. Parte 2.

Francisco Jiménez Colmenero. Instituto del Frío (CSIC). Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. Begoña Olmedilla. Hospital Universitario Puerta de Hierro. San Martín de Porres, 4. 28035 Madrid.

### 22 Productos cárnicos funcionales preparados con nuez. Evaluación del efecto funcional. Parte 3.

Olmedilla Alonso, B; Granado Lorenzo, F; Herrero Barbudo, C; Blanco Navarro, I; y Sánchez-Muniz, FJ1 (en representación del equipo investigador2 del subproyecto 3 de MCYT. AGL2001-2398-C03-03) Unidad de Vitaminas. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid.  
e-mail: bolmedilla.hpth@salud.madrid.org  
1Dpto de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. e-mail: frasan@farm.ucm.es

### 27 Leches fermentadas probióticas

Teresa Requena, Carolina Janer y Carmen Peláez. Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos. Instituto del Frío (CSIC). Madrid.

72



### 31 Acrilamida ¿un riesgo para la salud del consumidor?

Francisco J. Morales y José Ángel Rufián. Instituto del Frío. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

### 37 Congelación de alimentos bajo alta presión

Sanz, P.D.; Otero, L.; Molina-García, A.D.; Guignon, B.; Fernández, P.P. y Aparicio, C. Instituto del Frío (CSIC). 28040 Madrid.

## INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

### 44 Influencia de la materia prima y el proceso de fabricación en la generación enzimática de componentes responsables del aroma y sabor del jamón curado.

Fidel Toldrá Vilardell. Profesor de Investigación del CSIC, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). Valencia.

### 49 La nueva biotecnología apuesta por la vinificación

Paloma Manzanares y Margarita Orejas. Departamento de biotecnología de alimentos, Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Apartado de correos 73, 46.100 Burjassot. Valencia.

### 56 El análisis sensorial en el control y aseguramiento de la calidad de los alimentos: una posibilidad real

Elvira Costell. Laboratorio de propiedad físicas y sensoriales. IATA. CSIC. Aptdo. 73. 46100 Burjassot. Valencia. E-mail: ecostell@iata.csic.es.

## INSTITUTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS

### 66 Modificación de propiedades probióticas y tecnológicas en microorganismos del género Bifido bacterium como consecuencia de la adquisición de resistencia a sales biliares

Clara G. de los Reyes-Gavilán, Abelardo Margolles, Patricia Ruas-Madiedo, Luis Noriega, Borja Sánchez e Isabel Cuevas. Instituto de Productos Lácteos de Asturias. CSIC. Carretera de Infiesto s/n. 33300 Villaviciosa. Asturias.

### 71 Queso artesanal probiótico: un ejemplo de queso funcional

Fernanda Fernández, Covadonga Barbés. Área de Microbiología. Unidad Asociada del CSIC. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. Campus del Cristo, s/n. 33006 Oviedo. Ana Rodríguez. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). 33300 Villaviciosa, Asturias.

### 77 Técnicas microbiológicas novedosas para caracterizar productos fermentados tradicionales

Baltasar Mayo y Ana Belén Flórez. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC). Carretera de Infiesto, s/n. 33.300 Villaviciosa. Asturias. E-Mail: baltasar.mayo@ipla.csic.es



### 84 Las aminas biógenas en los alimentos

María Fernández y Miguel A. Álvarez. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC). Carretera de Infiesto, s/n. 33.300 Villaviciosa. Asturias.

INSTITUTO DE LA GRASA

### 92 Aceituna de Mesa: de la fermentación tradicional a la utilización de cultivos iniciadores

José Luis Ruiz Barba y Rufino Jiménez Díaz. Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Avda. Padre García Tejero, 4. Apto. 1048. 41012 Sevilla.

### 96 Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional

Javier Vioque y Francisco Millán. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Instituto de la Grasa (Sevilla). de Alimentos. Instituto de la Grasa (CSIC). Sevilla.

### 103 Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud

Javier Vioque y Francisco Millán. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Instituto de la Grasa (Sevilla).

### 108 Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples "colorantes" naturales

María Isabel Mínguez Mosquera, Antonio Pérez Gálvez y Dámaso Hornero Méndez. Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos. Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa (CSIC). Sevilla

### 115 Características químicas nutricionales y funcionales de los alimentos

María Isabel Mínguez Mosquera, Antonio Pérez Gálvez. Grupo de química y bioquímica de pigmentos. Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa (CSIC). Sevilla.

### 125 Nuevos aceites de girasol: el futuro para una industria alimentaria más saludable

Enrique Martínez Force y Rafael Garcés Mancheño. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Instituto de la Grasa (Sevilla).

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES

### 132 Complementos alimenticios antioxidantes: beneficios y precauciones

Begoña Bartolomé Sualdea. Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC. Juan de la Cierva, 3. 28006 Madrid.

CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA

### 138 Constituyentes Anticancerígenos de la Dieta Mediterránea

Juan Carlos Espín. Grupo de Investigación en Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CEBAS-CSIC.

### 146 Nuevas Tendencias de Procesado y Conservación de Alimentos Vegetales de IV Gama

María Isabel Gil, Ana Allende, David Beltrán y Victoria Selma. Grupo de Investigación en calidad, seguridad y bioactividad de alimentos vegetales. Departamento de ciencia y tecnología de alimentos. CEBAS-CSIC.

INSTITUTO INVESTIGACIONES MARINAS

### 154 Identificación de especies pesqueras mediante ADN

Ricardo I. Pérez Martín, Carmen González Sotelo. Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC).

INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL

### 162 Hacia el desarrollo de técnicas analíticas rápidas para la detección de tóxicos y contaminantes en alimentos

L. Ramos, M.J. González. dpto. Análisis Instrumental y Química Ambiental. IQOG, CSIC, Juan de la cierva, 3. 28006 Madrid. En colaboración con el Instituto del Frío. J. Fontecha. Dpto. Ciencia y Tecnología de los Productos Lácteos, IF, CSIC, José Antonio Novais,10. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y AMBIENTALES

### 168 Procesos para la obtención de aditivos alimentarios a partir de residuos de la industria agroalimentaria gallega

Medina, I., Torres, J.L., Núñez, M.J. Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC, Vigo). Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Santiago de Compostela. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales (CSIC, Barcelona)

RESEÑAS

### 176 Referencias legislativas



# Ciclos Formativos de Industrias Alimentarias y Química Ambiental

Curso 2004-2005

Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias.

## Molina de Segura

Avda. Gutiérrez Mellado, 17.



968 64 33 99

*Técnico en Conservería Vegetal, Cárnica y de Pescado.*

*Técnico en Matadero y Carnicería-Charcutería.*

*Técnico Superior en Industria Alimentaria.*

*Técnico Superior en Química Ambiental.*

- Formación de contenido exclusivo tecnológico-práctico.
- Prácticas obligatorias en empresas.
- Acceso a estudios superiores.
- Títulos de Técnico (grado medio) y Técnico Superior (grado superior) que permiten la inserción laboral como trabajadores cualificados, técnicos especialistas o cuadros intermedios.
- Alto índice de ocupación.
- Acceso a créditos oficiales.
- Servicio opcional de comedor y residencia.
- Becas según convocatoria general.

*Consulte Otras Ofertas Formativas*

*Del Programa Regional de Formación y Cualificación Profesional Agroalimentaria.*



Región de Murcia  
Consejería de Agricultura, Agua  
y Medio Ambiente

Unión Europea  
Fondo Social



# Instituto *del* Frío

Incorporación de fibra dietética  
a productos pesqueros  
reestructurados: una  
posibilidad



Productos cárnicos  
funcionales preparados con  
nuez. Parte 1.

Desarrollo de derivados  
cárnicos funcionales  
preparados con nuez. Parte 2.



Productos cárnicos  
funcionales preparados con  
nuez. Evaluación del efecto  
funcional. Parte 3.

Leches fermentadas  
probióticas



Acrilamida ¿un riesgo para la  
salud del consumidor?

Congelación de alimentos bajo  
alta presión



# Incorporación de fibra dietética a reestructurados: una posibilidad

ISABEL SÁNCHEZ, MIRIAM PÉREZ-MATEOS y A. JAVIER BORDERÍAS. INSTITUTO DEL FRÍO. CSIC. MADRID.

Un producto se denomina reestructurado cuando se le trocea o pica y después conjuntamente con ingredientes o sin ellos, se crea una estructura diferente que va a dar una nueva apariencia y una nueva textura. En los últimos años se ha desarrollado una nueva generación de productos pesqueros llamados análogos, o sucedáneos, que imitan en su mayoría a mariscos u otros productos de alto precio, que no sólo han ganado la popularidad de los habitantes del lejano oriente, sino que han sido ampliamente aceptados por los norteamericanos y más recientemente por los europeos. Estos productos se fabrican fundamentalmente a partir de “*surimi*”, que es pescado picado, muy lavado y refinado. La razón de reestructurar músculo de pescado la encontramos al considerar que los productos pesqueros nobles son limitados y muchos se están agotando por razón de una fuerte sobreexplotación, por lo que existen pocas opciones que no pasen por la utilización de las especies tradicionalmente poco o nada comercializadas. Una de las mayores ventajas de los productos reestructurados es la posibilidad de modificación de la composición del producto final mediante la reformulación del producto original que ha sido previamente troceado o picado. En este sentido se podría hablar de la eliminación de unos constituyentes o de la incorporación de otros nuevos ingredientes o aditivos. Desde el punto de vista tecnológico, estos productos, ingredientes o aditivos, se pueden dividir en los que: A/ favorecen la conservación, B/ son ingredientes funcionales desde el punto de vista tecnológico y C/ son funcionales desde el punto de vista nutracéutico. Hay varios tipos de ingredientes que cumplen más de una de estas funciones, como es el caso de la fibra dietética. Existen multitud de referencias bibliográficas, e incluso muchos productos en el mercado, como productos lácteos, cárnicos, de pastelería etc., sin embargo apenas existen

referencias a productos pesqueros con adición de fibra dietética.

Se designan bajo el título de fibra alimentaria, elementos animales, como los quitosanos (derivado de la quitina que se halla de forma natural en el exoesqueleto de crustáceos), o vegetales que aun figurando en la alimentación humana, no son degradados por los enzimas digestivos.

## Utilización de fibra en miosistemas reestructurados por su aptitud tecnológica

Las fibras presentan diversas propiedades en función de su composición y de su granulación. Su interés es básicamente nutracéutico, aunque también actúan como elementos funcionales desde el punto de vista tecnológico, para lo cual es necesario optimizar su forma de introducción. Las fibras pueden presentar un gusto particular dependiendo de su origen, lo cual puede presentar una ventaja o un inconveniente, aunque diferentes técnicas de extracción permiten obtener fibras con sabores bastante neutros. El color también va a estar en función de su origen, aunque se puede modificar. De manera general, la fracción mayoritaria de las fibras es insoluble, pero retienen agua de forma eficaz, entre 3 y 6 veces su peso. Las fibras, dependiendo de su tamaño de gránulo, pueden comunicar a los productos una textura excesivamente áspera, aunque esto se puede evitar haciendo que el tamaño de partícula sea muy pequeño.

Apenas existen productos pesqueros con fibra alimentaria añadida, especialmente con fibras con alto contenido, sin embargo las fibras vegetales han sido extensivamente utilizada en productos cárnicos picados, especialmente como reemplazante textural de grasas. La mayoría de las fibras vegetales utilizadas son procedente de cereales, pero también han sido utilizadas a partir de altramuces, arroz, guisantes, bambú y frutas. El interés tecnológico de su utilización es, fundamentalmente, como sustitutivo de la untuosidad



que provocan las grasas, retener agua, disminuir la pérdida de rendimiento después del cocinado y retener la forma del producto después del cocinado. En relación con las fibras procedentes de frutas, su uso podría ser muy interesante debido al equilibrio entre fracciones soluble e insoluble y a las propiedades antioxidantes de algunas de ellas, como es el caso de la de mango y la de uva. Este poder antioxidante tendría el doble efecto de servir como un factor de salud para la persona que la ingiera y el de evitar el enranciamiento del producto con el que se mezcla; por esto, y dada la alta capacidad de oxidación de las grasas de pescado que son muy insaturadas, sería muy interesante su incorporación en productos pesqueros. La forma de introducción podría ser, tanto por inyección en filetes o por su incorporación en productos reestructurados. Respecto del quitosano, presenta múltiples propiedades tecnológicas en alimentación; entre cabe destacar su poder antimicrobiano, capacidad de formación de películas protectoras, como texturizante y como antioxidante.

# productos pesqueros



## Utilización de fibra en miosistemas reestructurados por su acción nutraceutica

La necesidad de alimentarse que el ser humano tiene, junto a la relevancia alcanzada por los temas relacionados con la salud en las sociedades ricas, e incluso en los países en desarrollo, han llevado a un primer plano el interés de la sociedad por los posibles efectos saludables de los alimentos. Son bastantes los experimentos científicos que avalan la relación entre el consumo de determinados alimentos y el desarrollo de enfermedades. En opinión de expertos, las más importantes enfermedades crónicas que afectan a la sociedad occidental pueden estar relacionadas, en parte, con la dieta alimenticia: cáncer, obesidad, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, etc. En este sentido se han puesto de manifiesto los efectos beneficiosos de ingredientes específicos capaces de desempeñar un papel importante en la prevención e incluso en el tratamiento de tales enfermedades. Entre estos productos caben mención especial: aceites de

pescado, betacarotenos, colina, zinc, fibra dietética, etc. El caso del pescado, constituye un buen ejemplo de alimento "nutracéutico" en sí, ya que es la fuente de uno de estos productos, como es el aceite de pescado. Además contiene una proteína fácilmente digestible lo que hace de este alimento ideal para personas delicadas. Sin embargo, un alimento tan bueno sería más completo con la presencia de fibra alimentaria. El hecho de añadir fibra a productos pesqueros, que en principio no contienen, podría parecer poco adecuado cuando se mantiene una dieta equilibrada que contenga además del pescado frutas, verduras y legumbres. Sin embargo, la realidad nos indica que poblaciones extensas de niños y adolescentes de Europa Occidental, consumen productos básicamente proteicos o grasos, pero apenas ingieren alimentos que les aporte la fibra en la cantidad necesaria.

La fibra alimentaria ni se degrada ni se asimila por parte del organismo, solamente transitan por el tracto digestivo sin aportar ni aporte de energía ni de nu-

trientes. Sin embargo, su papel es fundamental, ya que permite regular el tránsito intestinal, tener un efecto favorable sobre el metabolismo de glúcidos y lípidos, facilita la eliminación de sales biliares y, a algunas, se le atribuye el efecto de disminuir la tasa de colesterol sanguíneo y de disminuir el cáncer de colon. Los quitosanos actúan además como reductor de la absorción intestinal de lípidos y como agente hipocolesterolémico, por lo que disminuye la obesidad que es uno de los principales problemas socio-sanitarios de los países occidentales, que además puede favorecer el riesgo en otras enfermedades (diabetes Mellitus, problemas cardiovasculares, cáncer, etc.).

## Estudios llevados a cabo sobre la incorporación de la fibra dietética a productos pesqueros reestructurados

Como se ha dicho más arriba, apenas existen referencias bibliográficas de la incorporación de fibras derivadas de frutas, a productos pesqueros y tampoco son conocidos por los autores productos

pesqueros en el mercado que las posean. Sin embargo, tanto desde el punto de vista tecnológico como nutricional su utilización parece muy interesante, sin contar con la instrumentalización, a nivel de marketing, que se pudiese hacer. Por estas razones, investigadores del Instituto del Frío del Consejo Superior de Investigaciones Científicas trabajan en la posibilidad de introducir estas fibras en productos pesqueros reestructurados gelificados y no gelificados y estudian las implicaciones tecnológicas y nutracéuticas que ello conlleva.

Se han realizado varios estudios sobre inclusión de fibra dietética mayoritariamente insoluble, en productos pesqueros reestructurados. Se han estudiado dos tipos de fibra con diferentes orígenes, fibra de trigo y fibra de uva (con capacidad antioxidante).

En el caso de la fibra de trigo, se está experimentando en tres tipos de productos reestructurados: geles a partir de surimi de abadejo, pescado blanco (merluza) picado y productos elaborados a partir de trozos de filetes. La fibra de trigo se ad-

cionó en proporciones de hasta el 6% y su incorporación, apenas supone modificación de la apariencia. La ventaja tecnológica más relevante de esta fibra es la capacidad de ligar agua, con lo que además de poder adicionar agua a los productos reestructurados, el agua queda ligada más eficientemente incluso después del cocinado. Así mismo, la textura de los productos reestructurados cambia, lo que puede interesar, sobre todo, en el caso del surimi para disminuir la sensación de gomosidad de los productos gelificados.

Actualmente se está comenzando a trabajar con otros tipos de fibras, como la de uva, en busca de propiedades complementarias a las anteriores, como va a ser el poder antioxidante, es decir, que tengan acción de inhibir la oxidación de las grasas de pescado, altamente insaturadas, con lo que podrá prolongar su tiempo de conservación y se obtendrán productos con mejor sabor. De hecho los experimentos realizados hasta ahora, demuestran la confirmación de la hipótesis.

Además se va a seguir estudiando la acción de otras fibras como es el caso de

la de algunas especies de algas. Su finalidad es, además de todas las características nutracéuticas y tecnológicas expuestas, incluida la capacidad antioxidante, la de aportar yodo, elemento que del que es deficitaria la población europea. ■

## AgroCSIC

*El objetivo de la introducción de fibra dietética en productos pesqueros es doble, por un lado para añadir valor "saludable" al pescado y por otro para que dicha fibra cumpla una función de "conservante" natural en los productos que se van a conservar en estado congelado.*

CENTRO DEL CSIC: Instituto del Frío. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, web: [www.csic.es/ifrio](http://www.csic.es/ifrio)

Departamento: Ciencia y Tecnología de Carnes y Pescados.

Nombre Investigador: Profesor A. Javier Borderías.

E-mail: [jborderias@if.csic.es](mailto:jborderias@if.csic.es)

Tendencias de Investigación:

- Valoración de productos pesqueros.
- Desarrollo de productos pesqueros.
- Desarrollo de nuevos procesos en productos pesqueros.
- Calidad de productos derivados de pesca.

## NUEVA GENERACIÓN DE FOTÓMETROS NOVA



### Nuevo sistema de ópticas

- Sin partes mecánicas ni móviles.
- Filtros en técnica diodo array con rayo de referencia.
- Todo controlado por un completo software.

## DISTRILAB



DISTRIBUIDORES PARA LABORATORIOS, S.L.

e-mail: [distrilab@retemail.es](mailto:distrilab@retemail.es)  
Telf. 968 50 66 48 - Fax 968 52 99 01  
Av. Berlín - H - 3 Políg. Ind. Cabezo Beaza  
30395 CARTAGENA (Murcia)

### La revolución en el análisis del agua

- Sencilla operación con función AUTO-SELEC (código de barras).
- Portátil, con batería incorporada (opcional).
- Fácil actualización de nuevos métodos mediante un Memochip.
- Medidas simultáneas para correcciones de turbidez.
- Sistema incorporado de Control de Calidad. Análítico Conformidad GLP.

### 2 modelos

- NOVA 30: • 6 filtros.  
• Sólo acepta tests Spectroquant en cuberas.  
• No es programable con nuevos métodos.
- NOVA 60: • 12 filtros.  
• Acepta test Spectroquant en cubetas y reactivos.  
• Programable con nuevos métodos.

# TECNOLOGÍA INDUSTRIAL GARCÍA



el reto de avanzar con los  
progresos tecnológicos e  
industriales de su empresa

diseño de sistemas industriales

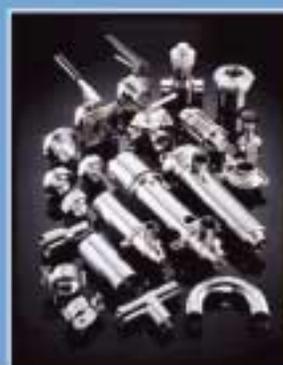
tecnoevolución

servicio postventa

cursos de formación



servicios  
y suministros  
industriales



PROVEEDOR OFICIAL EXCLUSIVO  
PARA LA REGIÓN DE MURCIA DE:



GZ POMPE INDUSTRIALI INOX  
Fabricación de bombas

CAINOX

NORGREN

KAESER

TASSALINI

CUNAT

TECNOLOGIA INDUSTRIAL GARCÍA, S.L.  
Ctra. de Madrid km. 377 - Pol. Ind. El Tapiado  
Apdo. 350 • 30500 Molina de Segura (Murcia)



Tfno. 968/611739 • 968/640948 • Fax 968/640948 • <http://www.tecnologia-industrial.com>

# Productos cárnicos funcionales

FRANCISCO JIMÉNEZ COLMENERO. INSTITUTO

*“Un alimento funcional es aquel que, más allá de su valor nutricional habitual, ha demostrado satisfactoriamente tener un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas en el organismo en una forma que resulta relevante para mejorar el estado de salud y bienestar y/o para la reducción de riesgo de enfermedad.” (Diplock et al., 1999)*

## Introducción

Tradicionalmente, los alimentos han sido elementos de una dieta encaminada a proveer cantidades adecuadas de nutrientes esenciales capaces de satisfacer los requerimientos metabólicos necesarios, y proporcionar satisfacción y bienestar al consumidor. Sin embargo, en los últimos años la situación está cambiando, entre otras razones, por la cada vez más evidente relación entre la salud y diversos elementos que conforma el estilo de vida (estrés, actividad física, consumo de alcohol y tabaco, atención médica, etc.), entre los que tienen un papel destacado la dieta. Según un reciente informe de la Organización Mundial de la Salud, diversos aspectos dietéticos junto con otros relacionados con el estilo de vida (actividad física, consumo de alcohol y tabaco) son los principales factores de riesgo modificables en relación con el desarrollo de diversas enfermedades entre las que están las cardiovasculares y el cáncer (WHO, 2003). Determinados patrones de consumo, en general el exceso de ciertos nutrientes, se han relacionado con el origen y el desarrollo de diversas enfermedades, siendo observaciones de este tipo las que dieron lugar, en los países desarrollados, a la evolución del concepto de “nutrición adecuada” al de “nutrición óptima”, que conlleva una serie de recomendaciones dietéticas para modificar (reducir o aumentar) el consumo de determinados alimentos o sus componentes, así como el desarrollo de nuevos alimentos modificando su composición original, tanto respecto a su contenido en nutrientes como en no-nutrientes. Todo ello encaminado a optimizar funciones fisiológicas a fin de maximizar su contribución al bienestar y la salud, y minimizar el riesgo de enfermedades. En este contexto surgen los de-

nominados *alimentos funcionales* que en la actualidad constituyen un mercado en alza y uno de los principales impulsores del desarrollo de nuevos productos, entre ellos los de origen cárnico.

Hoy día todavía no existe una definición universalmente aceptada, aunque de acuerdo a un reciente consenso científico europeo “un alimento funcional es aquel que, más allá de su valor nutricional habitual, ha demostrado satisfactoriamente tener un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas en el organismo en una forma que resulta relevante para mejorar el estado de salud y bienestar y/o para la reducción de riesgo de enfermedad.” (Diplock et al., 1999). Un alimento funcional puede ser un alimento natural o transformado en los que mediante procedimientos tecnológicos o biotecnológicos se han producido alguna de las siguientes modificaciones: a) eliminación/reducción de algún componente con efectos fisiológicos negativos, b) aumento de la concentración de algún componente naturalmente presente (nutriente o no) hasta unos niveles que produzcan efectos beneficiosos, c) incorporación de un componente potencialmente beneficioso (macro o micronutriente) que no se encuentre naturalmente presente en el alimento, d) sustitución de algún componente con efectos fisiológicos negativos por otro con efectos fisiológicos beneficiosos, e) modificación de la naturaleza o biodisponibilidad de uno o más componentes encaminados a producir efectos beneficiosos, y f) combinaciones de estas posibilidades.

## Carne y productos cárnicos como alimentos funcionales

La carne y productos cárnicos son elementos esenciales de la dieta que concentran y proporcionan gran número de



nutrientes (proteína, grasa, vitaminas, minerales). Tradicionalmente, la carne ha venido siendo un alimento de gran valor nutricional muy apreciado, cuyo consumo era relacionado con buena salud y prosperidad. Sin embargo, la situación ha cambiado en los últimos años, debido entre otras razones, a las asociaciones entre la carne y sus derivados o varios de sus constituyentes y el riesgo de algunas de las enfermedades más importantes de nuestra sociedad (cardiovasculares, cáncer, hipertensión y obesidad). Si bien es cierto que en ocasiones y en determinados ámbitos, la información manejada

# preparados con nuez. **Parte 1.**

DEL FRÍO (CSIC). CIUDAD UNIVERSITARIA. 28040 MADRID. BEGOÑA OLMEDILLA. HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO. SAN MARTÍN DE PORRES, 4. 28035 MADRID.



acerca de las implicaciones de la carne en la salud no siempre resulta correcta, no cabe duda de que el sector cárnico puede realizar diversos esfuerzos (y así le está siendo reclamado a distintos niveles) para modificar su composición y poner a disposición del consumidor productos más saludables.

Aunque la inmensa mayoría de las sustancias fisiológicamente activas identificadas proceden de las plantas, algunas también pueden ser localizadas en la carne y sus derivados. Al margen de que varias de ellas están presentes de manera natural, en muchos casos, cabe la posibi-

lidad de modificar su composición a conveniencia la composición de estos alimentos alterando el contenido de algunos compuestos (de origen tanto endógeno como exógeno) en razón de sus efectos potenciales (beneficiosos o no) sobre el organismo (Jiménez Colmenero, 2004).

Las estrategias para modificar cuali y/o cuantitativamente la composición de la carne y sus derivados con propósitos “funcionales”, son de varios tipos: a nivel de **producción animal** (genéticas y nutricionales), asociadas a la **selección** de carne y derivados, y dependientes de los sistemas de transformación (**prepara-**

**ción de materias primas cárnicas, reformulación y procesado**) y condiciones de **consumo**.

Estrategias genéticas y nutricionales se han empleado para alterar la composición de la canal, y por tanto la de los cortes comerciales disponibles. Su aplicación ha hecho posible: reducir el nivel de grasa y colesterol, alterar el perfil de ácidos grasos, e incrementar la presencia de antioxidantes y minerales. Los avances en distintas áreas del conocimiento están abriendo nuevas posibilidades.

Los procesos de transformación de la carne permiten actuar de varias maneras



para promover el carácter funcional de los derivados cárnicos. La principal forma de modificar la composición de los derivados cárnicos surge de la enorme posibilidad de introducir cambios en los ingredientes (cárnicos y no cárnicos) utilizados en su elaboración y, en consecuencia, sobre diversos compuestos bioactivos de carácter endógeno y exógeno. Básicamente responde a tres ideas clave incluidas en la definición de alimento funcional: reducción de la concentración de ciertos componentes con efectos fisiológicos negativos, sustitución de algún componente con efectos no deseados por otro con efectos beneficiosos e incorporación de compuestos bioactivos exógenos con efectos beneficiosos (Jiménez Colmenero, 2004). Ya que la mayor parte de las sustancias fisiológicamente activas proceden de las plantas, su combinación con otros alimentos, como por ejemplo, los derivados cárnicos puede contribuir a dotarles de potenciales efectos funcionales. La idea de emplear productos de origen vegetal en la industria cárnica no es nueva ya que se han utilizado distintos tipos de ingredientes con propósitos tecnológicos, sensoriales, económicos y nutricionales. En tal sentido y por sus características especiales, la nuez abre interesantes expectativas en el desarrollo de productos cárnicos funcionales.

### Productos cárnicos funcionales con nuez

La cardiopatía isquémica continúa siendo la causa principal de muerte en los países desarrollados. Estudios epidemiológicos han señalado que el consumo frecuente de frutos secos, en general y de nueces en particular, está inversamente

relacionado con el riesgo de infarto de miocardio, independientemente de otros factores de riesgo como edad, sexo, tabaco, hipertensión, peso y ejercicio (Fraser *et al.*, 1992; Sabaté, 1993; Iwamoto *et al.*, 2000, entre otros).

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo, los efectos positivos de la nuez han sido atribuidos, al menos en parte, a su peculiar composición lipídica, caracterizada por presentar un elevado contenido graso (62-68%) y ser rica en ácidos grasos monoinsaturados (18% de ácido oleico en relación con el total de ácidos grasos) y poliinsaturados (linoleico y  $\alpha$ -linoléico que constituyen el 58 y 12%, respectivamente del total de ácidos grasos). A esto hay que añadir la presencia de otros componentes de interés: fibra (5-10%), proteína (14%) rica en arginina, vitaminas, minerales, fitosteroles, polifenoles, etc. (Sabaté, 1993; Ravai, 1995). Las evidencias acerca del papel beneficioso de la ingestión de nueces en la salud ha motivado que recientemente se esté insistiendo sobre la importancia de incluirlas regularmente en la dieta. En este contexto, la Agencia Alimentaria de Estados Unidos (FDA) ha aprobado que las nueces, con carácter general, puedan ser anunciadas como alimentos que tienen propiedades funcionales en cuanto a la reducción del riesgo de enfermedades coronarias. En concreto se puede indicar que "investigaciones no concluyentes avalan que el consumo de 42,5 gramos de nueces al día como parte de una dieta baja en ácidos grasos saturados y colesterol, y no provocando un incremento de la ingesta global de calorías, podría reducir el riesgo de enfermedades coronarias" (FDA, 2003).

A pesar de tan notables ventajas, en general el consumo de nuez está por debajo de lo recomendado, ya que muy pocas personas son capaces consumirlas en cantidades suficientes de forma sistemática y durante largos periodos de tiempo. Una manera de favorecer su ingestión sería incorporarla como ingrediente en alimentos de consumo frecuente, caso de los derivados cárnicos, a los que puede dotar de la presencia de diversos compuestos bioactivos que le confieren un carácter más cardiosaludable (Jiménez Colmenero *et al.*, 2001; Sánchez-Muniz, 2004). La idea de obtener alimentos cárnicos funcionales con nuez está siendo abordada al amparo de un proyecto del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I), Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2001-2398-C03) por investigadores del Instituto del Frío (CSIC), de la Facultad de Farmacia (UCM) y del Hospital Universitario Puerta de Hierro. En el cual se están llevando a cabo diversos ensayos encaminados tanto al desarrollo de los productos cárnicos reformulados con nuez como al estudio de biodisponibilidad y valoración de su impacto sobre marcadores intermedios de riesgo cardiovascular.

Esta concepción global (tecnológica y nutricional), plantea distintos tipos de desafíos:

- Diseño y desarrollo de productos cárnicos con propiedades funcionales de carácter cardiosaludables. Esto supone un reto tecnológico teniendo en cuenta que se propone elaborar derivados cárnicos de diseño, con propiedades preestablecidas en relación con aspectos sensoriales, nutricionales, tecnológicos, higiénicos y de conveniencia, sin olvidar que existen



aspectos no relacionados con la calidad intrínseca del producto, que condicionan su valoración y grado de aceptación.

- Evaluación de la biodisponibilidad de los nutrientes incorporados a dosis de ingesta compatibles con una dieta equilibrada. La mayoría de los estudios realizados hasta ahora han utilizado compuestos aislados (extractos naturales, preparaciones farmacológicas) y dosis difícilmente aportadas por una dieta variada.

- Evaluación del impacto del consumo regular de este nuevo alimento por sujetos en riesgo (grupo "diana") sobre marcadores intermedios de exposición, función e indicadores de riesgo relevantes de enfermedad cardiovascular. Así como la sus-

ceptibilidad de respuesta individual a la intervención dietética realizada mediante análisis de polimorfismos genéticos.

Los estudios realizados han conducido al desarrollado de diversos derivados cárnicos reformulados para contener diversos compuestos bioactivos cardiosaludables incorporados mediante la adición de nuez (Patente nº 200300367). Las condiciones de preparación y características de los productos formulados con nuez incorporada han sido descritas en varias publicaciones, resultando productos con propiedades físico-química y sensoriales adecuadas. Desde el punto de vista funcional, la principal ventaja de estos elaborados cárnicos radica en la valoración de su potencial efecto benefi-

cioso para la salud mediante estudios en humanos, debido a que, por un lado tienen limitada la presencia ciertos compuestos no deseados (ej. grasa animal), y por otro incorporan una combinación compleja de compuestos bioactivos (ej. gamma-tocoferol) con actividades y efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico en suero y otros factores de riesgo en el origen y desarrollo de patologías cardiovasculares.

Los productos cárnicos que están siendo empleados para valorar su efecto funcional en humanos son filetes reestructurados y salchichas tipo frankfurt conteniendo un 20% de nuez, lo que conlleva niveles de grasa próximos al 13% (> 85% de la nuez). Esto supone que el consumo de 150 g de cualquiera de esos derivados proporciona ca. 70% de la cantidad diaria de nuez sugerida como adecuada para contribuir a disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (FDA, 2003).

## Bibliografía

Diplock, A. T., Agget, P. J., Ashwell, M., Bernet, F., Fern, E. B. y Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. *British J. Nutr.* 81 (S1): S1-S27.

Iwamoto, M., Sato, M., Kono, M., Hirooka, Y., Sakai, K., Takeshita, A. y Imaiuzumi, K. (2000). Walnuts lower serum cholesterol in Japanese men and women. *J. Nutr.*, 130 (2), 171-176.

FDA. (2003). Food and Drug Administration. Office of Nutritional Products, Labeling and Dietary Supplements. Qualified Health Claims: Letter of Enforcement Discretion.- *Walnuts and Coronary Heart Disease*, (Docket No 02P-0292), July 14.

Fraser, G. E., Sabaté, J., Beeson, W. L., & Strahan, T. M. (1992). A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. *Archives of Internal Medicine*, 152(7), 1416-1424

Jiménez Colmenero F. (2004). Estrategias tecnológicas en el desarrollo de productos cárnicos funcionales. En: *La Carne y Productos Cárnicos como Alimentos Funciona-*

*les*. Editado por F. Jiménez Colmenero, F. J. Sánchez-Muniz and B. Olmedilla, Madrid. edittec@red. p 75-90.

Jimenez Colmenero, F., Carballo, J. y Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: Their role as functional foods. *Meat Sci.* 59:5-13.

Ravai, M. (1995). California walnuts. The natural way to healthier heart. *Nutr. Today*, 30: 173-173.

Sabaté, J., Fraser, G.E., Burke, K., Knutsen, S., Bennett, H., Lindsted, K.D. (1993). Effects of walnuts on serum lipids levels and blood pressure in normal men. *New England Journal of Medicine*. 328: 603-607.

Sánchez-Muniz, F. (2004). Alimentos funcionales: carne y derivados cárnicos. Presente y perspectivas. En: *La Carne y Productos Cárnicos como Alimentos Funcionales*. Editado por F. Jiménez Colmenero, F. J. Sánchez-Muniz and B. Olmedilla, Madrid. edittec@red. p 39-58.

WHO. (2003). *Diet, Nutrition and the Prevention of chronic diseases*. WHO Technical report Series 916. ■

**AgroCSIC**

**CENTRO DEL CSIC:** Instituto del Frío.  
**Departamento:** Ciencia y Tecnología de Carne y Productos Cárnicos y del Pescado y Productos de la Pesca.  
**Nombre Investigador:** F. Jiménez Colmenero.  
**E-mail:** fjimenez@if.csic.es  
**Tendencias de Investigación:**

- Desarrollo de productos cárnicos funcionales.
- Aplicación de nuevos procesos en productos cárnicos.
- Evaluación de la calidad de carne y productos cárnicos.
- Conservación de carne y productos cárnicos.

# Desarrollo de derivados cárnicos funcionales preparados con nuez. **Parte 2.**

F. JIMÉNEZ COLMENERO, J. CARBALLO, S. COFRADES, A. SERRANO Y J. AYO.  
INSTITUTO DEL FRÍO (CSIC). CIUDAD UNIVERSITARIA. JOSÉ ANTONIO NOVAIS, 10. 28040 MADRID.





En un artículo publicado anteriormente (Jiménez Colmenero y Olmedilla, 2004) se ha expuesto cómo la utilización de nuez abre interesantes expectativas en el desarrollo de productos cárnicos funcionales. Así mismo se describió cómo las investigaciones llevadas a cabo al respecto, están siendo abordadas al amparo de un proyecto (AGL2001-2398-C03) en el que se encuentran implicados investigadores del Instituto del

Frío (CSIC), de la Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid) y del Hospital Universitario Puerta de Hierro. Los objetivos planteados en dicho proyecto abarcan aspectos relacionados tanto con la tecnología de elaboración de los productos cárnicos reformulados con nuez, como con el estudio de biodisponibilidad y valoración de su impacto sobre marcadores intermedios de riesgo cardiovascular.

Dentro de este planteamiento el equipo investigador del Instituto del Frío ha sido el encargado de abordar el primer objetivo centrado en el desarrollo tecnológico de los productos cárnicos formulados con nuez, los cuales han de responder a todos aquellos requerimientos exigibles a cualquier otro derivado cárnico. Los estudios realizados al respecto han conducido al desarrollo de diversos derivados cárnicos reformulados por un lado, para limitar la presencia de algunos componentes (grasa de origen cárnico, sal), y por otro para favorecer el contenido de diversos compuestos bioactivos cardiosaludables incorporados mediante la adición de nuez. Basado en este tipo de estrategias se han desarrollado dos tipos de productos con características bien diferenciadas: **filetes reestructurados** y **salchichas tipo frankfurt** (sistemas gel/ emulsión).

Las condiciones de preparación y características de los productos formulados con nuez han sido descritas en varias publicaciones. Este artículo recoge un breve resumen de los estudios llevados a cabo enfatizando el impacto de distintas variables sobre la composición, y las caracte-

rísticas fisicoquímicas y sensoriales de los productos en función de diversos factores. La valoración del efecto funcional (realizada por otros miembros del equipo investigador) será expuesta en una próxima publicación.

### FILETES REESTRUCTURADOS

La tecnología de reformulación hace posible la obtención de derivados cárnicos con importantes ventajas para consumidores e industria. De especial interés resulta su aplicación en el ámbito de los reestructurados cárnicos que ofrecen una excelente oportunidad al representar una gama de alimentos capaces de reunir todas las expectativas y necesidades del consumidor. Por otro lado permiten la posibilidad de alterar su composición e incorporar compuestos biológicamente activos con efectos beneficiosos para la salud (alimentos funcionales). Esto, unido a su apariencia de producto mínimamente procesado (filete) y a la aptitud para realizar diseños especiales dirigidos a segmentos de población muy específicos (a nivel de composición y propiedades sensoriales), no deja la menor duda acerca de sus posibilidades comerciales. No

parece posible encontrar en el sector cárnico ningún otro tipo de derivado que satisfaga de manera conjunta los citados requerimientos.

A continuación se resumen algunos de los factores estudiados en relación con los procesos tecnológicos de elaboración de los productos cárnicos.

### Influencia del porcentaje de nuez

Un aspecto esencial del estudio consistió en evaluar el efecto de distintos niveles de nuez (0, 5, 10, 15, 20%) sobre las características de la matriz proteica (propiedades físico-químicas, microestructura) y atributos sensoriales de los filetes reestructurados (Jiménez Colmenero et al., 2003; Cofrades et al., 2004; Serrano et al., 2004). Los resultados obtenidos sugieren que si bien la adición de nuez conlleva ciertas modificaciones en la matriz, originó productos con adecuadas características físico-químicas y sensoriales.

### Influencia del grado de desintegración estructural de la carne

Generalmente en la elaboración de reestructurados cárnicos se han venido



practicando diversos procedimientos de desintegración estructural, entre los cuales el picado ha sido el más empleado por su facilidad de uso. El tamaño y forma de la partícula de carne puede afectar tanto a las características del producto final, como al efecto que imparten los ingredientes no cárnicos empleados en su formulación. Diferencias en la relación superficie/volumen suponen cambios en la aptitud interactiva entre los constituyentes del músculo y los ingredientes no cárnicos, como puede ser el caso de la nuez. A fin de valorar este tipo de variables se han estudiado filetes reestructurados preparados con dos tamaños de picado (0,6-1,4 cm de diámetro de orificio de placa de picado). Los resultados obtenidos indican que el tamaño de partícula condiciona el efecto de la nuez sobre las características de los productos (Cofrades et al., 2004).

### Sistemas de gelificación (reducción del nivel de sal)

Tradicionalmente, el proceso de reestructuración de los derivados cárnicos se ha realizado empleando sal y fosfato, que con la ayuda de medios mecánicos favorecen la extractabilidad de las proteínas miofibrilares, las cuales durante los procesos de calentamiento (gelificación térmica) sufren una serie de transformaciones que dan lugar a la formación de estructuras proteicas estables responsables de las características (textura, retención de agua y grasa, etc.) de los productos

cárnicos. Con este procedimiento los productos sólo pueden ser comercializados precocinados o congelados, debido a que la ligazón entre partículas es relativamente pobre y no resiste las condiciones de manipulación exigidas a los productos frescos. Uno de los aspectos que más atención ha suscitado en los últimos años en torno a esta problemática es el relativo a los procedimientos de ligazón en frío mediante agentes químicos que posibilitarían la comercialización de reestructurados en condiciones de refrigeración, más acorde con las demandas del consumidor. Este es el caso del empleo de transglutaminasa que permitiría reducir la necesidad de emplear sal y fosfato, consiguiendo una ventaja adicional al favorecer la reducción de sodio con los consiguientes beneficios para la salud.

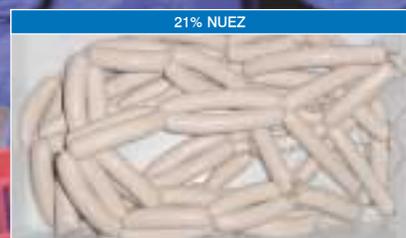
Se ha ensayado la formulación de filetes reestructurados con nuez en base a procesos de gelificación térmica y de gelificación en frío mediante combinaciones de transglutaminasa/caseinato (MTG/C). En relación con los procesos de gelificación térmica (1,5% de sal) se han elaborado varios reestructurados, a fin de valorar sus características según se produzca la comercialización como producto congelado (Jiménez Colmenero et al., 2003), o precocinado (70 °C en el centro térmico) (Cofrades et al., 2004). Procedimientos de gelificación en frío (mediante TGM/C) se han utilizado en la elaboración de filetes con distintos niveles de nuez (0, 10 y 20%) y sin sal añadida (Se-

rrano et al., 2004). De este modo se han obtenidos reestructurados con características mecánicas adecuadas para soportar la manipulación a la que habitualmente se somete un filete comercializado en fresco. Sin embargo, simultáneamente presentaron pobres propiedades ligantes de grasa y agua (tanto en fresco como sometido a cocción), las cuales podrían ser compensadas por la incorporación de nuez (20%) o la adición de sal (2%). La combinación de MTG/C (0,7%) y sal (2%) en la elaboración de reestructurados con nuez originó productos con adecuadas características sensoriales y excelentes propiedades ligantes de grasa y agua (Serrano et al., 2003).

Con el fin de mejorar la apariencia externa de los filetes reestructurados, se procedió a ensayar una serie de recubrimientos proteicos, encaminados a, una vez elaborado el filete, recubrirlo de una película proteica que le confiera una apariencia próxima a la de un filete en su presentación "tradicional". La aplicación y tecnología de preparación de los recubrimientos, así como diversos aspectos descritos en este artículo, están protegidos mediante una patente.

### Perfil nutricional de los filetes con nuez

El potencial efecto funcional que puede proporcionar la presencia de nuez en los reestructurados cárnicos se basa en los cambios originados sobre diversos constituyentes con implicaciones en la



salud: mejorar el estado de salud y bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedad. Se ha realizado un estudio encaminado en analizar cómo la presencia del 20% de nuez condiciona el perfil nutricional (aminoácidos, ácidos grasos, colesterol, minerales y vitamina E) de filetes reestructurados. Comparado con el producto control (sólo carne), el que llevaba incorporado nuez presentó menor relación lisina/arginina, cantidades (mg/100g producto) notablemente superiores de ácidos grasos monoinsaturados y n3 poliinsaturados (AGPI) (principalmente ácido  $\alpha$ -linoleico), así como menor relación de AGPI n6/n3 y mayor relación ácidos grasos poliinsaturados/saturados. La sustitución parcial de nuez por carne incrementó los niveles de  $\alpha$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol y en más de 400 veces la de  $\gamma$ -tocoferol (Serrano et al., enviado para su publicación).

### Conservación de filetes reestructurados

Un aspecto de especial interés en relación con estos derivados cárnicos consiste en analizar el efecto de la presencia de nuez sobre la estabilidad de los mismos. Diversos factores asociados a la naturaleza del producto y composición pueden afectar el modelo de deterioro en función de las condiciones de conservación. Así por ejemplo, si bien el contenido en lípidos y su elevado nivel de insaturación favorecerían la oxidación lipídica, la presencia de antioxidantes de la nuez puede

contribuir a limitar su velocidad y extensión. En consecuencia resulta esencial evaluar su comportamiento en las condiciones habituales de comercialización, entre ellas refrigeración (empleando procedimientos de gelificación en frío) y congelación.

#### - a) Conservación en estado refrigerado.

Se ha estudiado la conservación en refrigeración (3 °C) de filetes reestructurados. Para tal fin y empleando procedimientos de gelificación en frío, se formularon productos con distintas proporciones de nuez (0, 10 y 20%). A lo largo del periodo de conservación se evaluaron tanto aspectos microbiológicos, como la formación de aminas biógenas (Ruiz-Capillas et al., 2004).

#### - b) Conservación en congelación.

Se ha analizado cómo la incorporación de nuez (0, 10 y 20%), condiciona la estabilidad en congelación (-20 °C durante 128 días) de filetes reestructurados. En las condiciones de experimentación, no se apreciaron cambios importantes en las características físico-químicas (propiedades ligantes de grasa y agua, y textura) de los productos estudiados, comportamiento asociado a la escasa incidencia de procesos de desnaturalización proteica inducidos en el proceso de congelación y conservación. A pesar de la distinta composición que afectó a aspectos cuantitativos (mayores niveles de grasa) y cualitativos (mayor relación entre ácidos grasos insaturados/saturados), los resultados obtenidos sugieren que la incorporación

de nuez no constituye un factor limitante de la estabilidad en congelación. Procesos de decoloración y oxidación de lípidos no parecen aparentemente correlacionados. En general cabe señalar que los filetes reformulados con nuez, a excepción de procesos de decoloración (por otra parte igualmente existente en filetes sin nuez), no presentaron efectos adversos sobre las características físico-químicas y sensoriales (Serrano et al., enviado para su publicación).

### SALCHICHAS TIPO FRANKFURT

De manera simultánea al esfuerzo investigador realizado en relación con los filetes reestructurados, se han llevado a cabo diversos estudios encaminados a abordar el reto tecnológico que conlleva también la reformulación (diseño y desarrollo) de productos cárnicos basados en sistemas gel/emulsión. Se trata de un grupo de derivados con destacada relevancia económica y amplia aceptación en determinados sectores de la población. A continuación se detallan algunos aspectos relacionados con los trabajos realizados al respecto.

### Efecto de la proporción de nuez incorporada

Al igual que en caso de los filetes reestructurados, se procedió al estudio de cómo la presencia de diferentes cantidades de nuez (7, 14 y 21%), condicionan las características (físico-químicas, morfológicas y sensoriales) de productos cárnicos

cos emulsionados: salchichas tipo *frankfurt*. Morfología, parámetros texturales (dureza, cohesividad y masticabilidad), así como propiedades ligantes de grasa y agua, y color estuvieron influenciados por los niveles de nuez. En general cabe señalar que los productos con nuez exhibieron atributos sensoriales aceptables para el consumidor (Carballo et al., 2003; Ayo et al., 2004a; Carballo et al., en preparación).

### Posibilidades de reducir/eliminar sal en los productos formulados con nuez

La ingestión de sodio en la mayoría de los países desarrollados excede las necesidades fisiológicas. Debido a sus implicaciones negativas en la salud y a que, en torno a una cuarta parte de la sal de la dieta procede de los derivados cárnicos, existe un creciente interés en minimizar los niveles de sodio en los productos cárnicos. Con tal propósito se han realizado los ensayos que se refieren a continuación.

– a) *Influencia de la presencia de sal en homogenizados cárnicos con nuez.*

Se ha estudiado cómo el efecto que induce la presencia de nuez (0 y 20%) en homogenizados cárnicos (crudos y sometidos a cocción) puede estar condicionado por los niveles de sal (1,5 y 2,5%). La incorporación de nuez en presencia de bajo contenido en sal mejora la estabilidad de la emulsión, dando lugar a la formación de una matriz proteica mas blanda y con buenas propiedades ligantes de grasa y agua (Ayo et al., 2004b).

– b) *Transglutaminasa en sistemas gel/emulsión con distintos porcentajes de nuez y en ausencia de sal.*

Diseño experimental basado en metodología de superficie de respuesta se ha empleado para evaluar de manera simultanea el efecto de tres variables en las características físico-químicas de sistemas gel/emulsión formulados en ausencia de sal y fosfatos. Las tres variables analizadas fueron: porcentaje de nuez (0-15%) y de transglutaminasa/caseinato sódico (0-1,24%), así como periodo de conservación (0-11 días a 3 °C). Los resultados obtenidos sugieren que los sistemas gel/emulsión inducidos durante el proceso de calentamiento forman estructuras con pobres propiedades ligantes de grasa y agua. Si bien la transglutaminasa no condicionó tal comportamiento, la presencia de nuez mejoró dichas propiedades (Co-

frades et al., 2004; Cofrades et al., enviado para su publicación).

– c) *Salchichas tipo frankfurt formuladas con nuez y bajo contenido en sodio.*

Teniendo en cuenta resultados anteriores se consideró necesario realizar un estudio comparativo entre productos (con nuez adicionada y sin sal) formulados con combinaciones de transglutaminasa y varios ingredientes no cárnicos (caseinato, KCl y fibra de trigo), en relación con uno preparado con los niveles habituales de sal. Los resultados obtenidos sugieren que algunas de las combinaciones ensayadas podrían ser empleadas para compensar la ausencia de la sal en la elaboración de salchichas con nuez (Jiménez Colmenero et al., 2005).

### Aplicación de altas presiones hidrostáticas

En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre la aplicación de altas presiones en alimentos, entre ellos los de origen cárnico. Entre las posibles aplicaciones se encuentran aquellas que afectan el procesado de diversos derivados cárnicos y su influencia en los procesos de gelificación térmica, que afecta las características de los productos (textura, color, etc.). La gelificación asistida por presión depende de factores asociados a las características del material biológico y a las condiciones de presurización (por ejemplo, combinaciones presión/temperatura). En base a lo señalado se estimó de interés analizar el efecto de la aplicación de altas presiones hidrostáticas (a presión y temperatura constante) (400 MPa/10 min/10 °C) sobre las propiedades de sistemas modelos (gel/emulsión) formulados con nuez (0, 10, 20%) (Ayo et al., 2005).

### Conservación

Teniendo en cuenta las condiciones de comercialización habituales, se ha evaluado la estabilidad (en refrigeración) de salchichas formuladas con distintos porcentajes de nuez (0, 7, 14, 21). En este estudio, que se prolongó durante 29 días ( $2 \pm 1$  °C), se analizaron aspectos relacionados con el desarrollo microbiano (aerobios viables, bacterias lácticas y *enterobacteriaceae*) y con modificaciones en textura, color y pérdidas de peso durante la conservación. Dependiendo del tipo de formulación, si bien se observaron algunos cambios en textura por efecto de la conservación, no se produjeron cambios de color. El desarrollo microbiano fue li-

geramente superior en las muestras con nuez incorporada, alcanzándose en todas las muestras, valores (tanto en aerobios viables como en bacterias lácticas) próximos a  $10^5$  (UFC/g) al final del periodo de conservación (Carballo et al., en preparación).

### Cambios en el perfil nutricional

Se ha realizado un estudio comparativo entre un producto preparado con el 25% de nuez (grasa: 18,5%) y otros dos que responden a las características de productos disponibles en el mercado: uno con un nivel de grasa próximo a lo habitual (16,1%) y otro con bajo contenido en grasa (6,9%). La influencia de los tres tipos de formulación ha sido valorada en base a sus propiedades sensoriales y tecnológicas, así como por medio de la composición (humedad, proteínas, grasa y ácidos grasos, cenizas y minerales, fibra, polifenoles y taninos) (Ayo, 2004).



Los resultados obtenidos señalan que además de adecuadas propiedades sensoriales, la adición de nuez favoreció el contenido en compuestos potencialmente funcionales a nivel de perfil lipídico, presencia de determinados minerales, aporte de fibra y riqueza en polifenoles y taninos. Los resultados de este estudio serán próximamente publicados.

### Agradecimientos

Estos estudios han sido realizados al amparo del proyecto AGL2001-2398-C03-01 del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I). Ministerio de Ciencia y Tecnología.

### Bibliografía

Ayo, J. (2004) Componentes cardiosaludables en salchichas elaboradas con nuez. Memoria docente investigadora para la obtención del diploma de estu-

dios avanzados. Facultad de Farmacia. Departamento de Nutrición y Bromatología I. UCM.

Ayo, J., Carballo, J. Solas, M.T. & Jiménez-Colmenero, F. (2005). High pressure processing of meat batters with added walnuts. *Inter. J. Food Sci. Technol.*, en prensa.

Ayo, J., Solas, M.T., Carballo, J. & Jiménez-Colmenero, F. (2004a). Microestructura de emulsiones cárnicas: efecto de la incorporación de nuez y de la aplicación de altas presiones. X Congreso Anual de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense Madrid (Madrid).

Ayo, J. Jiménez Colmenero, F. Carballo, J. & Ruiz-Capillas, C. (2004b). Physicochemical properties of meat batters with added walnut: Effect of salt levels. Proc. 50<sup>th</sup> International Congress Meat Science and Technology, Helsinki Finland.

Carballo, J., Ayo, J. & Jiménez Colmenero, F. (2003). Efecto de la incorporación de nuez en las propiedades físico-químicas de emulsiones cárnicas. II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Miguel Hernández (UMH). Orihuela. Editado por UMH, Vol. II, 469-472.

Carballo, J., Ayo, J., Solas, M.T. & Jiménez Colmenero, F. Physicochemical and sensory characteristics of meat emulsions with added walnuts during chilled storage. (en preparación)

Cofrades, S., Serrano, A., Ayo, J. Solas, M.T. Carballo, J. & Jiménez Colmenero, F. (2004). Restructured beef with different proportions of walnut as affected by meat particle size. *Eur. Food Res. Technol.*, 218, 230-236.

Cofrades, Serrano, Ayo, Carballo, J., Ruiz-Capillas, C. & Jiménez Colmenero, F. (2004). Effect of walnut, microbial transglutaminase and storage time on the water and fat binding capacity of salt-free beef batters. Proc. 50<sup>th</sup> International Congress Meat Science and Technology, Helsinki Finland.

Cofrades, S., Ayo, J., Serrano, A., Carballo, J. & Jiménez-Colmenero, F. Walnut, microbial transglutaminase and storage time effects on salt-free beef batters characteristics. *Eur. Food Res. Technol.*, enviado.

Jiménez Colmenero, F., Serrano, A., Ayo, J., Solas, M.T. Cofrades, S. & Carballo, J. (2003). Physicochemical and sensory characteristics of restructured be-

ef steak with added walnuts. *Meat Sci.*, 65, 1391-1397.

Jiménez Colmenero, F., Ayo, J., & Carballo, J. (2005). Physicochemical properties of low sodium frankfurter with added walnut: Effect of transglutaminase combined with caseinate, KCl and dietary fibre as salt replacers. *Meat Sci.*, en prensa.

Jiménez Colmenero, F. & Olmedilla, B. (2004). Productos cárnicos funcionales preparados con nuez. *CTC Alimentación*, 22.

Ruiz-Capillas, C., Cofrades, S., Serrano, A. & Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amines in restructured beef steaks as affected by added walnuts and chilling storage. *J. Food Prot.*, 67, 607-609.

Serrano, A., Cofrades, S. & Jiménez Colmenero, F. (2004). Transglutaminase as binding agent in fresh restructured beef steak with added walnuts. *Food Chem.*, 85, 423-429.

Serrano, A., Cofrades, S. & Jiménez Colmenero, F. (2003). Características de reestructurados cárnicos formulados con nuez: gelificación mediante transglutaminasa. II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Miguel Hernández (UMH). Orihuela. Editado por UMH, Vol. II, 465-468.

Serrano, A., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C. & Jiménez-Colmenero, F. Nutritional profile of restructured beef steak with added walnuts. *Meat Sci.*, enviada.

Serrano, A., Cofrades, S. & Jiménez-Colmenero, F. Frozen storage characteristics of restructured beef steak containing walnut. *Meat Sci.*, enviada. ■



**AgroCSIC**

**CENTRO DEL CSIC:** Instituto del Frío.  
**Departamento:** Ciencia y Tecnología de Carne y Productos Cárnicos y del Pescado y Productos de la Pesca.  
**Nombre Investigador:** F. Jiménez Colmenero.  
**E-mail:** fjimenez@if.csic.es  
**Tendencias de investigación:**

- Desarrollo de productos cárnicos funcionales.
- Aplicación de nuevos procesos en productos cárnicos.
- Evaluación de la calidad de carne y productos cárnicos.
- Conservación de carne y productos cárnicos.

# Productos cárnicos funcionales preparados con nuez.

## Evaluación del efecto funcional. Parte 3.

OLMEDILLA ALONSO, B; GRANADO LORENCIO, F; HERRERO BARBUDO, C; BLANCO NAVARRO, I; Y SÁNCHEZ-MUNIZ, FJ1 (EN REPRESENTACIÓN DEL EQUIPO INVESTIGADOR2 DEL SUBPROYECTO 3 DE MCYT. AGL2001-2398-C03-03)

UNIDAD DE VITAMINAS. SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN. HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO. MADRID. E-MAIL: BOLMEDILLA.HPTH@SALUD.MADRID.ORG

DPTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN). FACULTAD DE FARMACIA. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. E-MAIL: FRASAN@FARM.UCM.ES



**E**n este texto continuamos la información sobre el estudio "Productos cárnicos funcionales preparados con nuez" (MCYT. AGL2001-2398-C03) que se ha expuesto en los dos números anteriores de esta revista. En el presente artículo describimos las aproximaciones experimentales desarrolladas para evaluar, en humanos, el efecto producido por el consumo de los productos cárnicos descritos anteriormente (Jiménez Colmenero et al, 2005). Como se recordará, el planteamiento central se relacionaba con el beneficio en salud comunitaria que supondría una disminución

en el consumo de carne y un aumento de determinados alimentos de origen vegetal (p.ej. nueces) (Jiménez Colmenero & Olmedilla, 2004), basados en evidencias epidemiológicas y la actividad biológica de ciertos componentes mostrados en ensayos in vitro y en animales. De forma específica, el objetivo era desarrollar productos cárnicos modificados, cuali y cuantitativamente, para obtener un perfil nutricional asociado con menor riesgo cardiovascular.

Como ya se expuso, las nueces fueron elegidas como componente "funcional" del nuevo producto cárnico debido a su

composición nutricional relevante en relación con enfermedades cardiovasculares comparado con otros frutos secos (ej. contenido total en PUFA, ácidos grasos w-6 y w-3, contenido en  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol, fitosteroles, polifenoles, proteínas ricas en arginina) y a su gran aceptabilidad por la población. Asimismo, la cantidad a incorporar se basó en datos de consumo de nueces por persona y día en nuestro país, datos derivados de estudios epidemiológicos y recomendaciones actuales sobre ingesta de nueces (FDA, 2003).

Como se señaló en los artículos anteriores (Jiménez Colmenero & Olmedilla,



2004; Jiménez Colmenero et al, 2005), según consenso científico europeo, “un alimento puede considerarse funcional si demuestra de forma satisfactoria que tiene efecto beneficioso sobre una o más funciones diana en el organismo, aparte de los efectos nutricionales, de forma que sea relevante tanto para mejorar el estado de salud o bienestar y/o para la reducción de riesgo de enfermedad” (Diplock et al., 1999). No obstante, a pesar del gran desarrollo de este tipo de alimentos, existe una importante falta de información sobre la “funcionalidad” de los componentes (efecto sobre la salud humana) derivada del consumo habitual de estos alimentos.

El contenido de la vitamina E en los productos cárnicos de nueva formulación (salchichas y filetes reestructurados con y sin nueces) y en la nuez en polvo, se ha determinado mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), con métodos y resultados validados mediante nuestra participación en el Programa de control de calidad “Fat-soluble Vitamins Quality Assurance Programme” (National Institute of Standards and Technology, USA). Los análisis realizados (X Congreso Anual de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2004) muestran que la vitamina E en la nuez se encuentra en forma libre, no esterificada, y la concentración de los principales vitámeros se muestran en la tabla 1.

Las pruebas que apoyen el efecto funcional de estos alimentos pueden derivarse de estudios epidemiológicos, experimentales (in vitro, animales, ensayos en humanos) y de intervención en humanos utilizando biomarcadores intermedios con relevancia en la detección precoz y pronóstico de la enfermedad. Mediante estos biomarcadores se deberían decidir sobre los temas relativos a validación y verificación científica de alegacio-

nes en alimentos e información al consumidor (PASSCLAIM, 2004).

### Estudios para la valoración del efecto funcional de los productos cárnicos con nuez

La evaluación del efecto funcional se planteó mediante dos tipos de ensayos complementarios; por un lado, evaluando la respuesta post-prandial en plasma de g-tocoferol tras ingesta única del producto cárnico (biomarcador de exposición) y, por otro, evaluando la biodisponibilidad a medio plazo de algunos componentes derivados de la nuez (ej. g-tocoferol, w-6/w-3 ratio) y el impacto del consumo regular sobre marcadores e indicadores de riesgo cardiovascular (biomarcadores de función y riesgo), incluyendo marcadores de homeostasis lipídica, inflamación, trombosis, antioxidantes, presión sanguínea, homocisteína y vitaminas B6, B12 y folato.

### Biomarcador de exposición: gamma-tocoferol

Comparado con otros frutos secos, las nueces contienen poca cantidad de a-tocoferol (ca. 2 mg vs 25 mg/100g en avellanas o almendras) pero un alto contenido en g-tocoferol (41 mg vs 2 mg/100g) (Souci et al., 1989), lo que las convierte en una excelente fuente dietética de este vitámero. Apoyando su actividad biológica, distintos estudios indican que el g-tocoferol muestra una elevada actividad antioxidante con, potencialmente, importantes implicaciones fisiológicas (Christen et al., 1997; Devaraj & Traber, 2003) y además, tanto g-tocoferol como su principal metabolito (g-carboxietil hidroxicromano) presentan otras actividades como antioxidantes frente a especies reactivas de nitrógeno, actividad natriurética, efecto antiinflamatorio (por inhibición de actividad COX-

2) o regulación de óxido nítrico sintetasa (Jiang et al., 2001). Por otro lado, distintos estudios observacionales han descrito bajos niveles de g-tocoferol (ajustados por niveles lipídicos), pero no de a-tocoferol, en sujetos con enfermedad coronaria (Ohrvall et al., 1996; Kontush et al., 1999). Por todo ello, y dado que el contenido de g-tocoferol en los cárnicos era significativamente mayor que la aportada en la dieta, los niveles de g-tocoferol en suero se utilizaron como marcador de exposición durante el estudio de intervención con cárnicos reestructurados con nueces.

### Estudio de intervención con productos cárnicos con nuez (a dosis de ingesta compatibles con una dieta equilibrada)

La intervención dietética a medio plazo consistió en un ensayo de biodisponibilidad no ciego, cruzado, con dosis múltiples (5 veces/ semana durante 5 semanas), con un mes de “lavado” entre ambos tratamientos (reestructurados con y sin nuez). El estudio planteado tenía en consideración dos factores fundamentales en este tipo de ensayos, la dosis y la posible presencia de un retraso en la respuesta similar al observado para otros nutrientes. Los sujetos recibieron la recomendación de no modificar sus hábitos dietéticos ni sociales, excepto para consumir los productos a ensayar en vez de otro producto cárnico habitual. Teniendo en cuenta el contenido de la nuez y la composición de los productos a ensayar, el aporte de g-tocoferol a los voluntarios en el ensayo es de ca. 6,3 mg de g-tocoferol por filete (aprox. 150g) y unos 4 mg por ración de salchicha (aprox. 80 g). Esto supone que cada voluntario, mediante el consumo de estos cárnicos, ingieren aproximadamente unos 29 mg g-tocoferol por semana. En términos de consumo

equivalente de nueces, este sería de 30 g nuez/ filete y 16 g nuez/ ración de salchichas lo que implica un consumo de 136 g de nueces a la semana, que representa un consumo medio de 19,4 g nueces / día. (Figura 1) Este consumo supone alrededor del 70% de la cantidad considerada como adecuada (FDA 2003) y es consistente con las recomendadas por diversas entidades y grupos de científicos con el objetivo de reducir el riesgo de enfermedad coronaria (junto con una dieta baja en grasas saturadas y colesterol).

Selección de participantes a partir de población con diversos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular:

Los criterios de inclusión establecidos de acuerdo a los criterios de la OMS/FAO (2003) para prevención de enfermedades crónicas, fueron de entre los factores no modificables, la edad y de entre los factores modificables, el sobrepeso, dislipemia, hábito al tabaco y presión arterial. En un principio se estableció como requerimientos para la inclusión: edad (hombres de 45-60 años, mujeres de 55-65 años y sin terapia hormonal sustitutiva), sobrepeso (IMC >25 y <30), colesterol (>220 mg/dl e < 300 mg/dl), y al menos uno de los dos siguientes: presión arterial (próxima a 140/90 mm Hg) o tabaquismo.

El número de participantes previsto era de 32 (16 hombres y 16 mujeres). No obstante, debido a la baja respuesta obtenida en función de estos requerimientos, hubo que modificar algo los criterios de inclusión, así, se amplió el rango de edad (hombres: 45-69 años; mujeres: 50-69 años) y sobrepeso (Índice de Masa Corporal

> 25 kg/m<sup>2</sup> y < 34.9 kg/m<sup>2</sup>), junto con al menos uno de los siguientes: consumo de tabaco, colesterolemia > 220 mg/dl o presión arterial aprox. 140/90 mm Hg. En conjunto, un total de 68 personas interesadas que creían cumplir los criterios de inclusión contactaron con el equipo investigador de las cuales, 30 fueron descartadas por diversas razones (utilización habitual de fármacos para tratamiento de hipercolesterolemia, hipertensión u otros, hiperglucemia, etc), y 10 perdieron contacto, quedando finalmente incluidos un total de 25 sujetos ( 15 hombres, 10 mujeres).

### Estudio de biodisponibilidad en humanos de vitamina E a partir del producto cárnico con nueces:

En tres sujetos se realizó el ensayo tanto con filete de carne con nuez como sin nuez "a dosis única" (modelo "farmacocinético"). El ensayo se realizó durante el período post-prandial, 7 horas, durante las cuales se tomaron muestras para valorar vitamina E (a- y g-tocoferol) en suero y en quilomicrones, entre otros parámetros que se comentarán a continuación. Los resultados muestran un aumento en la concentración de g-tocoferol (biomarcador de exposición a este producto) sólo tras la ingesta de reestructurados con nuez y no así en los productos control (sin nuez), obteniéndose el valor máximo de g-tocoferol en plasma a las 6 horas de su ingesta (tiempo evaluado = 6 horas) ( Fig. 2). El producto cárnico es eficaz para aportar, a dosis y pautas de con-

sumo compatible con una dieta equilibrada: a) nuez en cantidades asociadas a efectos cardiovasculares beneficiosos, b) un aumento de g-tocoferol en suero, principio activo asociado con disminución de riesgo cardiovascular.

### Estudio en humanos del consumo de 5 raciones semanales del producto cárnico sobre marcadores de riesgo cardiovascular:

Se ha utilizado un protocolo de ensayo próximo a condiciones dietéticas habituales como medio sostenible a largo plazo, ya que se sustituye el consumo de carne y derivados durante el período de 5 semanas por el consumo de 5 productos cárnicos modificados con nuez añadida por semana (4 filetes + 1 ración salchicha)(35 días). Como marcador de ingesta se considera el g-tocoferol y entre los parámetros e indicadores de riesgo cardiovascular estamos valorando los siguientes: colesterol (LDL y HDL) y triglicéridos en plasma y la presión arterial (SEN, 2004). También se han separado lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL) mediante ultracentrifugación, analizando en cada fracción lipoproteica colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas totales. Se están realizando también análisis de eicosanoides, Lp(a), Apo AI y Apo B, agregación plaquetaria, marcadores de inflamación (PCR y los marcadores de adhesión de monocitos VCAM e ICAM) y marcadores de peroxidación lipoproteica y capacidad antioxidante. La concentración de glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y su-

**FIGURA 1. MARCADOR DE INGESTA DEL PRODUCTO CÁRNICO FUNCIONAL (G- TOCOFEROL) Y CANTIDAD DE NUEZ QUE APORTA POR ESTOS CÁRNICOS A LA DIETA**

#### Ingesta de g-tocoferol y de nuez por ración y por semana:

6,3 mg g-tocoferol	filete
4 mg g- tocoferol	salchicha
29 mg g- tocoferol	semana
30 g nuez	filete
16 g nuez	salchicha
136 g nueces	semana (19,4 g/día)

**TABLA 1: CONTENIDO EN VITAMINA E (G-TOCOFEROL, A-TOCOFEROL Y D-TOCOFEROL) EN LA NUEZ Y EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS OBJETO DEL ESTUDIO**

Producto	g-tocoferol (mg/100g)	a-tocoferol (mg/100g)	d-tocoferol (mg/100g)
Nuez en polvo (n=3)	26649	708	5190
Filetes con nuez (n=6)	4165	ca. 50	926
Salchichas con nuez (n=7)	4980	226	1205
Filetes sin nuez	ca. 19	ca. 50	n.d.

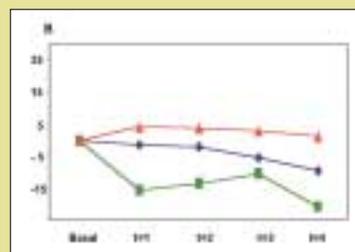
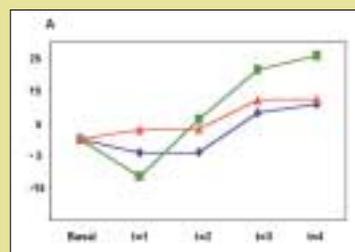


Figura 2.- Respuesta de g-tocoferol (µg/dl) en quilomicrones tras la ingesta de filete con nuez (A) y filete sin nuez (B) en tres sujetos.



peróxido dismutasa se mide en glóbulos rojos y en plasma.

Resultados preliminares se han presentado en diversos congresos (congresos (VI Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria - IV Congreso Iberoamericano de Nutrición y Salud Pública, 2004; IX Congreso de la Sociedad Española de Nutrición, 2004, I Jornada RCMN del ISCIII, 2004; Congreso Biotec'2004; I Congreso de la FESNAD, 2005) y estos nos sugieren que el consumo de cárnico con nueces tiende a disminuir el colesterol total y el ligado a lipoproteínas de alta densidad (LDL), así como la intensidad de agregación a las 5 semanas del estudio e incrementa el tiempo de agregación máxima a las 3 semanas. Es decir se produce menor número de plaquetas que agregan y necesitan más tiempo para hacerlo de forma máxima. Se miden también otras sustancias vasodilatadoras y antiagregantes como son las prostaglandinas (PG). Ya que las nueces contienen cantidades significativas de ácido linolénico es posible que las células endoteliales produzcan más PGI<sub>3</sub>. A partir de las plaquetas activadas se procederá a estudiar los tromboxanos, sustancias proagregantes plaquetarias y vasoconstrictoras.

Como marcadores de peroxidación lipoproteica se está midiendo las LDL-oxidadas mediante ELISA y marcadores monoclonales de LDL-oxidada (Mercodia). En suero mide la concentración de malondialdehído mediante el test del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y también se valora la actividad de paraoxonasa y arilesterasa, enzimas que se considera participan en la protección antioxidante de las LDL y en el mecanismo de eliminación de radicales libres (Canales y Sánchez-Muniz, 2003). La actividad arilesterasa se ha medido mediante la técnica de Eckerson et al (1983), que utiliza como tampón

Tris/HCl, y mediante otra técnica original del subproyecto realizado en la Facultad de Farmacia (Nus et al., 2004).

Finalmente, dado que la respuesta a la dieta es muy variable de unos individuos a otros, parece importante estudiar la interacción del polimorfismo de algunos genes candidatos y el consumo de carne con nueces sobre diferentes marcadores de riesgo cardiovascular. Dado que el número de pacientes no es muy elevado, se estudian sólo algunos genes candidatos de los que se ha observado tienen interacción en muchos estudios sobre el efecto de diferentes compuestos dietéticos sobre marcadores de riesgo cardiovascular. Hasta el momento se ha procedido a aislar ADN genómico de los participantes y se ha probado la amplificación del gen de la ApoE, ApoA4, ABCG, CETP, PON1 y PON 2.

Los resultados definitivos están en la fase final de generación y de valoración estadística. En un próximo artículo se comentarán los resultados finales de este estudio de intervención con un alimento potencialmente funcional sobre marcadores de riesgo cardiovascular.

### Agradecimientos

2 Participan en el subproyecto desarrollado en la Facultad de Farmacia: Josana Librelotto, Meritxel Nus, Amaya Canales Juana Benedí, M Teresa Méndez, Rafaela Raposo, Pilar Vaquero.

### Bibliografía

Canales A y Sánchez-Muniz FJ (2003) Paraoxonasa ¿Algo más que un enzima? *Med. Clin.* (Barcelona) 12: 537-548.  
 Christen, S; Woodall AA; Shigenaga MK; Sothwell-Keely PT; Duncan MW; Ames BN. (1997). *γ*-Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO<sub>x</sub> and complements  $\alpha$ -tocopherols: physiolo-

gical implications. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 94: 3217-3222.

Devaraj, S; Traber, MG. (2003).  $\gamma$ -tocopherol, the new vitamin E?. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 530-531.

Diplock, A. T; Agget, P. J; Ashwell, M; Borne, F; Fern, E. B.; Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. *Brit. J. Nutr.* 81 (suppl.1): S6.

Eckerson, H.W., Romson, J., Wyte, C., La Du, B.N. 1983. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am. J. Human Genet.* 35:214-227.

FDA. Food and Drug Administration. (2003). Office of Nutritional Products, Labeling and Dietary Supplements. Qualified Health Claims. Walnuts and Coronary Heart Disease. (Docket No 02P-0292).

Kontush, A; Spranger, T; Reich, A; Baum, K; Beisiegel, U. (1999). Lipophilic antioxidants in blood plasma as markers of atherosclerosis: The role of  $\alpha$ -carotene and  $\gamma$ -tocopherol. *Atherosclerosis* 144: 117-122.

Jiménez Colmenero, F; Carballo, J; Cofrades, A; Serrano, A; Ayo, J. (2005) Desarrollo de derivados cárnicos funcionales preparados con nuez. Parte 2. *CTC Alimentación*, 23: 20-25.

Jiménez Colmenero, F; Olmedilla, B. (2004) Productos cárnicos funcionales preparados con nuez. *CTC Alimentación*, 22.

Nus M, Sánchez-Muniz FJ, Sánchez-Montero JM (2004). Nuevo método para la determinación de actividad aril esterasa humana in vitro en miméticos de suero humano. *Biotec'2004. Sociedad Española de Biotecnología.* Oviedo, 19-23 de Julio.

Ohrvall, M; Sundlof, G; Vessby, B. (1996). Gamma, but not alpha, tocopherol levels in serum are reduced in coronary

heart disease patients. J. Int. Med. 239:111-117.

PASSCLAIM (2004). Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods. Phase Two: Mowing Forward. Asp, N-G.; Cummings, JH; Howlett, J; Rafter, J; Riccardi, G; Westenhoefer, J. (Guest Editors) Eur. J. Nutr., 43(supl.2). Souci, S.W; Fachman, W; Kraut, H. (1989). Food Composition and Nutrition Tables 1989/1990. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

**Comunicaciones a Congresos mencionadas en el texto:**

I Congreso FESNAD (Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética). Nus M, etl. (Cartel 167) Niveles de actividad paraoxonásica en sujetos con sobrepeso y obesidad, publicado en Nutr. Hosp. (2005) XX (Supl.1); 51. Nus et al. Efecto del consumo de un cárnico funcional conteniendo nuez sobre los niveles plasmáticos de apolipoproteínas A1 y B. Datos preliminares (Cartel 113) publi-



cado en Nutr. Hosp. (2005) XX (Supl.1); 129 y .Nus M, et al Efectos del consumo de un cárnico funcional conteniendo nuez sobre la actividad arilesterasa plasmática. Datos preliminares. (Cartel 117), publicado en Nutr. Hosp. (2005) XX (Supl.1); 131. Congreso Biotec'2004 de la Sociedad Española de Biotecnología. Nus M,

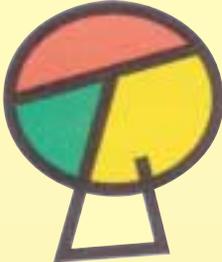
Sánchez-Muniz FJ, Sánchez-Montero JM (Cartel 9). Nuevo método para la determinación de actividad aril esterasa humana in vitro en miméticos de suero humano. Oviedo, 19-23 Julio, 2004.

VI Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria y IV Congreso Iberoamericano de Nutrición y Salud Pública. Canales C, Benedí J y Sánchez Muniz FJ (comunicación oral nº O901). Consumo de carne funcional y agregación plaquetaria en sujetos con riesgo cardiovascular incrementado. Ibiza, 22-25 Septiembre, 2004.

I Jornada Científica de Red de Centros de Metabolismo y Nutrición (RCMN). Redes Temáticas de Investigación cooperativa del Instituto de Salud Carlos III. Olmedilla Alonso, B, et al. Sitges, Barcelona, 16-17 enero 2004.

X Congreso Anual de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Olmedilla, B, et al. Madrid, 24-27 marzo, 2004.

X Reunión Científica Sociedad Española de Nutrición (SEN). Herrero-Barbudo, MC, et al. Cuenca, 1-3 julio 2004. ■



**“SU EMPRESA DE INSTRUMENTACION”**

# TECNOQUIM, S.L.

Pol. Ind. Oeste. Avda. Principal, P. 29/28 – 30169 San Ginés-MURCIA  
 Tel. 968 880 298 - Fax 968 880 417  
 E-mail: [ventas@tecnoquim.es](mailto:ventas@tecnoquim.es)  
 Web: <http://www.tecnoquim.es>

Certified ISO 9001 by



**Distribuidor Autorizado para Murcia y Albacete:**



METROHM	ATAGO	BAC-TRAC	MILESTONE
VALORADORES AUTOMATICOS CROMATOGRAFIA IONICA	REFRACTOMETROS POLARIMETROS	EQUIPOS MICROBIOLÓGICOS DE IMPEDANCIA	EQUIPOS DIGESTION Y EXTRACCION POR MICROONDAS






**SOLICITEN INFORMACION Y PRESUPUESTO DE:**

Autoclaves / Agitadores magnéticos / Balanzas / Baños termostáticos / Calibraciones / Cámaras climáticas  
 Conductímetros / Cromatógrafos de gases y líquido / Espectrofotómetros VIS-UV y A.A. / Estufas / Fibra  
 Grasa / IRTF / Lupas / Microscopios / Mobiliario / Molinos / Patrones certificados / PH-metros...

**Delegación:** Polígono Industrial. Campollano. Calle D, Parc. 57, Nave 9. 02007 ALBACETE  
 Tlf/Fax: 967609860 / E-Mail: [albacete@tecnoquim.es](mailto:albacete@tecnoquim.es) WEB: <http://www.tecnoquim.es>

# Leches fermentadas probióticas

TERESA REQUENA, CAROLINA JANER Y CARMEN PELÁEZ.  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS LÁCTEOS. INSTITUTO DEL FRÍO (CSIC). MADRID.

El término leche fermentada incluye los productos lácteos obtenidos a partir de una tecnología equivalente a la de fabricación del yogur, pero que emplea para su elaboración microorganismos diferentes a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, los cuales son los únicos aceptados para la elaboración del yogur, tal y como establece la Norma de Calidad para este producto (RD 179/2003). El yogur posee una gran aceptación social basada en su tradicional reputación como alimento saludable y en sus excelentes características sensoriales, lo que junto a su riqueza nutricional convierte a estos alimentos en componentes ideales de una alimentación supuestamente funcional y candidatos por excelencia a la incorporación de microorganismos probióticos, fundamentalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En este contexto, han surgido en el mercado en los últimos años una gran variedad de productos lácteos que basan su publicidad en supuestos efectos beneficiosos para la salud de los probióticos que incorporan, sin que exista, en algunos casos, suficiente evidencia científica al respecto.

## Probióticos

En un informe de la FAO elaborado por un Comité de Consulta de Expertos se definieron los probióticos como: “organismos vivos que ingeridos en ciertas cantidades ejercen un efecto beneficioso para la salud más allá de su inherente aporte nutricional” (Guarner y Schaafsma, 1998). Estudios más recientes indican que algunas estructuras celulares aisladas pueden ejercer los efectos beneficiosos sin necesidad de que el microorganismo se encuentre viable (Ouweland *et al.*, 2002). En general, aspectos tales como viabilidad de los microorganismos, administración en alimentos y efecto beneficioso demostrado para la salud tras su consumo, son criterios permanentes en la mayoría de las definiciones propuestas para probióticos (Sanders, 2003).

Por otra parte, estrechamente asociado al concepto de probióticos se encuen-



tra el de prebióticos, los cuales representan ingredientes no digeribles de los alimentos que alcanzan intactos el colon donde son fermentados preferentemente por los grupos de bacterias beneficiosas allí presentes (Gibson y Roberfroid, 1995). Entre los prebióticos se incluyen algunos componentes de la leche (aminoazúcares), componentes de las paredes vegetales como las hemicelulosas (arabinanos, xilanos, galactanos) y pectinas, así como materiales de reserva de vegetales (inulina, almidón resistente). En la degradación de estos carbohidratos intervienen de forma combinada varios enzimas glicolíticos bacterianos que son los responsables de la liberación de residuos de monosacáridos de los extremos de las ca-

denas (Margolles y de los Reyes-Gavilán, 2003; Janer *et al.*, 2004).

El potencial beneficio de la ingestión en los alimentos tanto de probióticos como de prebióticos o de ambos (simbióticos), se basa en la gran influencia que ejerce la microbiota intestinal en el estado de salud de los individuos, y en cómo ésta puede verse influenciada por diferentes hábitos de conducta. La microbiota presente en el colon alcanza cifras de entre  $10^{11}$  y  $10^{12}$  células por gramo de material colónico (Figura 1), constituyendo así varios cientos de gramos de bacterias vivas que afectan de manera importante a la homeostasis del individuo (Guarner y Malagelada, 2003). Esta microbiota está compuesta por una pobla-



ción oportunista con potenciales efectos nocivos (coliformes y clostridios) y una microbiota potencialmente beneficiosa (bifidobacterias y lactobacilos) que ya coloniza el intestino desde el momento de la lactación (Martín *et al.*, 2004). Los aspectos nocivos de la población intestinal potencialmente dañina para los individuos, se basan en determinadas actividades enzimáticas asociadas a un metabolismo putrefactivo y a la producción de toxinas y de sustancias potencialmente carcinogénicas.

La microbiota potencialmente beneficiosa presente en el colon, en contraste, ejerce una serie de efectos positivos, como es la fermentación de residuos no digeribles de la dieta, que proporciona al hospedador la recuperación de energía metabólica mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta. Estos compuestos reducen el pH del medio a valores ácidos (5-6), facilitan la absorción de iones en colon, son fuente directa de energía para los células epiteliales intestinales e intervienen en la modulación del metabolismo de la glucosa (Cummings *et al.*, 1987). Los ácidos grasos de cadena corta poseen además una importante función en el control de la proliferación y diferenciación de las células epiteliales intestinales, habiéndose sugerido un papel importante de estos compuestos en la prevención de alteraciones inflamatorias crónicas y de carcinogénesis en colon (Avivi-Green *et al.*, 2000).

Otro de los aspectos de gran relevancia de la interacción de la microbiota intestinal con el individuo constituye su influencia en la modulación del sistema inmune, ya que la mucosa intestinal constituye la principal área de interacción del sistema inmunológico humano con anti-

genos externos. Precisamente, el contacto del tejido linfóide intestinal con las bacterias intestinales constituye el estímulo más temprano y más importante para el desarrollo del sistema inmunológico asociado a las mucosas (Kalliomäki *et al.*, 2001). La interacción entre las bacterias potencialmente beneficiosas y el tejido linfóide de la mucosa intestinal supone una de las bases más importantes para la promoción de fenómenos antiinfecciosos y antialérgicos en el organismo.

El equilibrio de la microbiota intestinal puede desplazarse negativamente con cierta facilidad a consecuencia del estilo de vida, situaciones de estrés, ciertos hábitos en la dieta, la edad o tratamientos con antibióticos, entre otros factores. Este desequilibrio origina frecuentemente trastornos intestinales de mayor o menor gravedad que en ocasiones pueden asociarse al desarrollo de enfermedades agudas o crónicas. En estas si-

tuciones, la restauración del balance intestinal donde prevalezca la microbiota potencialmente beneficiosa es fundamental en la recuperación de estas alteraciones. Además, esta microbiota supone una barrera de resistencia frente a microorganismos patógenos contaminantes de los alimentos que pueden alcanzar y colonizar el intestino (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, etc.). Los principales mecanismos de competencia entre ambos tipos de microbiota consisten en la competición por zonas de adhesión al epitelio intestinal y por los nutrientes disponibles y en la producción de sustancias antimicrobianas, tales como ácidos grasos de cadena corta y bacteriocinas, entre otros (Fooks y Gibson, 2002).

#### *Bifidobacterium lactis*

La incorporación de bifidobacterias como probióticos en productos lácteos

**TABLA 1: VALORES MEDIOS DEL CONTENIDO EN LACTOSA, PROTEÍNA, FRACCIONES NITROGENADAS, ÁCIDO SIÁLICO Y MINERALES DEL CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE SUERO (WPC) EMPLEADO PARA LA FABRICACIÓN DE LAS LECHE FERMENTADAS**

Componente	WPC (g/kg)
Lactosa	438,7
Proteína total	351,4
Nitrógeno no proteico	11,4
Nitrógeno amínico	1,2
Ácido siálico	6,7
K	9,1
Na	1,3
Ca	1,9
Mg	0,6



en concreto, y en cualquier alimento en general, se encuentra con la dificultad que representa la naturaleza anaeróbica obligada que poseen estos microorganismos, lo cual impide que se desarrollen en presencia de oxígeno y, por tanto, perjudica su viabilidad en el producto. Excepcionalmente, *Bifidobacterium lactis* es una especie tolerante al oxígeno hasta una concentración del 10%, lo que resulta tecnológicamente de gran interés para su incorporación en productos fermentados comerciales. Además, presenta una alta tolerancia a valores bajos de pH como los que se alcanzan en las leches fermentadas. Ambas propiedades diferencian claramente esta especie del resto de las bifidobacterias (Meile *et al.*, 1997).

Los estudios sobre la capacidad probiótica de *B. lactis* han demostrado que algunas cepas de estos microorganismos poseen propiedades de gran interés como son actividad antimutagénica, competencia bacteriana y antirotavirus en el intestino y estimulación de la respuesta inmune natural y adquirida, donde se destaca su capacidad para reforzar las defensas inmunes de la población de edad avanzada y la reducción de reacciones alérgicas infantiles (Gill *et al.*, 2001; Kirjavainen *et al.*, 2002). La mayoría de los estudios de intervención realizados con voluntarios para analizar los efectos de la ingesta de leches fermentadas que contenían *B. lactis*, han demostrado la presencia de este microorganismo en heces únicamente durante el período de ingesta de los productos y su desaparición al interrumpirse ésta. Por tanto, la conclusión general de estos estudios es que *B. lactis* sólo coloniza transitoriamente el colon (Malinen *et al.*, 2002). No obstante, se puede considerar que sería posible mantener una población intestinal transeúnte de *B. lactis*, con los consecuentes efectos beneficiosos derivados para el organismo, mediante el consumo habitual de productos que contengan este microorganismo en altos niveles de viabilidad.

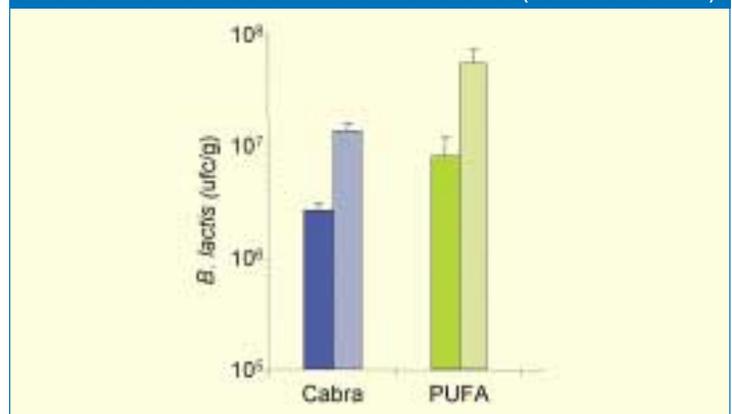
### Viabilidad de *B. lactis* en productos lácteos

La capacidad de *B. lactis* para ejercer una actividad metabólica beneficiosa como microbiota intestinal transeúnte depende en gran medida de su ingestión en cantidades significativas. De ahí la gran importancia del mantenimiento de unos niveles altos de viabilidad en los productos fermentados adicionados con estos microorganismos. En nuestro laboratorio se han llevado a cabo ensayos para analizar el potencial de componentes derivados del suero de quesería, como es el concentrado de proteínas de suero (WPC), para mejorar el crecimiento y viabilidad de *B. lactis* en leches fermentadas. El suplemento con el 2% de WPC a la leche de cultivo daba lugar a incrementos de *B. lactis* en casi 2 unidades logarítmicas después de 24 h de incubación a 37°C, alcanzándose recuentos de 10<sup>9</sup> ufc/ml. Los estudios de composición del WPC se muestran en la Tabla 1. El principal aporte del WPC como suplemento a la leche radica en su contenido en proteínas de suero, nitrógeno no proteico, lactosa y K.

FIGURA 1: MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA Y POSIBLES EFECTOS SOBRE LA SALUD DEL ORGANISMO



FIGURA 2: VIABILIDAD (UFC/G) DE BIFIDOBACTERIUM LACTIS EN LECHE FERMENTADAS ELABORADAS A PARTIR DE LECHE DE CABRA (BARRAS AZULES) Y DE LECHE DESNATADA DE VACA CON ADICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS (PUFA; BARRAS VERDES) Y EN LAS MISMAS LECHE SUPLEMENTADAS CON WPC (BARRAS LISTADAS)



Teniendo en cuenta que el WPC es un suplemento lácteo de bajo coste y que hemos comprobado su efecto bifidogénico, se elaboraron leches fermentadas empleando como cultivo iniciador *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* y *B. lactis* y suplementando la leche con WPC al 3%. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos para los recuentos de *B. lactis* en las leches fermentadas después de 21 días de conservación en refrigeración (4°C), tiempo cercano al máximo de 28 días establecido por la legislación española para la venta de yogures al consumidor después de su fabricación (RD179/2003). Se elaboraron leches fermentadas a partir de leche de cabra (barras azules) y de leche desnatada de vaca que incorporaba una mezcla de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA; barras verdes). En ambos casos, la leche de partida también se suplementó con WPC al 3% (barras listadas). Como puede observarse, la viabilidad de *B. lactis* al final del almacenamiento en refrigeración se mantuvo siempre por encima de 10<sup>7</sup> ufc/g en los productos fermentados suplementados con WPC. Este es el límite mínimo de bacterias viables en el producto en el momento de la ingesta que se acepta como necesario para conseguir los beneficios en salud asociados a las bacterias probióticas (Stanton *et al.*, 2001).

En ambos casos, leches fermentadas de cabra y derivado lácteo enriquecido en ácidos grasos poli-insaturados, el análisis sensorial de los productos mostraba las mayores puntuaciones en apariencia, sabor, aroma, textura y aceptación global para las leches fermentadas adicionadas con WPC al 3%, siendo comparables a los valores obtenidos por los yogures de vaca que se emplearon como referencia. En ningún momento se apreciaron defectos en sabor o aroma típico a yogur debido al incremento del crecimiento y viabilidad de *B. lactis* en los productos.

## Conclusiones

La demanda creciente de productos lácteos fermentados adicionados de bacterias probióticas que aumenten el valor añadido de su papel funcional, es una realidad actual y una apuesta de futuro para la innovación empresarial y la investigación I+D en el campo de la alimentación. Las bifidobacterias forman parte de la microbiota intestinal y sus posibles propiedades beneficiosas en la

## Referencias

- Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B (2000) Apoptosis cascade proteins are regulated *in vivo* by high intracolonic butyrate concentration: correlation with colon cancer inhibition. *Oncol. Res.* 12:83-95.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28:1221-1227.
- Fooks LJ, Gibson GR (2002) Probiotics as modulators of the gut flora. *Br. J. Nutr.* 88:S39-S49.
- Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125:1401-1412.
- Gill HS, Rutherford, KJ, Cross ML, Gopal PK (2001) Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:833-839.
- Guarner F, Schaafsma G (1998) Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39:237-238.
- Guarner F, Malagelada JR (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* 360: 512-519.
- Janer C, Rohr LM, Peláez C, Laloi M, Cleusix V, Requena T, Meile L (2004) Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant  $\alpha$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. *System. Appl. Microbiol.* 27:279-285.
- Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357:1076-1079.
- Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E (2002) Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of

bifidobacterial therapy at weaning? *Gut* 51:51-55.

Malinen E, Matto J, Salmite M, Alander M, Saarela M, Palva A (2002) PCR-ELISA II: Analysis of *Bifidobacterium* populations in human faecal samples from a consumption trial with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and a galacto-oligosaccharide preparation. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:249-258.

Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG (2003) Purification and functional characterization of a novel alpha-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5096-5103.

Martin R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Olivares M, Boza J, Jiménez J, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM (2004) The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 121-127.

Meile L, Ludwig W, Rueger U, Gut C, Kaufmann P, Dasein G, Wenger S, Teuber M (1997) *Bifidobacterium lactis* sp. nov, a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:57-64.

Ouweland AC, Salminen S, Isolauri E (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 279-289.

RD 179/2003. Real Decreto de 14 de febrero de 2003 por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. *BOE* 42(18/2/03):6448-6450.

Sanders ME (2003) Probiotics: Considerations for human health. *Nutr. Rev.* 61: 91-99.

Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, Ross RP (2001) Market potential for probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:476S-483S.

salud han sido el foco de atención en los últimos años, dando lugar a numerosos trabajos de investigación y estudios de intervención en humanos. De todas ellas, la especie *B. lactis* presenta la mejor potencialidad tecnológica para su incorporación en productos lácteos fermentados debido a una cierta tolerancia al oxígeno y a valores bajos de pH en relación a otras especies de bifidobacterias. Además, su presencia en el intestino, bien como microbiota implantada o bien como microbiota transeúnte, requiere obligatoriamente de su ingesta en elevadas cantidades. Este hecho puede conseguirse aumentando la capacidad de crecimiento y viabilidad de *B. lactis* en productos fermentados mediante la adición de sustancias como el WPC con efecto bifidogénico. ■



CENTRO DEL CSIC: Instituto del Frío.

Web: [www.csic.es/ifrio](http://www.csic.es/ifrio)

Departamento: Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos.

Nombre Investigador: Teresa Requena y Carmen Peláez.

E-mail: [trequena@if.csic.es](mailto:trequena@if.csic.es) y [cpelaez@if.csic.es](mailto:cpelaez@if.csic.es)

Tendencias de Investigación:

El objetivo principal de la investigación que se desarrolla consiste en aumentar la viabilidad de bifidobacterias durante la elaboración y conservación de leches fermentadas mediante la utilización de componente bifidogénicos. Los productos obtenidos deben cumplir también el requisito de mantener una alta aceptabilidad en sus características sensoriales.

# Acrilamida ¿un riesgo para la salud del consumidor?

FRANCISCO J. MORALES Y JOSÉ ÁNGEL RUFÍAN. INSTITUTO DEL FRÍO. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

*La acrilamida ha entrado a formar parte del grupo de agentes tóxicos formados durante el procesado de alimentos. Es un hecho indiscutible la formación de acrilamida durante el procesado o cocinado de determinados grupos alimenticios y ello supone un peligro en su condición de perjudicar la salud. Sin embargo, el concepto de riesgo hace referencia a la probabilidad y severidad del peligro. Antes de definir una estrategia efectiva y rigurosa de comunicación y gestión de riesgos*

*sobre la presencia generalizada de acrilamida en alimentos procesados térmicamente es preciso superar con éxito una serie de etapas previas, actualmente, en fase de evaluación. Cuestiones tan importantes como la validación de una metodología robusta de análisis, pasando por complejos estudios tanto de biodisponibilidad como epidemiológicos deben ser resueltos en los próximos años. Es por ello que debemos ser cautos y responsables con la información que lancemos a debate público.*



Hasta Abril del año 2002, la comunidad científica y el público en general, pensábamos que la acrilamida (CAS n. 76-06-1,  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$ ) era únicamente un importante intermediario en la síntesis de homo- y copolímeros de poli(acrilamida), de amplia presencia en nuestra sociedad. Además de la fabricación de plásticos, es utilizada desde agente aglutinante en el tratamiento de aguas residuales, en el procesado de

la pulpa de papel, hasta en el sector de la cosmética, el textil y la construcción, entre otros muchos. Sin embargo, quedamos sorprendidos cuando el grupo de investigación de la Prof. Margareta Törqvist (Univ. Estocolmo, Suecia) en conjunción con personal de la Agencia sueca de seguridad alimentaria (SNFA) anunció en rueda de prensa la detección de niveles significativos de acrilamida en ciertos alimentos fritos de amplio consumo. En

otras palabras, la acrilamida aparece de “manera natural” en los alimentos durante el cocinado o el procesado térmico, donde los niveles están relacionados con la temperatura y tiempo de calentamiento. Es por ello que los procesos, como el horneado, fritura, asado, etc., están directamente relacionados con una mayor presencia de acrilamida en estos. En alimentos crudos, frescos o simplemente hervidos, no se detectó acrilamida. El grupo



de alimentos donde se observó mayor contenido fue aquel que contenía elevados niveles de carbohidratos, en concreto en las patatas fritas. Se encontraron niveles entre 669-3000 de  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cuando el límite aceptable para agua de consumo es de  $0.1 \mu\text{g}/\text{L}$ . Sin embargo, no aportan información sobre el mecanismo de formación. Estos primeros resultados indican que el consumo promedio en la dieta sueca es de  $0.3\text{-}0.8 \mu\text{g}$  acrilamida/kg peso/día, pero en determinados sectores de población como la infantil, el consumo es de dos a tres veces superior al de los adultos. Además se planteó la hipóte-

principio se relacionó la presencia del biomarcador con el consumo de tabaco, la contaminación ambiental, y el uso de cosméticos, pero aún así, había una parte importante de niveles de acrilamida, analizada como CEV (aducto entre el resto N-terminal de la valina en la hemoglobina y la acrilamida), que no podía ser explicada y debía provenir de la dieta. El hecho lo confirmó la experimentación con ratas de laboratorio alimentadas con dietas ricas en fritos. La determinación de CEV es válida como biomarcador de la exposición in vivo a la acrilamida pero no es válida para hacer extensible un cálculo

de animales de laboratorio desde hace tiempo. En este punto es importante resaltar que las investigaciones se llevaron a cabo con el producto puro, en concentraciones no siempre acordes a los niveles encontrados en los alimentos y en animales de experimentación. Desde que cocinamos nuestros alimentos, los humanos llevamos miles de años expuestos a la acrilamida, quizás durante ese tiempo nuestro organismo haya podido adaptar un mecanismo de detoxificación específico. La toxicología de la acrilamida podemos dividirla en función de sus efectos; genotóxico, clastogénico, carcinogénico, neurotóxico (la principal alteración descrita en humanos es el desarrollo de neuropatía periférica) y, también, está implicada en procesos de infertilidad en animales macho de laboratorio. Aunque hasta la fecha, la carcinogenicidad no ha sido demostrada en humanos mediante estudios epidemiológicos, esta no puede ser totalmente excluida. Por ello, la acrilamida ha sido clasificada por la IARC como "sustancia probablemente carcinogénica en humanos" debido a serios indicios a partir de resultados realizados en mamíferos y líneas celulares humanas. Por otra parte, la Unión Europea aplicando el índice CRAI ha clasificado a la acrilamida en la categoría 2 de carcinogenicidad.

Respecto a la bioquímica de la acrilamida en el organismo se van conociendo diferentes rutas de metabolización. La acrilamida es una molécula tremendamente reactiva que participa en reaccio-

### "El horneado, fritura, asado, etc., están directamente relacionados con la presencia de acrilamida"

sis de que ciertos casos de cáncer en Suecia podrían ser explicados a partir de la ingesta de acrilamida. Concretamente citan que de los 45000 casos de cáncer atribuidos, en principio, a causas desconocidas, la tercera parte podrían ser explicados. La polémica está servida.

El hallazgo fue fortuito, ya que los científicos pretendían identificar nuevas vías de exposición a la acrilamida además de las ya conocidas (principalmente el tabaco). Pero, sus investigaciones les llevaron a relacionar elevados niveles de biomarcadores de acrilamida con los hábitos alimenticios de la población. Hace ya 30 años que se conoce que la acrilamida y la glicidamida (epóxido derivado de la acrilamida) pueden formar complejos con restos aminoacídicos de la Hb. En

lo de acrilamida vía dieta.

Posteriormente, y en cuestión de 3 semanas los resultados fueron validados y aceptados por diferentes agencias de seguridad alimentaria y universidades europeas (Noruega, Suiza, Reino Unido), además de Estados Unidos, Canadá y Australia. Desde entonces se ha iniciado una actividad frenética en los ámbitos científicos, gubernamentales e industriales implicados para evaluar el impacto real de la presencia de acrilamida sobre la salud de los consumidores.

Obviamente estos hallazgos han alertado a la comunidad científica, además de los diferentes organismos nacionales e internacionales de seguridad alimentaria, ya que los efectos toxicológicos de la acrilamida han sido estudiados y consta-



nes de radicales libres y reacciones de adición de Michael. Una de las mas conocidas es la transformación metabólica hasta glicidamida. Se ha descrito que puede participar en la modificación química de (a) grupos SH- no proteicos (cisteína, homocisteína, y glutatión), (b) grupos SH- proteicos (enzimas y proteínas estructurales), (c) grupos NH<sub>2</sub>- terminales de valina en la Hb, pero no se ha podido constatar la acción sobre el resto epsilon-NH<sub>2</sub>-lisina o el NH del anillo imidazol de la histidina, (d) grupos NH<sub>2</sub> de la guanina y otros ácidos nucleicos. Finalmente, también se ha constatado la interacción no covalente con los residuos de triptófano de las proteínas. Además, algunos resultados sin confirmar, indican que la acrilamida podría generarse en el organismo ya que se han determinado niveles basales de CEV en animales salvajes los cuales no están expuestos a la acrilamida por las vías antes citadas.

La investigación que actualmente se esta desarrollando sobre la presencia de acrilamida en alimentos es claramente multidisciplinar. De una manera muy general, podríamos describir que los grupos de trabajo formados para abordar el problema están adscritos a las siguientes áreas:

- mecanismos de formación de acrilamida en alimentos
- metodología analítica
- exposición y biomarcadores

- toxicología, consecuencias metabólicas y epidemiología
- evaluación y comunicación de riesgos.

En concreto la Unión Europea dentro del sexto programa marco de investigación científica ha financiado diferentes grupos de trabajo que abarcan el estudio de la presencia de acrilamida en nuestra dieta. Nuestro grupo esta participando en la acción COST-927 denominada “*Thermally processed foods. Possible Health Implications*” donde se evalúa la incidencia de la acrilamida y otros compuestos sobre la salud. También participamos en el programa *Collective Research* con la propuesta de proyecto ICARE con el objetivo de evaluar y diseñar estrategias para minimizar la formación de acrilamida y otros compuestos nocivos generados durante el procesado térmico, como son las aminas heterocíclicas.

Hasta la fecha se han descrito una serie de metodologías para la cuantificación de acrilamida, aunque es importante resaltar que no todos los métodos descritos son validos para ser aplicados en todos los alimentos. Tampoco olvidemos que aún no existe un método analítico contrastado, validado, y totalmente aceptado por la comunidad científica para la cuantificación de acrilamida. Si bien es cierto que los métodos y variantes desarrollados hasta la fecha son sometidos regularmente a diferentes programas de intercomparación organizados por BfR, IRMM y FAPAS sobre diversas matrices. Será muy difícil desarrollar un método generalista, ya que se deberá contemplar las particularidades de cada matriz; por ejemplo en hamburguesas, cereales o café las variantes en las etapas de extracción de muestra pueden ser diferentes. Es también un objetivo la definición y puesta a punto de metodologías rápidas y de bajo coste. Debido a la reactividad de la molécula y su química los métodos

“Estos hallazgos han alertado a la comunidad científica y a diferentes organismos de seguridad alimentaria”

mas utilizados hasta la fecha son GC/MS, así como LC/MS y LC/MS<sup>n</sup>. Las metodologías de GC/MS fueron las primeras descritas, ya que los analistas trasvasaron sus experiencias tanto en migración de contaminantes a partir de envases al alimento (por ejemplo niveles de acrilamida monómerica en plásticos) como procedimientos de análisis de acrilamida residual en agua tratada.

En el estudio inicial presentado por los investigadores suecos se analizaron unos 100 alimentos, agrupados en derivados de patata (bien en trozos o en laminas), cereales de desayuno, maíz, galletas y pan. A la fecha de hoy mas de 700 productos diferentes han sido ya evaluados, incluidos en 35 grupos de alimentos. También se han ido describiendo los alimentos o preparados donde no se han detectado niveles de acrilamida o estos no son significativos. En la tabla 1 se resumen los resultados presentados hasta la fecha. La tabla muestra claramente grupos de alimentos donde existe una gran dispersión entre los datos. Ello indica que es posible, por ejemplo en el grupo de las patatas fritas, reducir los niveles de acrilamida mediante modificaciones en las condiciones del procesado ya que la materia prima inicialmente es la misma. En este sentido se han descrito diferentes estrategias para reducir los niveles en los alimentos donde se requiere de un profundo conocimiento de la química de formación:

**- Reducción o eliminación de los reactantes del alimento o formulación.** Es conocido que la presencia de asparagina y compuestos dicarbonilo favorecen la reacción. El contenido en asparagina en patatas varía entre 0.5 - 10 mg/g. Se pueden emplear variedades de patata de bajos niveles de asparagina en la producción de patatas fritas. Otra estrategia planteada es tratar el producto previamente con asparaginasa.

**- Interrupción de la reacción.** Se podría incluir un inhibidor de alguna reacción limitante dentro de la cascada de reacciones implicadas en la formación de acrilamida. El inhibidor empleado debe ser un aditivo inocuo.

**- Eliminación después del procesado.** Esta opción es muy compleja ya que seguramente el producto se vería alterado en su textura y organolepticamente.

Los resultados presentados hasta la fecha no abarcan todos los sectores representativos de la dieta europea. Es mas, se prevé encontrar diferencias significativas

“Respecto a la bioquímica de la acrilamida en el organismo se van conociendo diferentes rutas de metabolización”



en los estudios epidemiológicos entre diferentes países. Es por ello urgente la elaboración de bases de datos, lo mas completas posibles, para determinar los niveles de acrilamida en la dieta, no solo europea, sino dentro de cada país o región. Concretamente, la Comisión europea a través del SFC anima al estudio de los niveles de acrilamida en productos regio-

nales o específicos de cada Estado. A partir de la creación de una base de datos completa, se puede estimar los niveles de distribución de acrilamida en los grupos de alimentos y relacionarlos con la ingesta en diferentes grupos poblacionales y de esta manera llegar a obtener una estimación de la distribución de la exposición de la acrilamida. Paralelamente, los

estudios de biodisponibilidad (tóxico-cinéticos) en animales de laboratorio deberían clarificar el efecto del consumo sobre la absorción y eliminación de la acrilamida. Uno de las principales interrogantes es conocer el comportamiento de las matrices alimenticias y de otros compuestos presentes en nuestra dieta sobre el bloqueo de la acrilamida. En estos estudios se determinarían tanto los niveles de acrilamida como de glicidamida en suero. En una etapa final, será posible modelizar (estudios cinéticos) y extrapolar los resultados obtenidos en animales de laboratorio a humanos.

### Conclusión

Aunque han transcurrido escasamente dos años desde que tuvimos constancia que una nueva vía de contaminación por acrilamida en humanos era a través de los alimentos que ingerimos diariamente, se ha avanzado de una manera sorprendente en el conocimiento científico sobre la formación e incidencia de acrilamida en nuestra dieta. Se han mo-

vilizado ágilmente y coordinado los recursos de las principales instituciones internacionales y nacionales de seguridad alimentaria, así como de los laboratorios de investigación y desarrollo de las principales compañías productoras implicadas. Las claves sobre la formación e impacto de la acrilamida sobre nuestra salud no están, ni mucho menos, resueltos. Es cierto que el ser humano lleva cocinando y procesando alimentos desde hace miles de años y posiblemente el ries-

### “Es posible, en el grupo de las patatas fritas, reducir los niveles de acrilamida modificando el procesado”

go para la salud que suponga la presencia de acrilamida en la dieta no sea mayor que la falta de ejercicio físico o el bajo consumo de frutas. Pero aún así, ese riesgo debe ser evaluado y clarificado. Por otra parte, se deben de articular mecanismos para eliminar, o cuanto menos, reducir los niveles de acrilamida a los más bajos que técnicamente sean posi-

bles. Poco a poco se van conociendo diferentes puntos críticos en la formación de acrilamida, aunque si bien es cierto que la importancia relativa de cada uno variara en función del grupo de alimentos al cual nos estemos refiriendo. En general se ha determinado que temperaturas superiores a 120°C y tiempos prolongados de procesado/cocinado, así como la elevada presencia de azúcares y aminoácidos libres, un pH cercano a la neutralidad y alta superficie de contacto en

el alimento, favorecen la formación de acrilamida.

En definitiva, la acrilamida ha vuelto a poner a prueba los conocimientos y recursos tanto de los científicos y tecnólogos como de los responsables de seguridad alimentaria y salud en general. Se ha superado la primera oleada de reacciones mediáticas y todos los sectores implicados somos conscientes de la importancia de nuestra cooperación para evaluar el riesgo real de la ingesta de diaria de acrilamida. La transparencia de las investigaciones en curso son un claro mensaje de tranquilidad al consumidor. Por otra parte el consumidor no puede quedar ajeno, debe de aplicar las mismas recomendaciones de evitar el sobrecocinado. Obviamente los alimentos deben seguir siendo cocinados en las condiciones apropiadas con el objeto de eliminar los posibles patógenos presentes, especialmente en carnes y pescados.

### Abreviaturas

- FDA = Food and Drug Administration (US)
- SNFA = Swedish National Food Administration
- IARC = International Agency for Research on Cancer
- SFC = Scientific Food Committee (EU)
- FAPAS = Food Analysis Performance Assessment Scheme
- IRMM = Institute for Reference Materials and Measurements
- BfR = Instituto Federal Alemán para la evaluación de riesgos
- FSA = Food Standard Agency
- COST = European cooperation in the field of Scientific and Technical Research
- Hb = hemoglobina
- CRAI = Carcinogenicity risk assessment index

**TABLA 1: CUADRO RESUMEN DE VALORES DE ACRILAMIDA EN DIFERENTES GRUPOS DE ALIMENTOS RECOGIDOS HASTA MARZO DE 2004. VALORES APORTADOS POR SNFA, FSA Y GRUPOS EUROPEOS (LÍNEA SUPERIOR) Y FDA (LÍNEA INFERIOR)**

Grupo	Media (min-max) – n µg/Kg producto	Grupo	Media (min-max) – n µg/Kg producto
<i>Chips</i> , patata	537 (< 50 - 3.500) – 39 453 (20 - 2.762) – 40	Café molido	200 (170 - 230) – 3 206 (45 - 365) – 53
Patatas fritas	340 (20 - 1.325) – 52	Frutos secos	117 (28 - 457) – 13
<i>Crips</i> , patata	1.312 (170 - 2.287) – 38 464 (117 - 2.762) – 40	Cerveza	30 (< 30 - 30) – 1 < 10 – 4
<i>Crips</i> , maíz	218 (34 - 416) – 7	<i>Crackers</i>	280 (< 30 - 640) – 11 191 (26 - 504) – 7
<i>Crips</i> , pan	423 (< 30 - 3.200) – 58 110 (36 - 199) – 4	Leche	16 (0 - 43) – 4
Panadería	110 (< 50 - 450) – 19 70 (0 - 364) – 22	Chocolate	75 (< 50 - 100) – 2 114 (0 - 909) – 14
Galletas	237 (36 - 432) – 8	Aceitunas negras	228 (123 - 424) – 4
Cereales desayuno	298 (< 30 - 1.346) – 29 113 (47 - 266) – 10	Salsas	17 (0 - 151) – 14
Palomitas de maíz	186 (97 - 352) – 4	Potitos	16 (< 10 - 31) – 10
Pescado y derivados	35 (30 - 39) – 4 12 – 1	Alimentos infantiles	36 (0 - 130) – 24
Vegetales	25 (0 - 83) – 8	Formula Infantiles	2 (0 - 10) – 11



## Referencias

Becalski, A., Lau, B., Lewis, D., Seaman, S. (2002) Acrylamides in Food: occurrence and sources. Poster at 116th Annual International AOAC, USA.

IARC (1994) Acrylamide. Monographs on the evaluation carcinogen risk to humans: Some industrial chemicals, Lyon, France, 60, 389-433.

Mottram, D., Wedzicha, B., Dodson, A. (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448.

Rosen, J., Hellenas, K.E. (2002) Analysis of acrylamide on cooked foods by liquid chromatography by tandem mass spectrometry. *The Analyst*, 127, 880-882.

Stadler, R., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P., Robert, M., Riediker, S. (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419, 449.

Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M. (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4998-5006.

Tareke, E., y col. (2002) Acrylamide, a cooking carcinogen?. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 517-522.

WHO (1996) Guidelines for drinking water quality. Ginebra, Suiza, 940-949.

European Commission, European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection, 2002. European Union Risk Assessment Report Acrylamide. O. O. Publications of the European Communities, Luxembourg. (ISBN 92-894-1250-X).

Mucci, L.A., Dickman, P.W., Steineck, G., Adami, H.-O., Augustsson, K., 2003. Dietary Acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder. Absence of an association in a population-based study in Sweden. *British Journal of Cancer* 88, 84-89.

Weiss, G., 2002. Acrylamide in food: uncharted territory. *Science* 297, 27.

FDA (2004) Action plan for acrylamide in food. CFSAN/Office of Plant & Dairy foods.

**AgroCSIC**

**CENTRO DEL CSIC:** Instituto del Frío.  
**Departamento:** Ciencia y tecnología de productos lácteos.  
**Nombre Investigador:** Francisco José Morales Navas.  
**E-mail:** fjmorales@if.csic.es  
**Tendencias de Investigación:**  
 Nuestra línea principal de investigación esta centrada en estudio de la denominada reacción de pardeamiento no enzimático que tan amplio impacto tiene en aspectos tanto organolépticos como nutricionales durante el procesado y cocinado de alimentos. Tres grandes objetivos han ocupado nuestros esfuerzos desde los 90; la identificación y aplicación de índices químicos de tratamiento térmico, la caracterización de compuestos bioactivos derivados de la reacción de Maillard y por último los factores implicados en la formación de acrilamida en determinadas matrices alimenticias. En ellos hemos ocupado nuestra experiencia en química de los alimentos, química analítica y tecnología de procesos. En la actualidad estamos colaborando con investigadores de otros ámbitos científicos para acometer un abordaje multidisciplinar a estas temáticas.

# BOLETÍN DE SUSCRIPCIÓN



## Deseo suscribirme a la revista CTC Alimentación.

Nombre: ..... Apellidos: .....

Empresa: .....

Cargo: .....

Domicilio: ..... Código Postal: .....

Población: ..... Provincia: .....

País: ..... Telf.: ..... Fax: .....

E-mail: .....

**Puede suscribirse por Correo:** C/ Concordia s/n. 30500 MOLINA DE SEGURA (Murcia) España.

**Teléfono:** 968 38 90 11 • **Fax:** 968 61 34 01 • **E-mail:** ctcfgalvez@ctnc.es

# Congelación de alimentos bajo alta presión

SANZ, P.D.; OTERO, L.; MOLINA-GARCÍA, A.D.; GUIGNON, B.; FERNÁNDEZ, P.P Y APARICIO, C. INSTITUTO DEL FRÍO (CSIC). 28040 MADRID.

*El empleo de altas presiones en tecnología de alimentos, se remonta a 1899, Hite realizó ensayos con alta presión en leche para intentar incrementar su conservación reduciendo la microflora. Sin embargo en aquella época no era posible este método en la industria, por lo que sus trabajos fueron olvidados hasta 1989 cuando el Ministerio de Agricultura japonés con empresas de ingeniería y alimentación formó la "Asociación para la Investigación y Desarrollo de la tecnología de altas presiones" en la industria alimentaria.*



## Introducción

Bajo la denominación genérica de tecnologías emergentes, se asiste en nuestros días, a la valoración de la efectividad de diferentes tecnologías que, de un modo incipiente, se vienen desarrollando sólo a nivel de laboratorio. De entre ellas, aparecen, por ejemplo, la de la aplicación de campos electromagnéticos, la del uso de pulsos eléctricos o la del empleo de al-

tas presiones hidrostáticas. Los trabajos básicos de tipo físico-fundamental que sustentan esta última tecnología son debidos a Bridgman (1912), quien determinó una serie importante de propiedades termodinámicas del agua en ese dominio de presiones.

Pero el empleo de altas presiones en tecnología de alimentos es todavía más antiguo. Ya en 1899, Hite realizó ensayos

con alta presión en leche para intentar incrementar su conservación reduciendo su microflora. Sin embargo, en aquella época no era posible emplear esta técnica para trabajar a nivel industrial. Así pues, sus trabajos quedaron adormecidos hasta 1989 cuando el Ministerio de Agricultura japonés, en colaboración con 21 empresas de ingeniería y alimentación nacionales, formó la "Asociación para la

investigación y desarrollo de la tecnología de altas presiones en la industria alimentaria". En 1990, la empresa japonesa Meidi-Ya introdujo en el mercado japonés las primeras mermeladas comerciales tratadas con alta presión. Esta misma empresa, posteriormente, en 1991, inició la comercialización de yogures, gelatinas, salsas y macedonias de frutas. En ese mismo año, dos empresas más, Pokka y Wakayama, instalaron equipos semicontinuos para tratar zumos bajo presión con unas capacidades respectivas de 600 y 4000 l/h respectivamente. Desde entonces, su implantación en Japón ha sido muy grande. En Europa y en USA también se está desarrollando esta tecnología. Por ejemplo, en Francia, la empresa Pernod Ricard comercializa zumo de naranja presurizado; en USA y Méjico, la compañía Avomex comercializa guacamole y en España, las empresas Espuña y Campofrío, tienen en el mercado jamón de york y otros productos cárnicos listos para un cocinado rápido.

### Principios básicos y equipamiento

Esta tecnología se basa en dos principios básicos: El Principio de Le Chatelier (todo fenómeno que se acompaña de una disminución de volumen se ve acelerado por un aumento de presión) y viceversa y la Ley isostática (a presión se transmite de forma instantánea y uniforme a través de toda la masa del producto, independientemente de su volumen). Por tanto, el tiempo de presurización es independiente del volumen de la muestra, al contrario de lo que ocurre con los tratamientos térmicos.

El dominio de aplicación de esta tecnología comprende desde los 100 MPa hasta los 1000 MPa. Por ese motivo, el equipamiento empleado en esos proce-

sos ha de ser bastante especial. El alma de esos sistemas es la vasija contenedora de las muestras. La Figura 1 muestra una de ellas, cuyo volumen ha de adaptarse lógicamente a las necesidades productivas. Completan la instalación, el sistema de termostatación, el equipamiento de presurización, las válvulas, el tubeado, el aislamiento, ...

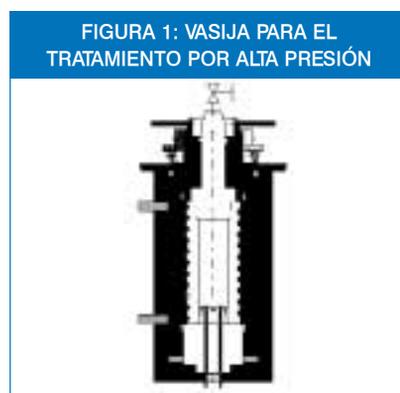
Las altas presiones, provocan desnaturalización, coagulación y gelificación sobre proteínas, los almidones y los ácidos nucleicos por modificaciones en los enlaces no covalentes. Ya en 1914, Bridgman observó la coagulación de la clara de huevo bajo presión debida a la desnaturalización de proteínas. Día a día se conocen nuevas fuentes de aplicación de las altas presiones a la tecnología de alimentos. La más general es la de la pasteurización complementaria a los tratamientos térmicos. Otras de ellas se basan en la potenciación de la gelificación del almidón, la variación de la temperatura de fusión de las grasas, obtención de nuevos compuestos y alimentos, etc. El grupo que realiza esta publicación se dedica más de lleno al estudio de los procesos de congelación y descongelación realizados en el dominio de las altas presiones y las bajas temperaturas, que es lo que se desarrolla a continuación.

### Procesos prácticos de congelación y de descongelación con altas presiones

De entre los existentes, podríamos destacar:

#### Congelación por cambio en la presión

La congelación por cambio de presión se caracteriza porque el cambio de fase viene provocado por un cambio de presión.



En este proceso, la muestra se enfría bajo presión, tal y como se indica en la Figura 2, permaneciendo en todo momento en estado líquido (tramo BC). Una vez conseguida la temperatura deseada en todo el volumen de producto se realiza una expansión hasta presión atmosférica (tramo CE). En esta expansión, la presión puede ser liberada lentamente (tramo C12E) o rápidamente (tramo CDE). Los puntos 1 y D, alcanzados en la expansión bien lenta o rápida, suponen un elevado grado de subenfriamiento y provocan una nucleación uniforme en todo el volumen de producto de pequeños cristales de hielo. Tras las expansiones rápidas, el agua permanece en estado líquido a presión atmosférica y a temperaturas por debajo de 0°C (punto D), al menos durante unos instantes (Sanz, Otero, de Elvira y Carrasco, 1997; Otero y Sanz, 2000...). Así, el agua se halla subenfriada y en estado metaestable a presión atmosférica. Las expansiones lentas conducen a condiciones metaestables sólo bajo presión (punto 1) y la curva de fusión se alcanza antes de la liberación completa de la presión, tan pronto como se produce el suficiente subenfriamiento necesario pa-

FIGURA 2: CONGELACIÓN POR CAMBIO DE PRESIÓN. PROCESO ABCDE: PROVOCADA POR UNA EXPANSIÓN RÁPIDA; PROCESO ABC12E: PROVOCADA POR UNA EXPANSIÓN LENTA

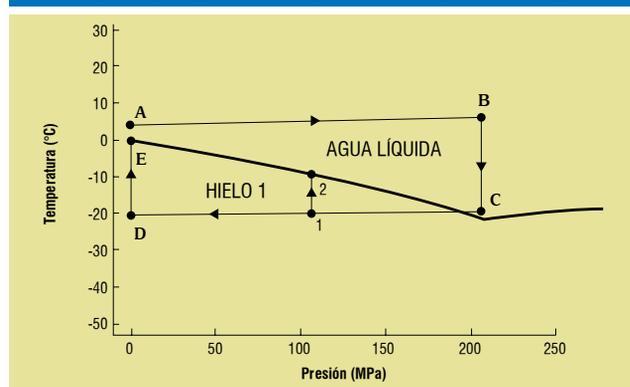
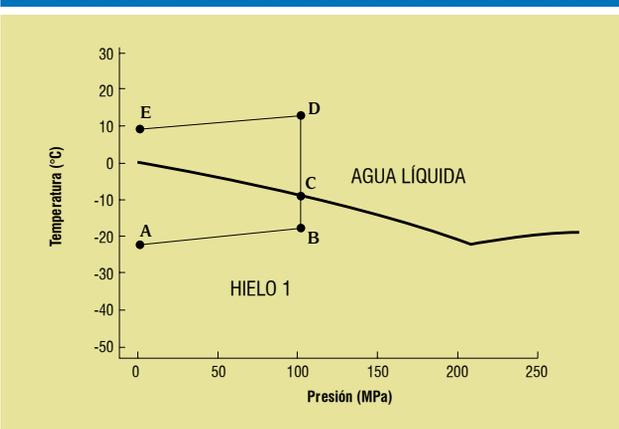
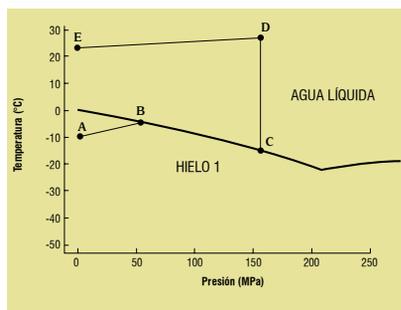


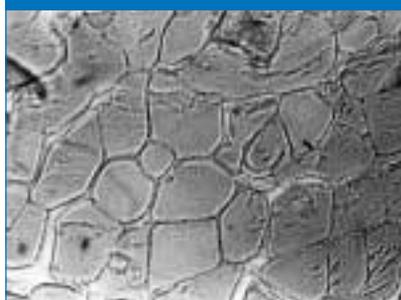
FIGURA 3: DESCONGELACIÓN ASISTIDA POR ALTAS PRESIONES



**FIGURA 4: DESCONGELACIÓN INDUCIDA POR PRESIÓN**



**FIGURA 5: SECCIÓN TRANSVERSAL DE UNA MUESTRA DE MÚSCULO DE VACUNO FRESCA**



ra promover la nucleación del hielo. Por consiguiente, la nucleación del hielo se produce, en cada uno de esos casos, a distintos niveles de subenfriamiento, que son alcanzados a distintas presiones. Así pues, cada cinética de congelación será diferente.

Las congelaciones provocadas por cambio de presión son particularmente interesantes debido al hecho de que aparecen subenfriamientos –y, por tanto, nucleación– después de la liberación de la presión, a través de toda la muestra y no sólo en su superficie. Por ese motivo, los cristales de hielo que se forman se distribuyen uniformemente en todo su volumen.

#### Descongelación asistida por alta presión

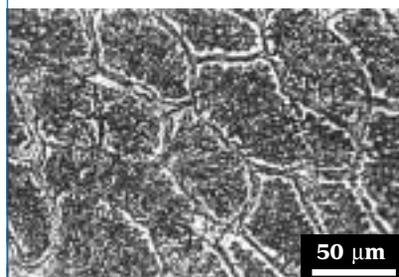
La descongelación asistida por alta presión se caracteriza porque se produce a presión constante, mayor que la atmosférica, mientras se incrementa la temperatura de la muestra por encima del punto de fusión correspondiente (Figura 4).

La descongelación se produce desde la superficie hacia el centro de la muestra, tal y como sucede a presión atmosférica.

En la práctica, es difícil de llevar a cabo este tipo de experimentos, ya que la temperatura inicial de la muestra debe ser lo suficientemente baja como para

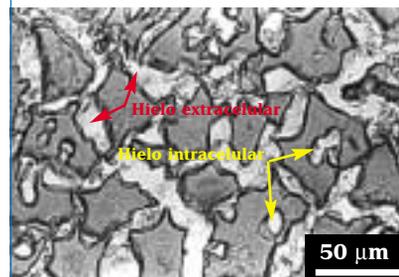
**FIGURA 6a**

Corte transversal a las fibras de carne de cerdo congelada con nitrógeno líquido. Zona superficial.



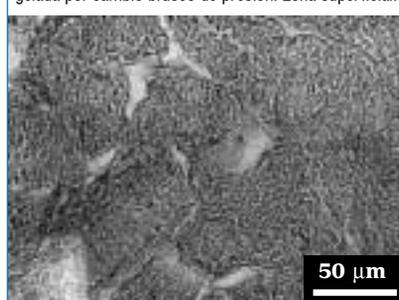
**FIGURA 6b**

Corte transversal a las fibras de carne de cerdo congelada con nitrógeno líquido. Zona central.



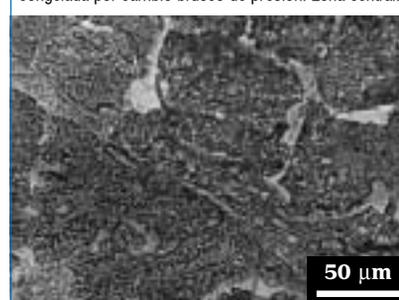
**FIGURA 6c**

Corte transversal a las fibras de carne de cerdo congelada por cambio brusco de presión. Zona superficial.



**FIGURA 6d**

Corte transversal a las fibras de carne de cerdo congelada por cambio brusco de presión. Zona central.



mantenerse por debajo de la curva de fusión durante todo el proceso de compresión (Otero y Sanz, 2003). Por los mismos motivos, no es posible alcanzar elevadas presiones.

#### Descongelación inducida por presión

La descongelación inducida por presión se caracteriza porque la transición de fase se inicia por un cambio de presión y se continúa a presión constante (Figura 4). Durante la compresión, una vez se alcanza la curva de cambio de fase (punto B) se inicia la descongelación que se ve reflejada en un descenso en la temperatura de la muestra (tramo BC). Una vez alcanzada la presión de trabajo (punto C), el proceso de descongelación se completa a presión constante durante el tramo CD.

Para dos muestras a una misma temperatura inicial, cuanto mayor es la presión de trabajo, el descenso de temperatura es mayor y menor la duración del *plateau* debido a que se descongela una mayor cantidad de agua durante la presurización. Además, a mayor presión, menor es el calor latente que ha de suministrarse, mientras que el gradiente térmico entre la fuente de calor y el frente de fusión es mayor.

Para procesos de descongelación a igual presión de trabajo, las muestras con una temperatura inicial mayor se descongelan más deprisa, debido a que hay que suministrar menor cantidad de calor para alcanzar la curva de cambio de fase durante la presurización y, por tanto, antes inician su descongelación.

Efectos de la congelación por cambio brusco de presión sobre la microestructura de los alimentos.

Con objeto de analizar los efectos de este tipo de congelación sobre la microestructura de los alimentos, se describe, a continuación, una serie de resultados obtenidos para los alimentos de origen animal y para los de origen vegetal. En general, se han congelado alimentos enteros y de gran volumen. Eso ha sido así, debido a la necesidad de poner de manifiesto diferencias acusadas en las velocidades de congelación, como consecuencia de los gradientes térmicos provocados en la congelación, las cuales son, obviamente, más visibles en esos casos. La Figura 5 muestra la microestructura óptica de un músculo de carne fresca. Los procesos tradicionales de congelación están completamente regidos por la presencia de gradientes térmicos. Por ejemplo, una congelación con un túnel

de aire posee un coeficiente de transmisión superficial menor que cuando se congela con un método criogénico. En estos casos, cuanto mas alta es la velocidad de congelación, más “calidad” se aporta al alimento. La congelación criogénica con nitrógeno líquido es capaz de extraer suficiente calor para producir la nucleación dentro de las fibras de carne y, por tanto, el agua permanece dentro de las células. La Figura 6(a) muestra la multitud de pequeños cristales intracelulares que se producen en la superficie del producto, en contacto con el medio de congelación, con un diámetro máximo medido de 8  $\mu\text{m}$ . También se producen cristales extracelulares; sin embargo, éstos ocupan poco volumen relativo; ya que, aproximadamente el 90% de agua en la carne fresca se encuentra en el espacio intracelular. La velocidad de congelación es, en esta zona, muy alta con un tiempo característico de congelación de 7 minutos. Sin embargo, debido a los gradientes térmicos que se establecen, esto es sólo posible en la superficie del producto. En el centro de la muestra, el tiempo característico se ha triplicado al disminuir la velocidad de congelación, alcanzando los 21 minutos. Por ello, la zona interna presenta cristales de hielo intra- y extracelulares, Figura 6(b), con diámetros medios mucho mayores que los correspondientes a la superficie, que distorsionan, de nuevo, las fibras. Por tanto; desde el punto de vista microestructural, cuando se trabaja con alimentos grandes, los beneficios atribuidos a la congelación criogénica se limitan sólo a su zona externa; ya que, los gradientes térmicos que se establecen impiden que en el centro de los productos se alcancen velocidades de congelación altas. La principal limitación que presentan todos estos procesos de congelación, a presión atmosférica, es que en alimentos grandes, tras la nucleación cerca del borde refrigerado, se alcanza pronto la temperatura de cambio de fase debido a la salida de calor latente, y; por tanto, no se forman más núcleos. Así, la congelación del agua que queda todavía en estado líquido se produce por la subsecuente extracción de calor, principalmente por conducción, a través del tejido congelado. Por ello, los pocos núcleos de hielo formados en el sistema crecen desde la superficie del producto hasta su centro, de forma dendrítica, convirtiéndose en grandes cristales de hielo a expensas del agua extraída de las fibras.



Alimentos congelados bajo alta presión.

Los distintos tiempos característicos de congelación que se consiguen para un mismo proceso en la superficie y en el centro de la muestra (prácticamente se triplican desde un punto a otro en todos los procesos estudiados en este experimento) ponen de manifiesto los efectos negativos de los gradientes térmicos que se establecen entre el centro térmico del alimento a congelar y el medio de conge-

lación. Esto es de particular importancia en alimentos de gran volumen en los que las velocidades de congelación pueden ser elevadas en la superficie del producto, pero disminuir mucho hasta el centro. Las fotografías correspondientes a carne congelada por cambio brusco de presión (Figuras 6(c) y 6(d)) muestran, tanto en el centro como en la superficie de la muestra, la existencia de gran cantidad

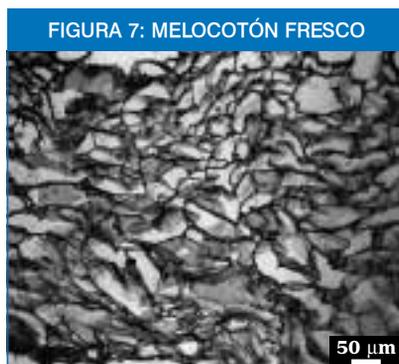


FIGURA 7: MELOCOTÓN FRESCO



FIGURA 8: MANGO CONGELADO EN TÚNEL. ZONA SUPERFICIAL DE LA FRUTA



to se debe a que, tras la expansión adiabática, aproximadamente el 30% del agua presente en la muestra cristaliza de manera instantánea y uniforme allí donde se encuentre, debido al alto grado de subenfriamiento que se alcanza en todo el volumen de la misma, dada la naturaleza isostática de la presión. Tras esta cristalización, se alcanza la temperatura de cambio de fase y el agua que queda sin congelar lo hace ya a presión atmosférica, de manera similar a los sistemas clásicos de congelación; pero, con la ventaja de disponer de núcleos de hielo uniformemente repartidos en todo el volumen de la muestra.

Si la velocidad de congelación, tras la expansión es suficientemente alta, el agua que queda sin congelar lo hace adheriéndose a la gran multitud de núcleos que hay dispersos por todo el volumen de la muestra, de manera que el resultado final es una gran cantidad de pequeños cristales de hielo de forma granular, distintos a los cristales de forma dendrítica típicos de aquellas congelaciones en las que la nucleación sólo se produce en la superficie, único sitio donde se podían alcanzar los subenfriamientos necesarios para iniciar la nucleación. Los cristales de hielo aparecen con forma redondeada lo que demuestra, claramente, la forma granular de los cristales de hielo formados.

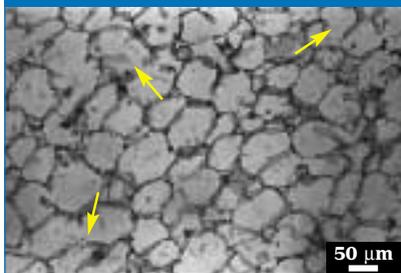
La Figura 7 muestra la microestructura de un melocotón fresco. Las paredes celulares aparecen enteras, sin daños, tal y como corresponde. La estructura en la fruta fresca aparece, sin embargo, más comprimida que en las muestras congeladas que se presentan a continuación.

El proceso de congelación en túnel, requiriendo un tiempo característico de congelación de aproximadamente 10 minutos en la superficie de las frutas y de 83 minutos en el centro, para el caso del melocotón, y 91 minutos, para el caso

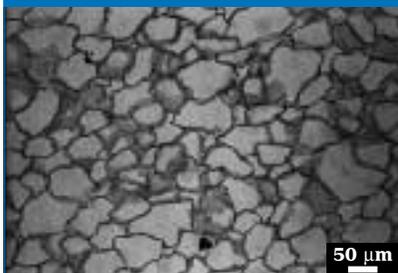
de pequeños cristales de hielo extra- e intracelulares, estos últimos con un diámetro máximo de 7  $\mu\text{m}$ . Los cristales intracelulares, como se ha visto en las congelaciones clásicas, son sinónimo de altas velocidades de congelación. En las congelaciones realizadas a presión atmosférica, sólo se consiguieron cristales intracelulares, con un diámetro equivalente medio de 3  $\mu\text{m}$ , en la congelación con ni-

trógeno líquido; y esto, sólo en la superficie de las muestras, donde se alcanzaba un tiempo característico de congelación de 7 minutos. En las congelaciones por cambio brusco de presión, los tiempos característicos son marcadamente mayores tanto en la superficie (20 minutos) como en el centro del producto (50 minutos); sin embargo, se consiguen diámetros de cristal de hielo muy pequeños. Es-

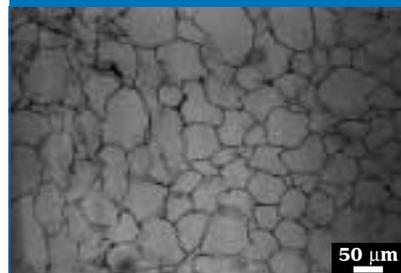
**FIGURA 9: MANGO CONGELADO CON NITRÓGENO LÍQUIDO. ZONA CENTRAL DE LA FRUTA.**



**FIGURA 10: MELOCOTÓN CONGELADO POR CAMBIO BRUSCO DE PRESIÓN. ZONA SUPERFICIAL DE LA FRUTA.**



**FIGURA 11: MELOCOTÓN CONGELADO POR CAMBIO BRUSCO DE PRESIÓN. ZONA CENTRAL DE LA FRUTA.**



del mango (ya que, el tamaño de este último es mayor). Así, es en este tipo de congelación donde se observa los mayores daños celulares provocados por el crecimiento de los cristales de hielo. Estos daños ya son visibles en las zonas más superficiales de la fruta que muestran las paredes celulares rotas, tal y como se aprecia en la Figura 8. En ella se muestra la zona superficial de un mango congelado en túnel y algunas de las paredes celulares rotas se señalan con flechas amarillas. Las micrografías obtenidas del centro de la fruta congelada en túnel mostraron que los daños aumentaban de importancia desde la superficie del producto hacia el interior del mismo, igual que ocurría para el caso de la carne ya descrito.

La congelación con nitrógeno líquido, a pesar de caracterizarse por ser un proceso muy rápido, con un tiempo característico de congelación aproximadamente tres veces menor que el que se observó para el túnel, en los experimentos realizados, sufre, sin embargo, también los efectos negativos de los gradientes térmicos en productos de gran volumen como los que se han congelado. Así, en la superficie de las frutas se formaron cristales de hielo extracelular de reducido tamaño; ya que, en las micrografías obtenidas no se observaron daños relevantes en las paredes celulares; sin embargo, en el centro, las roturas ocasionadas en las paredes, Figura 9, delataban la existencia de cristales extracelulares mayores. Además, hay que destacar que en el transcurso de la congelación se produjeron daños por agrietamiento (*freeze-cracking*), tanto en melocotón como en mango. Este daño crítico e irreversible se produce, debido a que la rápida congelación de la superficie del producto forma una coraza de hielo que se opone a la posterior expansión del volumen del alimento cuando la parte interna de éste, que inicialmente está sin congelar, sufre la transición de fase. Así, cuando los esfuerzos que se generan en el interior del producto superan la resistencia del material congelado en la superficie se produce el agrietamiento.

La congelación por cambio brusco de presión fue la que produjo los menores daños en la microestructura de los productos vegetales estudiados a las velocidades de congelación que se experimentaron. Así, en la superficie de las frutas (Figura 10) no se observaron daños apreciables. Las paredes celulares aparecen

enteras y las micrografías parecen corresponder a fruta fresca. Sólo se diferencian de éstas en que la estructura del tejido no se muestra comprimida, puesto que la fruta congelada sufre en menor medida la deshidratación del proceso de fijación previo a la observación microscópica, como se comentó anteriormente. Las micrografías correspondientes al centro de la fruta (Figura 11) muestran ya algunas paredes celulares rotas, provocadas por los gradientes térmicos que se establecen cuando la congelación, tras la expansión, se completa a presión atmosférica. Estos daños observados son pequeños, pero podrían reducirse al mínimo, como se comentó para el caso de la carne, aplicando tras la expansión potencias frigoríficas mayores. Por otra parte, es importante destacar también que, en ningún caso se observaron daños por agrietamiento, dado que la nucleación inicial del hielo es instantánea y homogénea en todo el volumen del producto, evitándose así esfuerzos internos posteriores. Sin embargo, sí se detectaron roturas en los huesos de las frutas producidas, presumiblemente, por las cámaras de aire existentes en el interior de los huesos, de mayor compresibilidad, que crearon importantes tensiones, capaces de romper el tejido leñoso de los mismos, durante la fase de compresión del proceso de congelación.

### Consideraciones finales

La congelación y descongelación asistidas por presión se benefician de la disminución de calor latente del agua con la presión. Los procesos, por tanto, se llevan a cabo más rápido que sus homólogos a presión atmosférica. En el caso de la descongelación, dado que la temperatura de cambio de fase es menor, el gradiente térmico entre la fuente de calor y la temperatura de cambio de fase es también mayor, lo que contribuye a una mayor celeridad en el proceso. Un beneficio añadido es además el hecho de que la presión aporta una reducción en la carga microbiana del producto. En el caso de la congelación por cambio de presión y la descongelación inducida por presión son importantes los cambios de fase que se producen durante la expansión y la compresión, respectivamente. Para la congelación, los elevados grados de subenfriamiento que se consiguen dan lugar a nucleaciones generalizadas en todo el volumen de la muestra con formaciones de cris-

tales de hielo homogéneos y de forma granular, lo que supone un menor daño estructural.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado mediante el proyecto español "Plan Nacional de I+D+I (2003-2006) MICYT, AGL 2003-06862-C02-01/ALI project; y por el proyecto de la Comisión de la UE, RTD programa "Quality of Life and Management of Living Resources", proyecto QLK1-CT-2002-D2230. Éste no refleja, necesariamente, los puntos de vista de la referida Comisión y no anticipa su política científica en ese área.

### Bibliografía

- Bridgman, P. W. 1912. Water, in the liquid and five solid forms, under pressure. *Proceedings of the American Academy of Arts and Science*, XLVIII (13): 439-558.
- Hlite, B. H. 1899. "The effect of pressure on the preservation of milk". *West Virginia Univ. Agr. Expt. Sta, Morgantown. Bull.* 58: 15.
- Otero, L., Sanz, P.D. 2000. High-pressure shift freezing. Part 1. Amount of ice instantaneously formed in the process. *Biotechnology Progress*, 16: 1030-1036.
- Otero, L., Sanz, P.D. "High Pressure Assisted and High Pressure Induced Thawing: Two Different Processes". *Journal of Food Science*, 2003, Oct, 2523: 2528.
- Sanz, P.D.; Otero, L.; de Elvira y C. Carrasco, J.A. 1997. Freezing processes in high-pressure domains. *International Journal of Refrigeration*, 20: 301-307. ■



CENTRO DEL CSIC: Instituto del Frío. José Antonio Nováis, 10. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

Web: [www.csic.es/ifrio/ingind.htm](http://www.csic.es/ifrio/ingind.htm)

Departamento: Departamento de Ingeniería.

Nombre Investigador: Dr. Pedro D. Sanz.

E-mail: [psanz@if.csic.es](mailto:psanz@if.csic.es)

Tendencias de Investigación:

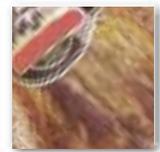
- Tecnología de Alimentos con Altas Presiones.
- Modelización de procesos de Ingeniería de Alimentos.

*Estamos actualizando la página web del Instituto conteniendo más información específica del Proyecto del Plan Nacional que estamos llevando a cabo (además de otro europeo).*



# Instituto *de* Agroquímica y Tecnología *de* Alimentos

Influencia de la materia prima y el proceso de fabricación en la generación enzimática de componentes responsables del aroma y sabor del jamón curado



La nueva Biotecnología apuesta por la vinificación

El análisis sensorial en el control y aseguramiento de la calidad de los alimentos: una posibilidad real



# Influencia de la materia prima y el proceso de componentes responsables del aroma

El proceso de curado del jamón se remonta a tiempos inmemoriales cuando se utilizaba preferentemente como técnica de conservación para la provisión de alimento en tiempos de escasez. Hoy en día, y gracias al uso extendido de la refrigeración y a un mayor conocimiento de la tecnología del curado, se ha modificado y mejorado el proceso dando lugar a productos sabrosos y exquisitos que están presentes en numerosas ceremonias y eventos así como en los restaurantes más prestigiosos.

El jamón, al igual que todas las carnes, está constituido por agua, proteínas, lípidos y pequeñas cantidades de vitaminas y minerales. El jamón procedente del cerdo recién sacrificado apenas presenta aromas, tan solo cierto aroma a sangre fresca con algunas connotaciones según el cruce y alimentación. Sin embargo, conforme se procede a la salazón y posterior curado, el jamón adquiere un progresivo aroma y sabor, cada vez más característico como consecuencia de numerosas reacciones bioquímicas y químicas, reguladas por la temperatura, grado de humedad en su interior y tiempo de curado. Actualmente, existen grandes diferencias en la calidad sensorial de los jamones curados debido tanto a las diferencias en la materia prima como a los distintos procesos empleados para su elaboración. Un claro ejemplo lo tenemos en cualquier establecimiento dedicado a la venta de jamón curado. Así pues, se describen a continuación los principales efectos de la materia prima y el proceso de elaboración en la calidad del jamón curado.

## Importancia de la materia prima para la elaboración de jamón curado

Existen dos grandes grupos de jamones curados en nuestro país; un grupo

mayoritario compuesto por aquellos jamones elaborados a partir de distintos cruces genéticos de cerdo blanco y otro, minoritario pero extremadamente selecto, compuesto por los elaborados a partir de cerdo Ibérico como línea genética mayoritaria. Como se describe a continuación, el origen de los jamones tiene una gran influencia en la calidad final y de ahí que las fábricas de jamón curado deban extremar al máximo el conocimiento del historial completo de los jamones que reciben para procesar.

La calidad depende de muchos factores relacionados con la materia prima, entre ellos la genética, edad, sexo y alimentación. Los principales efectos de la materia prima en la calidad son pues los siguientes:

1) Incidencia de defectos por stress. La susceptibilidad al stress es típico de ciertas razas como Pietrain y Landrace Belga que han experimentado mucho auge por su reducida cantidad de grasa y buena conformación y que las hacen idóneas para el

**“La calidad depende de muchos factores relacionados con la materia prima: genética, edad, sexo, alimentación, etc.”**

consumo de carne fresca. Por el contrario, estar razas son propensas a desarrollar defectos conocidos como PSE (carnes pálidas, blandas y exudativas) o DFD (carnes oscuras, firmes y secas) por su susceptibilidad al stress que generan un metabolismo postmortem muy acelerado con importantes cambios químicos y bioquímicos que dificultan y desaconsejan su uso para el jamón curado. Otras razas, como Duroc o Large White, dan mayores cantidades de grasa y no presentan dichos problemas de susceptibilidad al stress por lo que son más adecuadas para su uso en la elaboración de jamón curado. Además, sus índices productivos y reproductivos son similares a los de otras razas por lo



que a su mejor calidad sensorial unen una buena aptitud tecnológica.

2) La cantidad de grasa y el nivel de infiltración de la grasa intramuscular depende, fundamentalmente, del cruce genético. Así, aquellos cruces con Duroc dan buenos niveles de infiltración mientras que si abunda el Pietrain, los niveles de grasa infiltrada son mínimos. Los cerdos de raza Ibérica dan una gran cantidad de grasa, gran parte de la misma infiltrada. La grasa infiltrada aporta jugosidad y aromas adicionales al jamón. Por el contrario, también hay que recordar que afecta a la difusión de sal y al secado que requieren un mayor tiempo. No obstante, las mayores ventajas, tanto sensoriales como tecnológicas, que la raza Duroc aporta al jamón curado han recomendado su inclusión en los reglamentos de distintas denominaciones de origen.

**“El jamón adquiere un aroma y sabor característico como consecuencia de reacciones bioquímicas”**

# de fabricación en la generación enzimática y sabor del jamón curado

FIDEL TOLDRÁ VILARDELL. PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL CSIC, INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (CSIC). VALENCIA.



terística de la nitrificación (reacción de la mioglobina con el óxido nítrico procedente del nitrito). Normalmente, se prefieren cerdos adultos porque acumulan mayor cantidad del pigmento natural mioglobina. De ahí que el cerdo Ibérico, que se sacrifica ya adulto, tenga una coloración más intensa que los jamones producidos a partir de cerdos blancos que se suelen sacrificar con 6 meses de edad a lo sumo. Otro aspecto importante de la uniformidad del color es la idoneidad del proceso de secado. Aquellos jamones que han experimentado un secado demasiado rápido presentan una excesiva pérdida de humedad en las zonas exteriores y retienen más humedad en las zonas internas. Este defecto se conoce como encostramiento del jamón y se detecta porque al corte, estos jamones presentan una zona externa rojiza oscura y un interior con coloraciones rosáceas pálidas que delatan el exceso de humedad.

5) Edad del animal. Conforme el animal envejece, sus niveles de enzimas musculares varían. Así, los animales más adultos presentan menores niveles de proteasas de tipo endo, es decir, aquellas que cortan las proteínas de la estructura y hacen la carne más tierna pero, por el contrario, tienen mayores niveles de proteasas de tipo exo, es decir, aquellas capaces de generar pequeños péptidos y aminoácidos libres que contribuyen al sabor del jamón.

6) Aroma y sabor. Como se ha mencionado anteriormente, y se verá también en el apartado siguiente relativo al proceso, la materia prima resulta esencial para conseguir un excelente aroma y sabor.

3) La composición en ácidos grasos de la grasa de cobertura. La composición de la grasa depende esencialmente de la alimentación del animal que es monogástrico y, por tanto, refleja en su tejido graso la composición de las grasas de las que se alimenta. Aquella alimentación rica en ácidos grasos insaturados propiciará las reacciones de oxidación durante el proceso de curado dando mejores aromas. Este es el caso de la bellota, rica en ácido oleico y ácidos grasos poliinsaturados que dan lugar a aromas exquisitos durante el curado estando además protegidos de una excesiva oxidación por los propios antioxidantes naturales (como la vitamina E) de la bellota. Sin embargo, se deben cuidar las alimenta-

ciones ricas en ácidos grasos insaturados y controlar la oxidación para evitar un exceso de la misma que se traduce en el enranciamiento que se detecta fácilmente por el color amarillento de la grasa y los aromas rancios.

**“Algunos de los aromas típicos del jamón, se producen como consecuencia de la oxidación ácidos grasos insaturados”**

4) La coloración al corte. Se trata de un aspecto muy importante ya que la primera impresión del consumidor es la visual. Debe ser uniforme y con una coloración rojizo-rosáceo, típica del curado y caracte-

Una gran cantidad de los aromas típicos del jamón se producen a partir de la oxidación controlada de ciertos ácidos grasos insaturados. Esta proporción de ácidos grasos depende en gran medida de

“Desarrollar un correcto proceso de secado es una tarea difícil que requiere de gran experiencia y dedicación”

la alimentación que ha recibido el animal, especialmente durante los últimos 30-40 días. Otro factor de importancia es la genética del animal ya que los enzimas implicados en la hidrólisis de proteínas y lípidos (proteasas y lipasas, respectivamente) varían según el cruce genético y, por tanto, producirán mayor o menor intensidad de aroma y sabor según sean los niveles enzimáticos.

7) Olor sexual. Diversos compuestos como la androstenona y el escatol pueden acumularse en exceso en los cerdos machos no castrados de edad adulta y generar olores anómalos, conocidos como olor sexual y que se acentúan a lo largo del proceso. El problema de la no castración suele ser debido a que los machos enteros crecen más y mejor, con una mayor eficiencia de la alimentación y con menor acumulación de grasa. Precisamente al objeto de evitar la potencial aparición de este defecto es por lo que diversas empresas priman la elaboración de jamón curado a partir de hembras.

### Importancia del proceso de elaboración del jamón curado

El proceso de elaboración es largo y más complejo de lo que a simple vista pueda parecer. Por una parte, existen unos procesos de tipo físico consistentes en la aportación de sal y nitrificante du-

rante el salado y su difusión durante el postsalado hasta alcanzar una homogeneidad, más o menos perfecta, en toda la pieza. Por otra, un proceso de difusión del agua muscular desde el interior de la pieza hasta la zona externa y una posterior evaporación durante el postsalado y secado. Desarrollar un correcto proceso de secado es una tarea difícil que requiere de gran experiencia y dedicación, con una inspección diaria de los secaderos y control de la humedad relativa y velocidad de aireación según lo requieran los jamones. Cabe destacar que el equilibrio entre las velocidades de difusión del agua a través de la pieza y de evaporación hacia el medio ambiente resulta esencial para evitar el encostramiento, defecto detallado con anterioridad.

Pero los cambios más importantes son consecuencia de reacciones bioquímicas (de tipo enzimático) y químicas que se describen a continuación:

### Reacciones bioquímicas

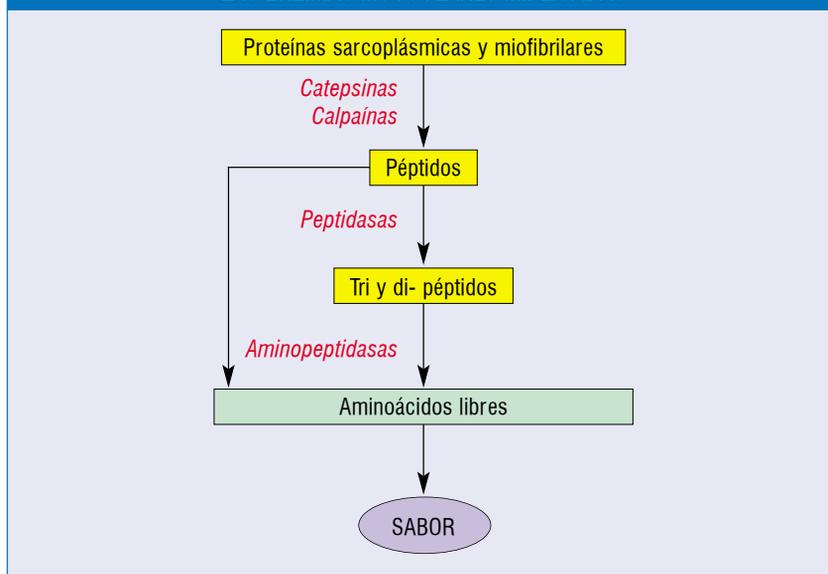
Estas reacciones son fundamentalmente de dos tipos, proteólisis y lipólisis. Consisten en la actuación de los enzimas endógenos del propio músculo como son las proteasas y lipasas sobre las proteínas y lípidos. Como se ha mencionado anteriormente, los niveles de estos enzimas varían según la genética animal y la edad. La



mayoría de los enzimas musculares son estables durante todo el proceso de curado normal pero también se ha detectado actividad residual incluso tras más de dos años de curado de jamón Ibérico.

La proteólisis consiste en una cadena sucesiva de actuación sobre las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares de distintos enzimas proteolíticos musculares. Esta cadena se muestra en la figura 1. El primer eslabón consiste en la rotura de las proteínas responsables de la estructura por parte de proteasas de tipo endo, como son las calpaínas y catepsinas, dando como resultado una mejora de la terneza. Los siguientes eslabones consisten en la sucesiva actuación de proteasas de tipo exo, como son peptidasas y aminopeptidasas, para generar un buen número de pequeños péptidos y aminoácidos libres que, una vez superan el umbral de detección, contribuyen al sabor. Según qué aminoácidos predominen, el sabor será más dulce, amargo o salado. Además, algunos de estos aminoácidos también sirven de precursores de ciertos aromas.

FIGURA 1: ESQUEMA DE LA PROTEOLISIS EXISTENTE EN LAS PROTEÍNAS DEL JAMÓN DURANTE EL PROCESO DE CURADO. SE INDICAN EN CURSIVA LAS ENZIMAS MUSCULARES IMPLICADAS





ma natural en dicho tejido. Las reacciones de lipólisis son muy importantes como precursoras del aroma especialmente cuando se generan ácidos grasos insaturados libres ya que, una vez liberados, son más susceptibles de oxidación y conversión en compuestos volátiles con determinados y característicos aromas.

### Reacciones químicas

Las principales reacciones químicas que generan compuestos volátiles con aromas característicos se muestran en la figura 3. Aquellas que aportan un mayor número de compuestos volátiles son las reacciones de oxidación de los ácidos grasos libres insaturados que se han generado por lipólisis. Los productos de esta oxidación son compuestos volátiles de tipo aldehídos y cetonas, fundamentalmente que aportan aromas característicos. También se han detectado ésteres resultantes de la interacción entre ácidos grasos libres y alcoholes generados por oxidación lipídica. La oxidación se ve favorecida por la cantidad de sal añadida al jamón, que actúa como prooxidante, así como por otros factores típicos como la incidencia de radiaciones (luz), presencia de hierro en la mioglobina, calor, enzimas oxidativas presentes en el músculo, etc. La presencia de nitrito en el jamón, procedente de la reducción del nitrato inicialmente añadido, ejerce cierta acción antioxidante y evita una excesiva oxidación que podría deteriorar el aroma final hacia notas rancias. La presencia de antioxidantes naturales como la vitamina E también actúan en el mismo sentido.

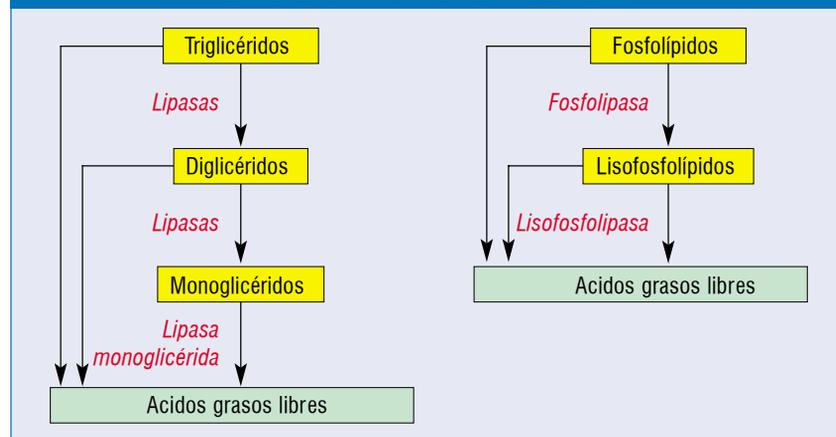
Otras reacciones consisten en la transformación de aminoácidos azufrados en compuestos volátiles (aldehídos ramificados) con aromas muy característicos. Se han detectado numerosos compuestos volátiles pertenecientes a las familias de los hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y cetonas. Finalmente, existen diversas rutas de formación de compuestos aromáticos por interacción entre los productos de origen proteico con los de origen lipídico.

Las velocidades a las que se desarrollan todas estas reacciones van a depender en gran medida de las condiciones del proceso, especialmente en el salado (cantidades de nitrato y sal incorporados) y en el curado (temperatura, humedad relativa y tiempo). Además, se debe tener presente que el aroma final es función del conjunto de los compuestos volátiles y, por tanto, le afectan multitud de factores como son las cantidades relativas de

La lipólisis genera ácidos grasos libres por rotura de su enlace con los triglicéridos y fosfolípidos. Según la lipólisis tenga lugar en los lípidos intramusculares o en los del tejido adiposo, intervendrán unos tipos de enzimas u otros, tal como se muestra en la figura 2. Los lípidos in-

tramusculares están compuestos por triglicéridos y fosfolípidos, actuando sobre ellos las lipasas y fosfolipasas musculares, respectivamente. En el caso del tejido adiposo, la grasa está compuesta fundamentalmente por triglicéridos sobre los que actúan las lipasas presentes de for-

FIGURA 2: ESQUEMA DE LA LIPÓLISIS EXISTENTE EN LA GRASA DEL JAMÓN DURANTE EL PROCESO DE CURADO. SE INDICAN EN CURSIVA LAS ENZIMAS MUSCULARES IMPLICADAS



cada compuesto, umbrales de detección, proporciones, etc.

En resumen, el aroma y sabor finales dependen, fundamentalmente, del nivel de enzimas proteolíticas y lipolíticas, que son función de la genética y la edad, así como del perfil de ácidos grasos libres ge-

nerados y de los niveles de antioxidantes que son función de la alimentación del animal. Se observa pues, que se trata de un proceso bastante complejo, con muchas variables y parámetros a controlar y que exige, cada vez más, de un mayor nivel de conocimientos y experiencia. ■



**CENTRO DEL CSIC:** Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.  
**Laboratorio:** Ciencia de la Carne.

**Departamento:** Ciencia de Alimentos.

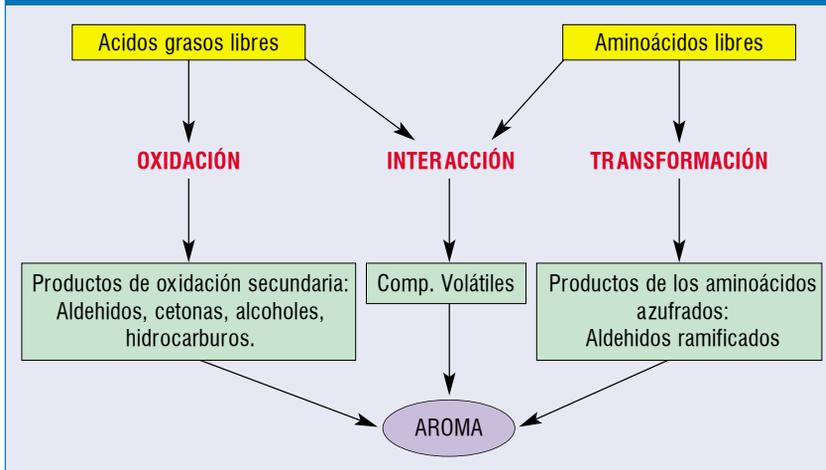
**Nombre Investigador:** Fidel Toldrá Vilar-dell, Dr. C. Químicas y Profesor de Investigación del CSIC.

**E-mail:** ftoldra@iata.csic.es

**Tendencias de Investigación:**

- Evaluación de la calidad de la carne para su consumo en fresco.
- Aptitud tecnológica de la carne como materia prima para su transformación en productos.
- Desarrollo de métodos rápidos on-line para la predicción de la calidad tecnológica de la carne.
- Mejora del valor nutritivo de la carne y productos cárnicos.
- Reducción del contenido en sal de los productos cárnicos curados.
- Mecanismos bioquímicos de tipo enzimático involucrados en la generación del aroma y sabor en productos cárnicos, especialmente en jamón y embutidos curados.
- Reacciones químicas de formación del aroma y su interacción con la matriz proteica en productos curados (jamón y embutidos).

**FIGURA 3: ESQUEMA DE LAS PRINCIPALES REACCIONES QUÍMICAS EXISTENTES DURANTE EL PROCESO DE CURADO DEL JAMÓN**



**TECNIA**  
automatización, s.l.

- Automatización de maquinaria
- Programación de PLC`S
- Cuadros eléctricos de automatismos
- Robot industriales
- Equipos de control calidad

**SOMOS  
ESPECIALISTAS**

Pol. Indust. La Polvorista. C./, Ricote s/n  
30.500 Molina de Segura. MURCIA  
Tel. 968 641 036. Fax 968 640 771.  
www.tecniasl.com info@tecniasl.com

# La nueva Biotecnología apuesta por la vinificación

PALOMA MANZANARES Y MARGARITA OREJAS. DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC), APARTADO DE CORREOS 73, 46.100 BURJASSOT. VALENCIA.



Se podría considerar que la elaboración del vino es simultánea a la aparición de la propia civilización. Los primeros testimonios del cultivo de viñedos parecen datar del año 7000 a.C., en la antigua Mesopotamia; existen también evidencias de la producción de vino, por egipcios y fenicios, hacia el año 5000 a.C., y se considera a griegos y romanos como los verdaderos impulsores de la viticultura en Occidente. El siglo XVII representa el comienzo de los métodos modernos del cultivo, producción y almacenamiento de vino, pero no es hasta mediados del

siglo XIX cuando Louis Pasteur demuestra que las levaduras son las responsables de la fermentación alcohólica del mosto de uva; si bien, como se muestra en este artículo, la conversión de mosto de uva en vino, en estos momentos, puede llegar a ser algo más controlado, que las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo con anterioridad.

Desde el punto de vista microbiológico, la transformación del mosto de uva en vino o vinificación es un proceso complejo en el que intervienen distintos microorganismos, y donde las levaduras, principal-

mente *Saccharomyces cerevisiae*, juegan el papel más destacado. Durante la vinificación las levaduras utilizan los azúcares y otros componentes del mosto para su crecimiento, produciendo etanol, anhídrido carbónico, y en menor medida otros compuestos responsables de la composición química y las cualidades sensoriales del vino. Desde un punto de vista bioquímico, el vino puede considerarse como un producto de la transformación enzimática del mosto de uva. Un esquema del proceso de elaboración de vinos blancos y tintos aparece en la Figura 1.

En las últimas décadas, coincidiendo con el avance de la Biotecnología, se han desarrollado nuevas técnicas de vinificación, que incluyen, entre otras, la utilización de cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* (para normalizar la microbiota inicial y dar lugar a fermentaciones homogéneas año tras año), y el empleo de enzimas (para solucionar problemas puntuales del proceso y mejorar la calidad del producto final). El uso de levaduras seleccionadas, capaces de conducir la fermentación alcohólica e imponerse al resto de levaduras presentes, abre la posibilidad de aplicar técnicas de ingeniería genética a la levadura vínica para obtener nuevas cepas capaces de producir, a lo largo de la fermentación, las enzimas de interés en enología cuya adición se realiza de forma regular. Asimismo, las técnicas de ADN recombinante se están aplicando a la vid, donde se están produciendo importantes avances (como por ejemplo la producción de plantas resistentes a ciertas enfermedades víricas y fúngicas) y a los microorganismos productores de los preparados enzimáticos comerciales de uso en enología (por ejemplo para conseguir mayores rendimientos y preparados más específicos).

Mientras que la utilización de levaduras seleccionadas, en forma de levaduras vínicas secas activas, y de preparados enzimáticos es una práctica generalizada en las bodegas desde la década de los 70, el empleo de vides o levaduras vínicas modificadas genéticamente se enfrenta al rechazo que existe en estos momentos, principalmente en la Unión Europea, hacia los alimentos modificados genéticamente. Aunque en algunos países ya se está evaluando la posibilidad de producir vinos transgénicos, la Organiza-

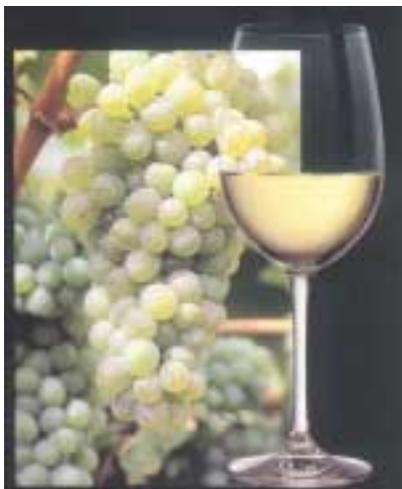
ción Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V.) no ha aceptado, por el momento, ni las viñas de origen transgénico, ni tampoco el uso de microorganismos modificados para la vinificación. De hecho, las levaduras y las uvas transgénicas son, más que una realidad, una alternativa de futuro para mejorar el proceso de vinificación y conferir nuevas características a los vinos.

En el Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) se está realizando un importante esfuerzo en la selección y caracterización de levaduras vínicas y de enzimas de interés en enología, en la clonación de los genes que las codifican y en la construcción de nuevas cepas de levaduras vínicas que mientras llevan a cabo la fermentación del mosto secretan eficazmente las enzimas de interés; además se está trabajando en la construcción de hongos hiperproductores de dichas enzimas y en la ingeniería pro-teica de las mismas para mejorar sus ca-

racterísticas enológicas. Este artículo pretende dar una visión actualizada sobre el empleo de enzimas en enología, a la vez que revisa los avances conseguidos en la obtención de cepas de levaduras vínicas transgénicas.

### La importancia de las enzimas en enología

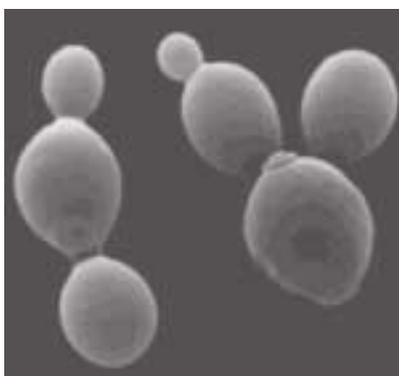
Las enzimas juegan un papel fundamental en el proceso de obtención de vino a partir de mosto de uva, es por tanto fundamental entender la naturaleza y el comportamiento de las distintas enzimas que intervienen durante la vinificación, para poder así potenciar la actuación de las enzimas beneficiosas e inhibir aquellas cuya actuación pueda ir en detrimento de la calidad del vino. La mayoría de estas enzimas provienen de la uva y de su microbiota, así como del resto de microorganismos presentes durante la vinificación. Estas enzimas, llamadas endógenas, son, por lo general, poco abundantes y poco efectivas en las condicio-



nes de vinificación por lo que en la actualidad es una práctica común en las bodegas la utilización de enzimas, llamadas exógenas, adicionadas en forma de preparados enzimáticos comerciales, principalmente de origen fúngico, que tratan de suplir las carencias y/o reforzar la acción de las primeras.

La utilización de preparados enzimáticos comerciales se justifica fundamentalmente por dos razones: (i) conseguir un incremento del rendimiento en mosto y a la vez mejorar la clarificación y procesamiento del vino, para lo que se utilizan pectinasas, glucanasas, xilanasas y proteasas, e (ii) incrementar la fracción aromática mediante la acción de glicosidasas. La reducción de la concentración de carbamato de etilo utilizando ureasas ácidas, y la reducción de los niveles de alcohol debido a la acción de glucosa oxidasa también aparecen documentadas en la bibliografía, si bien su relevancia tecnológica es más limitada.

Pectinasas, glucanasas y xilanasas, también llamadas de forma genérica “enzimas de maceración”, sirven tanto para degradar los polisacáridos estructurales de las paredes celulares de las uvas que dificultan el procesamiento del mosto y del vino, como para mejorar la extracción de compuestos fenólicos y de precursores aromáticos.



El tratamiento del vino con proteasas pretende sustituir el tratamiento clásico de clarificación con bentonita, realizado para evitar la quiebra proteica. Ésta consiste en la aparición, en vino embotellado, de precipitados de proteínas asociados con compuestos fenólicos. Sin embargo, en estos momentos se duda de la eficacia de los tratamientos proteolíticos, debido, no a que las proteasas exógenas no sean activas en condiciones de vinificación, sino a la resistencia inherente de las proteínas responsables de la quiebra proteica a la proteólisis.

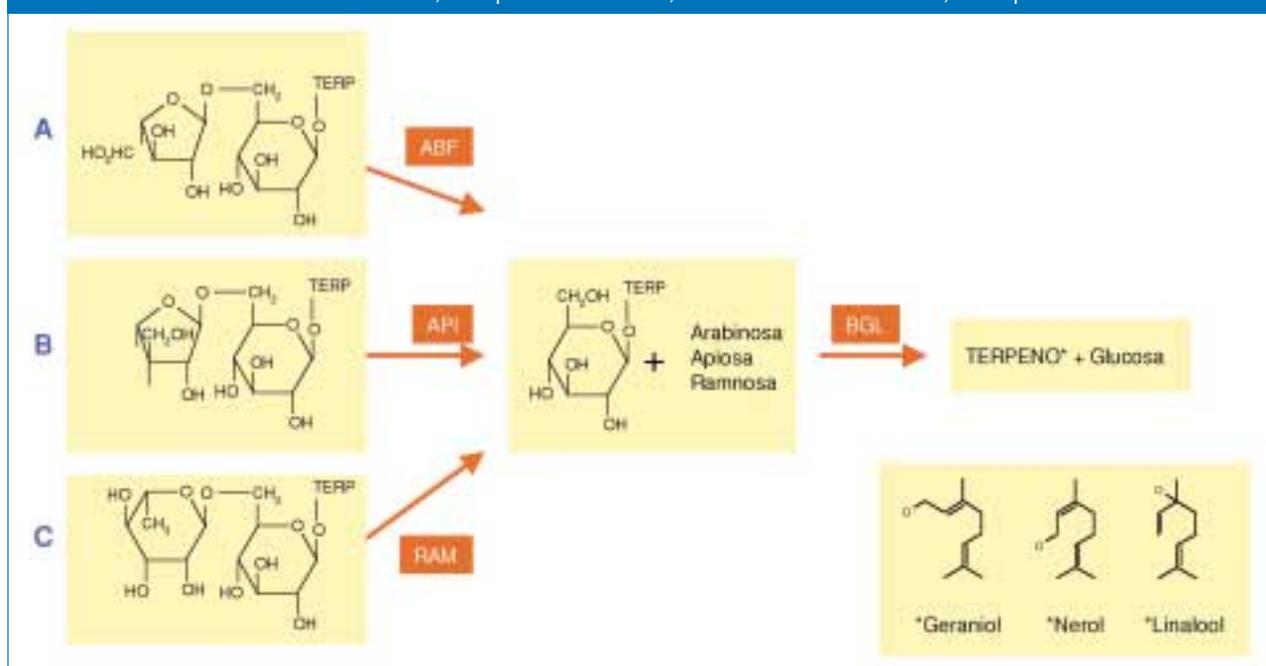
El incremento de la fracción aromática mediante la utilización de glicosidasas se basa en el hecho de que en la uva, ciertos componentes del aroma, entre los que destacan los terpenos (fundamentalmente

geraniol, nerol y linalool), además de en su forma libre se encuentran formando compuestos glicosídicos no volátiles. Estos complejos donde, en general, el componente aromático se encuentra unido a un disacárido, pueden ser hidrolizados en dos pasos mediante la acción primero de una  $\alpha$ -arabinofuranosidasa,  $\beta$ -apiosidasa o  $\alpha$ -ramnosidasa, y a continuación mediante la acción de una  $\beta$ -glucosidasa que hidrolizará el enlace entre la glucosa y el compuesto volátil (ver Figura 2).

### Preparados enzimáticos comerciales

A principios de los años 50, se comercializó el primer preparado de carácter pectinolítico desarrollado específicamente para ser usado en vinificación. La ventaja de este preparado frente a los utilizados en la clarificación de zumos de manzana, era que producía muy poco metanol al degradar las pectinas de la uva, debido a que su actividad mayoritaria era una pectín liasa. Con el paso de los años se fueron comercializando nuevos preparados enzimáticos útiles no sólo para clarificar sino también para mejorar la extracción y filtración del mosto, aumentar la extracción de color y reducir la turbidez y el pardeamiento de los vinos. Esta eficacia mayor se debía a la presencia en estos preparados de niveles elevados de

**FIGURA 2: HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PRECURSORES GLICOSILADOS. A:  $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIL-(1,6)- $\beta$ -D-GLUCOPIRANÓSIDO; B:  $\beta$ -D-APIOSIL-(1,6)- $\beta$ -D-GLUCOPIRANÓSIDO; C:  $\alpha$ -L-RAMNOPIRANOSIL-(1,6)- $\beta$ -D-GLUCOPIRANÓSIDO; ABF:  $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASA; API:  $\beta$ -D-APIOSIDASA; RAM:  $\alpha$ -L-RAMNOSIDASA; BGL:  $\beta$ -D-GLUCOSIDASA**



otras actividades colaterales tales como celulasas, hemi-celulasas, proteasas y glucosa oxidasa.

Desde los años 70, cuando el uso de preparados pectinolíticos se convirtió en una práctica generalizada, hasta nuestros días, se han ido desarrollando nuevos y mejores preparados enzimáticos (Tabla 1). Actualmente se comercializan como “enzimas de maceración”, constituidos fundamentalmente por enzimas relacionadas con la degradación de paredes celulares vegetales y glicosidasas. Estas últimas, como ya se ha comentado, están relacionadas con el incremento de la fracción aromática de los vinos.

Sin embargo, estos preparados usados tradicionalmente en las bodegas pueden presentar una serie de inconvenientes, entre los que se han descrito tanto su falta de especificidad y su poca actividad en las condiciones de vinificación, como la presencia de actividades contaminantes que pueden tener efectos negativos sobre el producto final, tal es el caso de la actividad cinamil esterasa, implicada en la formación de fenoles volátiles. Tanto las compañías productoras de enzimas como los laboratorios de investigación, están tratando de solucionar estos inconvenientes mediante la selección y caracterización de microorganismos productores y de enzimas específicas para aplicaciones enológicas. Asimismo, la adición de enzimas, aunque realizada de forma racional y juiciosa, no está exenta de cierta polémica, debido en parte a la tendencia cada vez más extendida por parte del consumidor de reclamar productos con la mínima cantidad de aditivos, así como ser considerada, por algunos puristas, como una práctica “artificial” y poco “natural” del enólogo.

### Levaduras vínicas modificadas genéticamente: “*Let the yeast do the work*”

Las levaduras se han utilizado para producir alimentos y bebidas desde el Neolítico. Aunque su implicación en fermentación se reconoció entre los años



1836-1838, no es hasta los trabajos de Louis Pasteur cuando se demuestra su papel en la bioconversión del azúcar en etanol y anhídrido carbónico. En un principio, la mejora de cepas industriales se basaba tradicionalmente en técnicas de genética clásicas tales como mutagénesis, hibridación, fusión de protoplastos, etc. La mayor limitación de esas técnicas es la dificultad de añadir o quitar ciertas características sin modificar otras. Los avances en las técnicas de ADN recombinante han hecho posible introducir nuevas propiedades en cepas industriales de levadura. Las ventajas de la aplicación de las técnicas de ingeniería genética sobre las de genética clásica son precisamente especificidad, versatilidad y rapidez.

En los últimos 12 años se ha realizado un gran esfuerzo por mejorar varios aspectos en levaduras vínicas, principalmente tratando de conseguir: (i) que tengan una mayor capacidad fermentativa y, (ii) que rindan un producto de mayor calidad, bien sea en relación con sus características organolépticas, funcionales y/o

de seguridad. Hoy en día es posible conseguir levaduras que hiperproduzcan o dejen de producir una determinada enzima, que expresen *de novo* una, o más de una, determinada actividad enzimática y/o que expresen una enzima propia pero modificada para tener nuevas características más adecuadas al proceso de vinificación.

### Levaduras vínicas productoras de enzimas de maceración

La importancia de las enzimas de maceración en el proceso de vinificación también se refleja en el hecho de que las primeras levaduras vínicas recombinantes fueran productoras de este tipo de enzimas. A principio de los noventa, dos grupos de investigación de diferentes laboratorios publicaron los primeros trabajos en los que se desarrollaron las primeras levaduras vínicas transgénicas: una levadura vínica endoglucanólítica en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)

(Pérez-González, González, Querol, Sendra y Ramón, 1993) y otra levadura que mejoraba la degradación de pectinas, al coexpresar una pectato liasa y una poligalacturonasa, construida en la Universidad de Stellenbosch en Sudáfrica (Laing y Pretorius, 1993). Con posterioridad se han construido levaduras vínicas xilanolíticas y nuevas versiones de levaduras pectinolíticas y celulolíticas, por lo que en la actualidad se dispone de levaduras vínicas que expresan prácticamente todo el espectro de las llamadas “enzimas de maceración” (ver Tabla 2).

### Levaduras vínicas productoras de glicosidasas y enzimas implicadas en la formación de ésteres afrutados

Dado que el aroma es una de las características más importantes que determinan la calidad de un vino, las glicosidasas, enzimas implicadas en liberación de terpenos y otros compuestos volátiles, y las alcohol acetiltransferasas, enzimas responsables de la producción de ésteres

de acetato, han sido objetivo de distintos grupos de investigación a la hora de construir levaduras vínicas recombinantes. En la actualidad se dispone de levaduras transgénicas que secretan de forma eficiente las enzimas  $\alpha$ -arabinofuranosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -ramnosidasa, y se ha demostrado que los vinos resultantes de fermentaciones llevadas a cabo conjuntamente por estas dos últimas levaduras recombinantes, presentaban un incremento en la concentración de terpenos. Asimismo, también se ha construido una levadura vínica que mediante la hiperproducción de una única enzima, una exoglucanasa propia de *S. cerevisiae*, incrementa la fracción térpénica de los vinos.

En cuanto a la mejora de la calidad aromática del vino mediante el incremento de ésteres afrutados, se ha construido una levadura vínica que, tras sobreexpresar un gen propio que controla la producción de ésteres de acetato, el gen *ATF1*, produce vinos con cantidades incrementadas de acetato de isoamilo (aroma a banana) y acetato de 2-feniletilo (aroma afrutado y floral con toque a miel). A pesar del inconveniente de una producción simultánea de acetato de etilo, que puede conferir al vino un carácter avinagrado, estos estudios abren las puertas a vinos embotellados que conserven el carácter afrutado durante más tiempo.

### Levaduras vínicas productoras de glucosa oxidasa

La demanda por parte del consumidor de vinos con menor contenido alcohólico ha centrado el interés de los investigadores en la enzima glucosa oxidasa. La reducción del contenido alcohólico de los vinos puede conseguirse, como se indicó anteriormente, mediante la adición de glucosa oxidasa o mediante la utilización de una cepa de levadura vínica que exprese el gen que codifica dicha enzima. Ambas aproximaciones han resultado satisfactorias con la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, y los vinos resultantes de la fermentación con esta levadura recombinante presentan una reducción de aproximadamente un 2% en su contenido alcohólico.

Existen además otros ejemplos de levaduras vínicas recombinantes que, al igual que en el caso de la formación de ésteres de acetato, tampoco tienen su contrapartida en forma de enzimas exógenas. Así, ya se han realizado estudios acerca de la acidificación biológica de vinos utilizando cepas de *S. cerevisiae* productoras de ácido láctico mediante la expresión del gen *LDH* de *Lactobacillus casei*, que codifica la enzima lactato deshidrogenasa, o del aumento del contenido en glicerol, compuesto que proporciona cuerpo al vino, sobreexpresando el gen propio *GPD1*, que codifica la en-

zima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, lo que lleva a un incremento entre 1.5 y 2.5 veces del contenido en glicerol. Por otra parte es también factible obtener cepas malo-etanológicas de levadura vínica capaces de llevar a cabo también la fermentación maloláctica, realizada tradicionalmente por bacterias ácido-lácticas. Esta característica ya se ha conseguido coexpresando una permeasa de malato de *Schizosaccharomyces pombe* y la enzima maloláctica de *Lactococcus lactis* en una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae*.

Otros ejemplos interesantes y de gran actualidad son el desarrollo de levaduras vínicas que puedan actuar también como agentes de biocontrol inhibiendo el crecimiento de microorganismos alterantes, lo que permitiría reducir las cantidades de sulfuroso que se adicionan al mosto y vino como agente antimicrobiano. De hecho la O.I.V. ha aprobado recientemente el uso de preparaciones comerciales de lisozima como agente antimicrobiano, con el fin de controlar la fermentación maloláctica. En este sentido, ya se han construido cepas bactericidas de levaduras de laboratorio que expresan el gen *pedA* de *Pediococcus acidilactici* (codifica una bacteriocina); resultado que abre las puertas a la construcción de cepas vínicas similares que aparte de la fermentación alcohólica, pudieran controlar las bacterias alterantes. En cuanto a la posible mejora de las características funcionales, se ha conseguido el aumento en los vinos del contenido en resveratrol, fenol relacionado con la prevención de ciertas enfermedades, tras expresar el gen *bgn*, que en *Candida molischiana* codifica una  $\beta$ -glucosidasa, en la cepa vínica *S. cerevisiae* T<sub>73</sub>.

### Perspectivas futuras

En nuestro país, contamos con una superficie de viñedo de más de un millón de hectáreas, que supone la tercera parte del total de la Unión Europea y casi un 15% de la mundial, con una producción superior a los 35 millones de hectolitros de vino. Estos datos, que reflejan la importancia del sector vitivinícola español, se enmarcan en un contexto de creciente globalización de la producción de vino, donde nuevos países productores con menor tradición como E.E.U.U., Alemania, Argentina, Sudáfrica, Australia y Chile han aumentado sus exportaciones durante la última década en un 137%. Ante este hecho, los países tra-

**TABLA 1: ALGUNOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS RECOMENDADOS PARA VINIFICACIÓN DISPONIBLES EN EL MERCADO**

Preparado comercial	Fabricante Distribuidor	Actividades principales (según fabricante)
AR2000	DSM	Glucosidasas
Gama de Biopectinase	Quest International	Pectinasa, celulasa
Gama de Endozym	AEB Group	Pectinasa, $\beta$ -glucosidasa, hemicelulasa, celulasa
Gama de Enovin	Agrovin	Enzimas pectolíticas
Gama de Lallzyme	Lallemand	Pectinasa, glicosidasa, galactanasa, celulasa
Gama de Progress	Esseco Group	Enzimas pectolíticas
Gama de Rapidase	DSM	Pectinasa, hemicelulasa, glucanasa
Gama de Rohavin	AB Enzymes	Pectinasa, celulasa, glucanasa, proteasa
Gama de Rohapect	AB Enzymes	Pectinasa, hemicelulasa, proteasa
Gama de Uvazym	Esseco Group	Enzimas pectolíticas
Gama de Vinozym	Novozymes	Pectinasa, hemicelulasa, celulasa
Novarom	Novozymes	Glicosidasas
Novocclair FCE	Novozymes	Pectinasa
Ultrazym 100	Novozymes	Pectinasa

dicionalmente productores, entre los que se encuentra España, junto con Francia e Italia, deben, sin olvidar sus peculiaridades, admitir nuevos caminos de innovación que permitan una diferenciación y especialización de las bodegas y de los productos.

En este contexto, la biotecnología enológica podría proporcionar a los bodegueros nuevos desarrollos que permitirían elaborar “vinos a la carta”. Sin embargo, en estos momentos es bien sabido, como ya se ha indicado anteriormente, que la aplicación de la ingeniería genética en la alimentación plantea problemas de aceptación por parte del consumidor, fundamentalmente en la Unión Europea. Esta resistencia del consumidor podría ser incluso mayor en el caso del vino, ya que se trata de una bebida con un componente cultural importante. Es por ello que los estudios de tipo toxicológico, unidos a los de impacto ambiental, resultan imprescindibles para convencer al consumidor de la bondad de este tipo de alimentos.

Son tantos y tan diferentes los posibles beneficios que para la industria del vino supondría la aplicación de la ingeniería

genética y metabólica en levaduras vínicas, que este tipo de desarrollos son una de las principales líneas de investigación tanto en nuestro Instituto como en otros laboratorios punteros en enología como el Institute for Wine Biotechnology de la University of Stellenbosch en Sudáfrica o el Australian Wine Research Institute. Sin embargo, no hay que olvidar que todos estos posibles beneficios sólo se harán realidad si estas nuevas tecnologías se aplican de una manera racional y sistemática y sobre todo, respetando la naturaleza propia de un producto tan característico y único como el vino.

### Agradecimientos

La información que las autoras aportan a esta revisión es fruto del desarrollo de varios proyectos financiados por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) entre los que se incluyen los proyectos en curso AGL2002-01906, AGL2003-01295/ALI y AGL2004-00978/ALI. Las autoras agradecen a todos los investigadores de los laboratorios de Biotecnología de Hongos, Enzimas Vínicas y Microbiología Molecular de Levaduras Industriales del De-

partamento de Biotecnología de Alimentos del IATA por su contribución a este trabajo. ■



CENTRO DEL CSIC: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.

Web: <http://www.iata.csic.es>

Laboratorios: Biotecnología de Hongos (M. Orejas) y Enzimas Vínicas (P. Manzanares).

Departamento: Biotecnología de Alimentos.

Nombre Investigador: Margarita Orejas y Paloma Manzanares.

E-mail: [morejas@iata.csic.es](mailto:morejas@iata.csic.es) y [pmanz@iata.csic.es](mailto:pmanz@iata.csic.es)

Objetivo general de la investigación:

- Enzimología enológica.
- Selección de levaduras vínicas no-*Saccharomyces*.
- Revalorización de subproductos de la vinificación: evaluación de compuestos bioactivos.
- Mejora genética de hongos filamentosos para la producción de enzimas de interés enológico.
- Ingeniería metabólica de levaduras vínicas.
- Ingeniería de proteínas para mejorar sus características enológicas.

TABLA 2: ALGUNAS LEVADURAS VÍNICAS RECOMBINANTES DISPONIBLES

Gen manipulado	Enzima(s) que hiperproducen	Laboratorio
<i>egl1 Trichoderma longibrachiatum</i>	$\beta$ -(1,4)-Endoglucanasa	IATA-CSIC, Valencia. 1993
<i>pelE Erwinia chrysanthemi</i> <i>peh1 Erwinia carotovora</i>	Pectato liasa Poligalacturonasa	Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. 1993
<i>end1 Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>pelE E. chrysanthemi</i> <i>peh1 E. carotovora</i>	Endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, Pectato liasa Poligalacturonasa	Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. 1994
<i>peIA Fusarium solani</i>	Pectato liasa	IATA (CSIC), Valencia. 1995
<i>abfB Aspergillus niger</i>	$\alpha$ -L-Arabinofuranosidasa	IATA (CSIC), Valencia. 1996
<i>bgIn Candida molischiana</i>	$\beta$ -D-Glucosidasa	IATA (CSIC), Valencia. 1998
<i>xlnA Aspergillus nidulans</i>	$\beta$ -(1,4)-Endoxilanasas	IATA (CSIC), Valencia. 1999
<i>LDH Lactobacillus casei</i>	Lactato deshidrogenasa	INRA-IPV, Montpellier (Francia). 1999
<i>GPD1 Saccharomyces cerevisiae</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	INRA-IPV, Montpellier (Francia). 1999
<i>PGU1 S. cerevisiae</i>	Poligalacturonasa	Universidad Santiago de Compostela. 2000
<i>ATF1 S. cerevisiae</i>	Alcohol acetiltransferasa	Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. 2000
<i>mae1 Schizosaccharomyces pombe</i> <i>mae2 Schiz. pombe*</i>	Permeasa de malato Enzima málica	Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. 2001
<i>rhaA Aspergillus aculeatus</i>	$\alpha$ -L-Ramnosidasa	IATA (CSIC), Valencia. 2003
<i>goxC A. niger*</i>	Glucosa oxidasa	Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. 2003
<i>EXG1 S. cerevisiae</i>	Exo-1,3- $\beta$ -glucanasa	IATA (CSIC), Valencia. 2004

\* Trabajo realizado sólo en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*, con posible aplicación en cepas vínicas.



Plantas de tratamiento aséptico

Llenadoras asépticas

Bombas de pistón

Intercambiadores Dinámicos UNICUS

Intercambiadores de Tubo Corrugado



**HRS SPIRATUBE**

Avda. Miguel de Cervantes, 45

Torre Expomurcia, 3ª planta - 30009 Murcia

Telf. 968 20 14 88 - Fax 968 20 04 61

E-mail: [info@hrs-spiratube.com](mailto:info@hrs-spiratube.com)

[www.hrs-spiratube.com](http://www.hrs-spiratube.com)



# El análisis sensorial en el control y aseguramiento de la calidad de los alimentos: una posibilidad real

*El concepto de calidad sensorial es difícil de definir porque no está ligado exclusivamente a características o propiedades intrínsecas del alimento sino que es el resultado de la interacción entre éste y el consumidor (Figura 1).*

ELVIRA COSTELL

LABORATORIO DE PROPIEDAD FÍSICAS Y SENSORIALES. IATA. CSIC. APTDO. 73. 46100 BURJASSOT. VALENCIA. E-MAIL: ECOSTELL@IATA.CSIC.ES

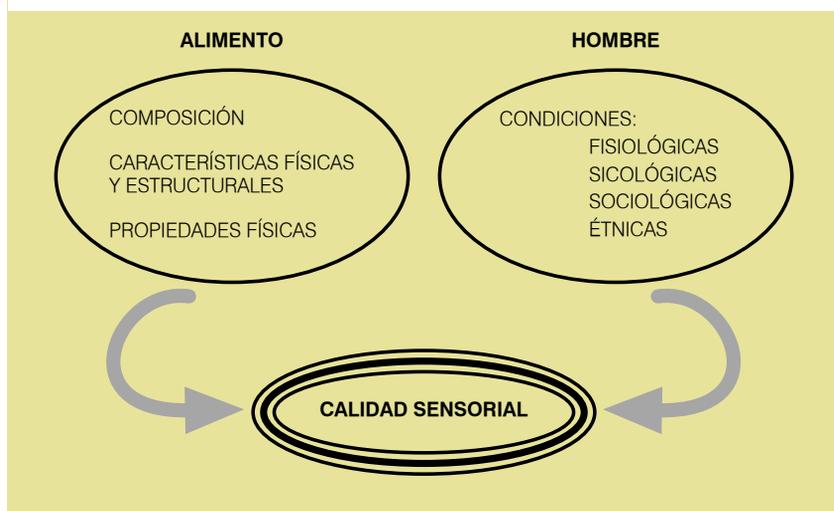
La puesta a punto de un programa para el control y aseguramiento de la calidad de un alimento requiere, en primer lugar, definir una especificación y desarrollar o seleccionar los métodos que permitan medir con garantías, si un producto la cumple o no. Si el establecimiento de sistemas de control y aseguramiento de la calidad de los alimentos en aspectos relativos a su composición química, seguridad microbiológica y toxicológica o características nutritivas, presenta problemas prácticos en la elección de las características o propiedades medir y en la de los métodos analíticos a utilizar, cuando se trata de establecer sistemas para controlar lo que habitualmente se denomina “calidad sensorial”, estos problemas se multiplican. La evaluación sensorial es una disciplina “joven”, si la comparamos con otras dis-

ciplinas científicas, como la química o la microbiología. Su nacimiento y evolución metodológica se han producido en la segunda mitad del siglo XX y su consolidación, tanto a nivel académico como industrial, no ocurre hasta la década de los 80 (Moskowitz, 1993, Costell, 2000).

El concepto de calidad sensorial ha ido evolucionando desde que, en 1959, Kramer la definió como “Conjunto de características que diferencian entre distintas unidades de un producto y que influyen en aceptación del mismo por el consumidor”. Algunos autores consideran mas importante la primera parte de esta definición y para ellos, la calidad sensorial de una alimento depende principalmente de las características del propio alimento. Otros, ponen el acento en la segunda parte y piensan que la calidad sensorial esta ligada principalmente a las preferencias de los consumi-

dores. En el primer caso, la definición de la calidad dependería de los criterios de un grupo de expertos y podría considerarse relativamente constante durante un determinado periodo de tiempo (Molnar, 1995). Con el segundo planteamiento, la calidad estaría relacionada directamente con las preferencias de los consumidores y por ello, habría que considerarla variable y muy dependiente del contexto (Cardello, 1995). Si la primera postura puede dar lugar a unos resultados de dudosa validez práctica porque asume que la opinión de los expertos es representativa de la de los potenciales consumidores del producto, tampoco la segunda es totalmente satisfactoria porque para establecer una especificación de calidad no es suficiente, en muchos casos, tener en cuenta exclusivamente los datos de aceptabilidad de un producto (Booth, 1995).

FIGURA 1





Las dificultades ligadas a la “juventud” y lento desarrollo del análisis sensorial, han impedido que durante muchos años, los especialistas sensoriales pudieran ofrecer soluciones convincentes para resolver los problemas relacionados con el control de la calidad sensorial de los alimentos. Cuando se analizan los diferentes métodos propuestos y utilizados por distintas entidades, la primera impresión es que existe una gran variabilidad de planteamientos, de rigurosidad y de aplicabilidad práctica (Costell 2002). En general, aún se considera que los métodos sensoriales son lentos y costosos y que la información que proporcionan requiere trata-

mientos estadísticos mas o menos complicados. Si es lógico que los especialistas en análisis sensorial pongan de manifiesto la necesidad de utilizar correctamente los distintos métodos sensoriales para obtener resultados científicamente válidos (Lawless, 1994) también lo es considerar las limitaciones prácticas de algunos de ellos en el control de calidad y la necesidad de disponer de métodos rápidos que permitan tomar las decisiones oportunas en el momento preciso (Muñoz et al, 1992). Es evidente que conciliar ambas posturas no es fácil. Quizá un camino sea diferenciar entre los métodos sensoriales que se deben utilizar para definir una es-

pecificación de calidad y los métodos aplicables para establecer si un determinado producto las cumple o no.

**Métodos sensoriales aplicables a la selección o desarrollo de estándares y a la definición de especificaciones**

El establecimiento o desarrollo de los estándares y la definición de las especificaciones de calidad es el punto crucial en la implantación de un programa de control de calidad. En la práctica, cada empresa o entidad debe definir el nivel de calidad que necesita controlar en su producto y en función de ello, desarrollar el estándar y la especificación que mas se ajuste a sus objetivos.

**Estándares de calidad**

Cuando se trata de alimentos y de su calidad sensorial, en la mayoría de los ca-

El contenido de los estándares sensoriales depende principalmente del grado de calidad que se desea controlar y de las características del producto que se evalúa



esos, es difícil e incluso prácticamente imposible, disponer de un producto o de una serie de productos de características sensoriales fijas e inalterables durante un periodo de tiempo suficientemente amplio para que puedan ser utilizados como referencias (Figura 2). Sin embargo este tipo de estándares sí suele utilizarse en el control de calidad de algunos ingredientes o materias primas cuya vida útil es suficientemente amplia. Por otro lado, para controlar determinados atributos, especialmente los relacionados con el aspecto o con el color de los alimentos, se han desarrollado diferentes tipos de estándares de calidad, generalmente fotográficos (Figura 3). Cuando no hay posibilidad de utilizar el propio producto como estándar y no es posible recurrir a fotos o a reproducciones, la situación se complica y tradicionalmente, el problema en la industria alimentaria se ha resuelto de dos formas: confiando en el estándar mental que sobre la calidad de un producto ha desarrollado uno o un grupo reducido de expertos o elaborando un estándar escrito en el que se incluyen un número determinado de atributos.

Uno de los puntos más conflictivos del control de la calidad sensorial de los alimentos es la calificación de su calidad de acuerdo con el estándar mental que sobre ella ha desarrollado uno o un grupo de expertos (Figura 4). Las críticas a este sistema se centran principalmente, en dos aspectos: a) La posible falta de concordancia entre los estándares mentales de diferentes expertos sobre la calidad de un mismo producto y b) No se puede asumir que la opinión de los expertos representa siempre a la de los consumidores.

El contenido de los estándares sensoriales escritos depende principalmente del grado de calidad que se desea controlar y de las características del producto que se evalúa.. A grandes rasgos, un



estándar de este tipo debe incluir los atributos críticos que varían perceptiblemente en función de las características de la materia prima o del proceso, los atributos que influyen directamente en la aceptación del producto por el consumidor y, en muchos casos, aquellos que describen los defectos mas frecuentes (Figura 5). Para un mismo tipo de productos no es lo mismo desarrollar un estándar para separar los productos aceptables de los que no lo

son, que hacer uno que permita decidir, entre dos productos aceptables, cual de ellos es de mayor calidad o poner a punto un estándar que sea aplicable a la descripción de las diferencias entre productos de alta calidad y los de calidad óptima o excepcional. Como es lógico, la dificultad se incrementa de la primera situación a la última porque aumentan los atributos críticos a considerar y la selección de los mismos se complica (Figura 6)

**FIGURA 3**

Escala de referencia para evaluar el grado de veteado con el jamón curado (Guerrero et al. 2004)



**FIGURA 4**

Expertos evaluando la calidad de batidos de chocolate





producto final y por otro, cómo incide la variabilidad del producto o de cada uno de los atributos incluidos en el estándar, en la aceptabilidad del mismo por el consumidor. Hay que tener en cuenta que no siempre las diferencias perceptibles entre una serie de productos se traducen directamente en diferencias en la aceptabilidad de los mismos (Figura 7). Pero también hay que considerar que, algunas veces, aunque la variabilidad de un atributo no incida directamente en la aceptabilidad de un producto, puede afectar a la confianza en el mismo del consumidor. Por ejemplo, en una investigación realizada en nuestro laboratorio (Yanes, 2002), al analizar la influencia de distintos atributos sensoriales en la aceptabilidad de batidos de chocolate comerciales (Figura 8), no se detectó una relación directa entre las diferencias de color y su aceptabilidad. Productos de color claramente distinto, resultaron igual de aceptables. No obstante, está claro que una diferencia perceptible en este atributo entre distintas partidas de un mismo fabricante, puede disminuir la confianza en el producto de sus consumidores habituales.

En resumen, la definición de una especificación incluye los siguientes pasos:

1. Selección de un grupo de muestras de características sensoriales diferentes que representen la variabilidad real de las mismas. Según el objetivo del programa de control, en muchas ocasiones es conveniente además, incluir en el estudio muestras con algunos de los defectos más importantes, de distintas marcas o de otros orígenes
2. Evaluación de la diferencia o diferencias perceptibles entre cada una de las muestras y el estándar, por comparación directa con el producto control o evaluando la magnitud de los atributos y defectos incluidos en el estándar escrito previamente desarrollado.
3. Evaluación de la aceptabilidad de las muestras por un grupo amplio de consumidores.
4. Análisis de la relación entre la variabilidad del producto o de los atributos y las diferencias en la aceptación de las muestras por los consumidores.

Como resultado, se obtiene información sobre los atributos cuya variación influye o no directamente en la aceptabilidad. Esta información, considerada conjuntamente con los criterios de calidad propios de la empresa permiten el esta-

### Especificaciones de calidad

Una especificación de calidad sensorial es la que establece el intervalo de variación aceptable o tolerable de un producto respecto a un estándar previamente establecido, sea éste un producto de referencia, un estándar mental o uno escrito. En este último caso, hay que definir el intervalo de variación de la intensidad que se considera aceptable, de los atributos in-

cluidos en el estándar. Este intervalo de variación lo puede establecer la propia industria unilateralmente, hacerlo en función de la respuesta de los consumidores o considerar conjuntamente ambos criterios. Esta última solución es la que proporciona unas especificaciones más realistas porque tiene en cuenta, por un lado, las limitaciones que la variabilidad de las materias primas y de las condiciones del proceso generan en las características del

**FIGURA 8**

Evaluación sensorial de batidos de chocolate



blecimiento de la especificación sensorial definitiva. En cualquier caso, el desarrollo de estándares y de especificaciones para controlar la calidad sensorial no es fácil ni rápido. En muchas ocasiones, no se obtiene un resultado satisfactorio al primer intento y es necesario modificar el estándar o la especificación propuestos inicialmente. Por otra parte, hay que estar pendiente de las variaciones que se producen en el mercado por cambios en las preferencias de los consumidores, de sus hábitos alimentarios, de su grado de exigencia, de las modas, etc., o de las modificaciones que la introducción de nuevos productos puede provocar en la estructura del mercado.

Con este planteamiento, la utilización de los métodos sensoriales para desarrollar los estándares y para establecer las especificaciones de calidad sensorial no presenta problemas especiales porque no es necesario, ni conveniente, utilizar métodos rápidos ni tomar decisiones precipitadas. La metodología sensorial, los diseños, las condiciones experimentales y el análisis estadístico de los datos, están bien definidos en muchos textos. (MacFie y Thomson, 1994, Moskowitz, 1994; Lawless y Heymann, 1998, Meilgaard et al, 1999). El problema se plantea cuando hay que utilizar métodos sensoriales para decidir si un producto cumple o no con la especificación establecida.

**Métodos sensoriales aplicables en el control de calidad**

En principio, los métodos mas idóneos para el control de calidad son aquellos que permiten medir la magnitud de la diferencia entre un producto y el estándar (escalas de intensidad, escalas de calificación de la calidad o métodos de comparación con un estándar). Sin embargo, otros métodos propuestos, como los discriminatorios, los afectivos, los que miden la "tipicidad"etc., no son adecuados ni recomendables (Muñoz et al, 1992).

En cada caso particular, la elección del método utilizable en el control de calidad debe realizarse teniendo en cuenta los siguientes criterios:

1. El objetivo del programa de control de calidad
2. El tipo de estándar de que se dispone
3. Si las diferencias perceptibles entre los productos pueden definirse con atributos sensoriales específicos y si es así, el número de ellos necesario
4. La magnitud de las diferencias que debe medirse
5. El grado o grados de calidad que hay que determinar



**Métodos de comparación con un estándar**

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, en la industria alimentaria se utilizan básicamente tres tipos de estándares: producto real o fotográfico, estándar mental y estándar escrito. En teoría, los métodos de comparación con un estándar tienen un objetivo concreto, evaluar y cuantificar las diferencias perceptibles entre el estándar y el producto que se

analiza. Ello implica la selección y entrenamiento de un grupo de catadores, el diseño de una hoja de cata y definir claramente las condiciones experimentales del ensayo.

*Diferencia de un producto real.* Hay distintos métodos para establecer las diferencias con un producto de referencia. La más sencilla es evaluar el grado de diferencia total con una escala, con un extremo marcado con "no hay diferencia" y el

**FIGURA 5: ESTÁNDAR ESCRITO PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN (COI, 1996)**

<b>Percepción de defectos</b>	
Atrojado	→
Moho	→
Avinado-Avinagrado	→
Acido-Agrio	→
Borras	→
Metálico	→
Rancio	→
Otros (especificar)	→
<b>Percepción atributos positivos</b>	
Frutado	→
Amargo	→
Picante	→



magnitudes de las diferencias respecto al estándar (Figura 9b). Esto amplía la información obtenida y puede permitir tomar algunas decisiones correctivas cuando sea necesario. Sin embargo, este tipo de escalas, aunque detecta la magnitud de la diferencia respecto al estándar, no informa de su sentido. Otra alternativa, utilizada con buenos resultados en determinados casos (Costell, datos no publicados), es diseñar una escala en la que el punto central está ocupado por el producto de referencia (Figura 9c). Con este tipo de escalas, no solo se obtiene información sobre la magnitud de la diferencia respecto al estándar sino también, del sentido de la misma. Este método puede resultar interesante, por ejemplo, cuando se ha modificado la formulación de un producto cambiando un ingrediente o se ha modificado alguna condición del proceso y no se puede predecir en qué sentido puede variar la magnitud de alguno de los atributos de calidad incluidos en el estándar.

Independientemente, del tipo de escala que se utilice, la calidad de la información que se obtiene depende del grado de entrenamiento y de conocimiento del producto de los jueces, de las condiciones de realización y del correcto análisis de los datos.

otro con “muy diferente” (Figura 9a). El método es rápido y sencillo y resulta útil cuando el producto que se analiza no tiene unas características sensoriales complejas y el objetivo es separar las muestras cuya diferencia con el control es tolerable, de aquellas en las que la diferencia es mayor de la establecida en la especificación correspondiente. Tiene la desventaja de que no proporciona ninguna información sobre la naturaleza de la di-

ferencia detectada y por tanto, no puede servir de ayuda para identificar su causa y poder tomar medidas para corregirla.

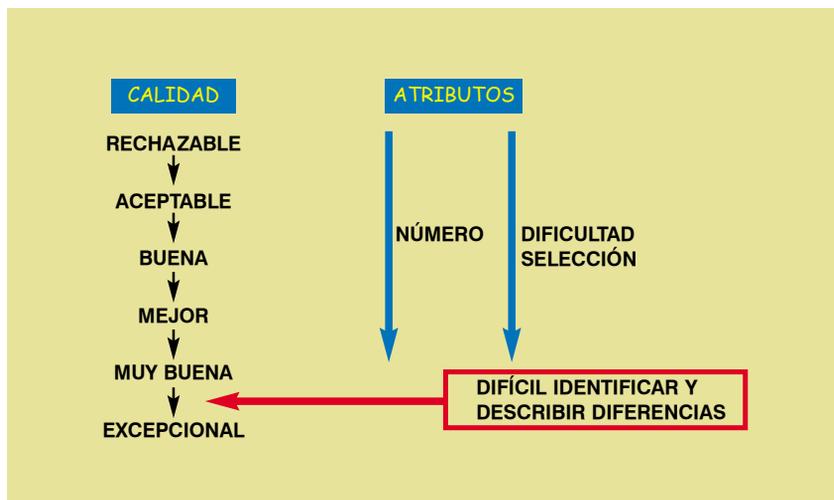
### Otro método define la calificación con una sola escala en la que los extremos están marcados con “calidad muy deficiente y excelente”

Una alternativa es seleccionar los atributos sensoriales más importantes en el producto y evaluar, en todos ellos, las

*Diferencia de un estándar mental.* Ya se han comentado anteriormente, los problemas que plantea confiar en un estándar mental y en la opinión de uno o varios expertos, para calificar la calidad de un producto. Con estos condicionantes, en principio, la primera recomendación podría ser no utilizar este tipo de estándar ni los expertos en la calificación de la calidad de un producto. Pero hay que matizar esta conclusión. Dejando aparte el problema de considerar como expertos a los que no lo son, si se dispone de una o de varias personas, con reconocida habilidad sensorial para discriminar y evaluar las magnitudes de las diferencias perceptibles entre productos y que además, tienen un amplio conocimiento sobre el alimento que se evalúa, hay algunas situaciones en las que la calificación de la calidad por uno o varios expertos no sólo puede ser admisible sino que es, incluso recomendable. La primera, cuando se evalúa la calidad de un producto cuyas características no van a ser nunca evaluadas directamente por el

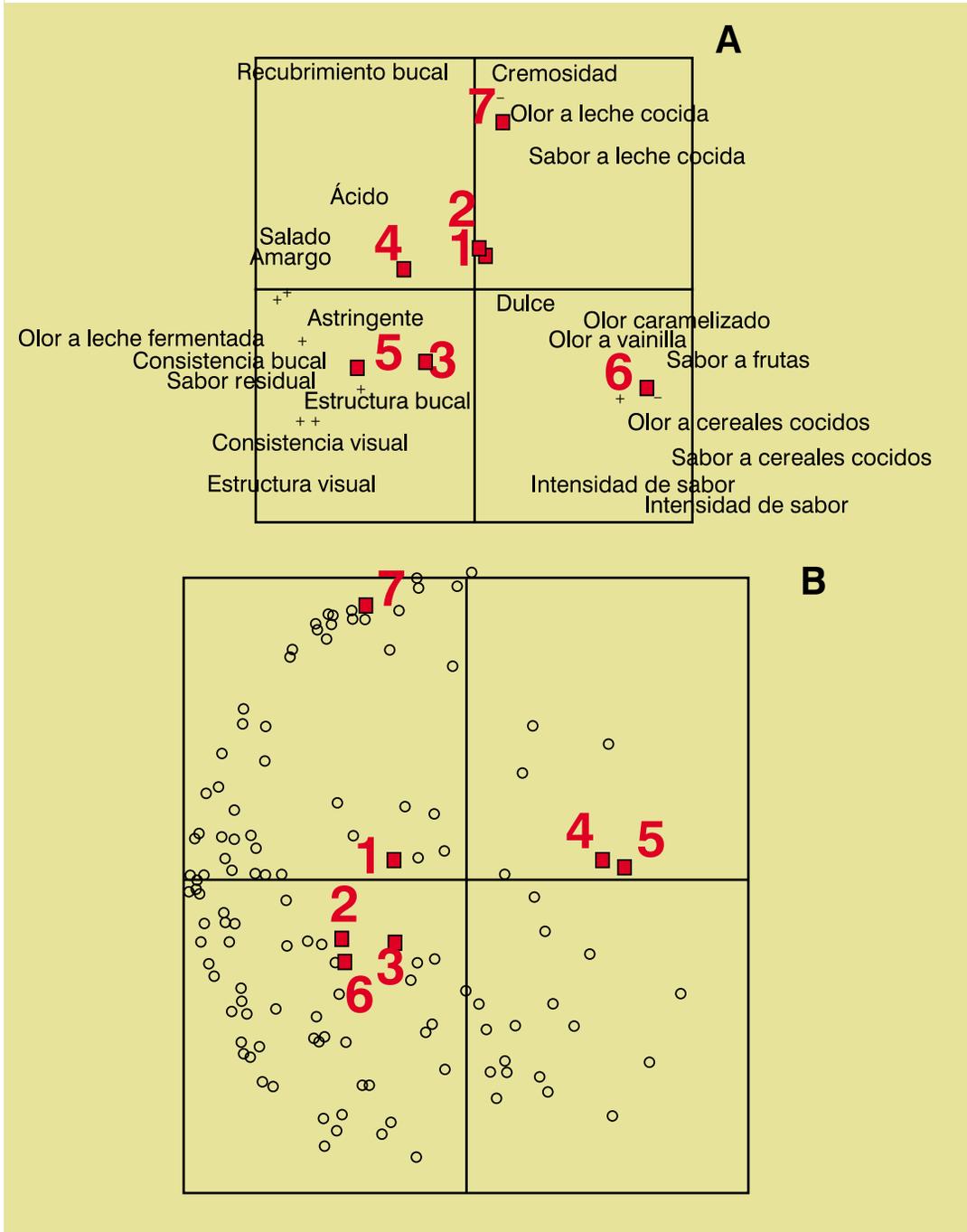
**FIGURA 6**

Número y dificultad de selección de los atributos necesarios para definir diferentes grados de calidad de un alimento



**FIGURA 7**

Posición de siete muestras de yogur en mapas bidimensionales: A: Diferencias perceptibles en la intensidad de distintos atributos (análisis de componentes principales de los datos de un perfil realizado por cataadores) y B: diferencias en aceptabilidad (análisis de mapa de preferencia de los datos de consumidores) (Barrios, 2003).



consumidor, como una materia prima o un ingrediente o se pretende obtener una información previa sobre el posible efecto de los cambios en la formulación o en el proceso o sobre la influencia del almace-

namiento en la calidad final. La segunda, cuando se trata de evaluar diferencias entre distintos grados de calidad en productos de características sensoriales especiales, como el vino, el café o el aceite de oli-

va en los que las diferencias entre una calidad alta y otra excepcional, difícilmente puede ser detectada ni identificada por la mayoría de los consumidores.

El método más simple para comparar

las diferencias de calidad entre un producto y el estándar mental, que sobre el mismo tiene un experto o grupo de expertos, es el conocido como “Dentro/fuera” (in/out). Este método puede ser recomendable para evaluar materias primas o productos que son sencillos sensorialmente. Su mayor desventaja en el control de calidad industrial es que no proporciona información sobre las posibles causas de rechazo.

Otro método es el que se basa en la calificación de la calidad con una sola escala en la que los extremos están marcados con “calidad muy deficiente” y “calidad excelente”. En una primera aproximación puede resultar ingenuo pensar que un concepto de carácter multidimensional, como es el de la calidad sensorial, pueda evaluarse con una escala unidimensional. Pero si se considera que la calidad es un concepto integrado podría ser lógico evaluarla con una escala de este tipo. Puede ser aceptable que un grupo de expertos, que comparten un estándar mental común, pueda ser capaz de calificar el grado de calidad de un producto. Desde el punto de vista del control de calidad, este método tiene la desventaja de que al calificar la calidad de forma integrada, no se obtiene información sobre las acciones necesarias para subsanar los defectos que se detecten.

Con objeto de intentar paliar este problema, se han diseñado otros sistemas, en los que en la misma hoja de cata se incluyen, por ejemplo, una escala para evaluar la calidad total del producto y escalas para evaluar la calidad o la intensidad de unos determinados atributos. Aunque es muy popular, este método no es aconsejable. Como se ha comentado anteriormente, las diferencias perceptibles en los atributos no suelen explicar totalmente las diferencias en calidad y con este método, los expertos se ven forzados a realizar una evaluación “coherente” integrando sensaciones de distinta naturaleza sensorial.

*Diferencia de un estándar escrito.* Son las pruebas más frecuentes en el control de la calidad sensorial de los alimentos. Se basan en evaluar la intensidad de diferentes atributos en hojas de cata diseñadas a partir de la información obtenida sobre el producto durante el desarrollo del estándar y el establecimiento de la especificación. Aunque existen diversas propuestas y variaciones, básicamente hoy subsisten dos tipos: El método descriptivo y el de calificación de la calidad.



El control de calidad con el método descriptivo consiste en que un panel entrenado evalúe la intensidad de los atributos seleccionados mediante un perfil descriptivo. Después de analizar los datos estadísticamente, el responsable de calidad evalúa los resultados y determina si la magnitud de los atributos de la muestra analizada está o no, dentro del intervalo de variación definido en la especificación para cada uno de ellos. Las mayores ventajas de este método son, que la evaluación de la calidad del producto no es subjetiva y que los datos obtenidos son válidos científicamente. La información que proporciona permite la identificación de la causa de las desviaciones detectadas y una acción correctora rápida. Las desventajas, el tiempo y el costo necesario para entrenar y calibrar el panel y el tiempo necesario para realizar el ensayo y para analizar los datos. Aunque éste último se puede reducir sensiblemente diseñando versiones reducidas, con menos atributos, para su utilización diaria o con el uso de algunos de los programas informáticos disponibles para la captura y análisis de los datos (Punter, 1994), cuando se trata de resolver problemas puntuales, que exigen una decisión inmediata, este método no es el más adecuado.

El método para calificar el grado de calidad se basa en construir una hoja de cata con escalas ordinales mixtas, con números enteros y la descripción de las características que definen la calidad co-

rrespondiente a cada uno de ellos. La amplitud de la escala puede ser de 3, 6 o 9 puntos. Lo más frecuente es construir una escala para cada uno de los atributos sensoriales básicos: aspecto, color, aroma, sabor y textura. El tercio superior de cada escala, incluye la descripción detallada de la intensidad de cada atributo correspondiente a un nivel alto de calidad, el tercio medio, la descripción correspondiente a una calidad aceptable y el tercio inferior, la correspondiente a una calidad rechazable (UNE, 1993). Este método permite calificar rápidamente la calidad de un producto y detectar las posibles causas de su rechazo pero requiere una cuidadosa elección de las frases que describen las características propias de cada nivel o grado de calidad y que los catadores que la realicen estén muy bien entrenados en la interpretación de las mismas.

#### Métodos de evaluación sin estándar

El origen de muchas de las merecidas críticas que reciben los métodos sensoriales que se utilizan para determinar la calidad de un producto se originan cuando se utilizan sin haber desarrollado previamente un estándar ni haber establecido la especificación correspondiente. En estas condiciones, la mayoría de los métodos descritos anteriormente, no aportan ninguna información válida.

Finalmente, no se puede dejar de comentar el método de evaluación de la calidad basado en lo que se podría definir como “hoja de cata completa”. En ella se incluye la calificación de la calidad para diferentes características como aspecto, sabor o textura o para determinados atributos como dulzor, astringencia, dureza, etc., y se asigna un número variable de “puntos de calidad” a cada uno de ellos. La suma total de puntos obtenida califica la calidad del producto. Existen otras versiones en las que se evalúa la intensidad de diferentes atributos, la puntuación obtenida para cada uno de ellos se multiplica por un factor distinto y se suman los resultados para dar la calificación total de la calidad del producto. Este método fue muy popular durante unos años y aun hoy se aplica en algunas industrias y entidades públicas de control porque da la idea de que es posible, y también fácil, expresar la calidad de un producto con un solo número. No obstante, ha recibido muchas críticas, casi todas ellas con fundamento. En primer lugar, porque el peso de cada atributo en la calificación de

la calidad se ha asignado, normalmente, de una forma arbitraria y además, las escalas utilizadas para evaluar la intensidad de los distintos atributos no suelen tener una magnitud sensorial equivalente. Si esto sucede, la validez del dato que se obtiene al multiplicar cada puntuación por un factor distinto es más que dudosa. En segundo lugar, considerar hoy que la calidad sensorial de un producto se puede establecer de forma aditiva a partir de unas calificaciones dadas a unos cuantos atributos, es totalmente cuestionable.

### Conclusión

El análisis sensorial es una herramienta imprescindible para obtener información sobre algunos aspectos de la calidad de los alimentos, a los que no se puede tener acceso con otras técnicas analíticas. Los inconvenientes y riesgos que conlleva la incorporación de las técnicas sensoriales a los programas de control y aseguramiento de la calidad de los alimentos, son de menor entidad que las indudables ventajas que puede aportar. Aunque no todos los métodos propuestos y utilizados para evaluar la calidad sensorial de los alimentos se pueden considerar adecuados, actualmente se dispone de conocimientos suficientes para diseñar sistemas efectivos de control de la sensorial para cada caso concreto en función de las características particulares de cada alimento y de su posición en el mercado.

AGRADECIMIENTO.- AL MEC (MCYT)  
PROYECTO AGL2003-00052

### Bibliografía

Barrios E.X. (2003) *Metodologías para investigar la opinión del consumidor. Aplicación al estudio e interpretación de la aceptabilidad del yogur*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

Booth, D. A. (1995) *The cognitive basis of quality*. *Food Quality and Preference*, 6, 201-205

Cardello, A. V.(1995). *Food Quality: Conceptual and sensory aspects*. *Food Quality and Preference*, 6, 163-168

COI (1996) *Valoración organoléptica del aceite de oliva virgen*. COI /T.20/Doc. no 15/rev. 1. Consejo Oleícola Internacional

Costell, E. (2000). *Análisis sensorial: Evolución, situación actual y perspectivas*. *Industria y Alimentos Internacional*, 2, 34-39

Costell, E. (2002). *A comparison of sensory methods in quality control*. *Food quality and Preference*, 13, 345-353

Guerrero, L.; Guàrdia, M.D.; Arnau, J. (2004). *Análisis sensorial de carne y productos cárnicos*. En: *Análisis sensorial de productos alimentarios. Metodología y aplicación al mercado español*. 195-218. Ed. Briz J. Y García R. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

Kramer A. (1959). *Glosary of some terms used in the sensory (panel) evaluation of foods and beverages*. *Food Technology*, 13, 733-738

Lawless, H. T (1994). *Getting results you can trust from sensory evaluation*. *Cereal Foods World*, 39, 809-814

Lawless, H. T. & Heymann, H. (1998). *Sensory evaluation of food*. New York: Chapman & Hall. International Thomson Publishing.

MacFie H. J. H. & Thomson D. M. H. (1994). *Measurement of food preferences*. London: Blakie Academic & Professional.

Meilgaard, M., Civille, G. V. & Carr B. T. (1999). *Sensory Evaluation Techniques*. (3<sup>rd</sup> edition ). Boca Raton. Florida: CRC Press.

Molnar, P. J. (1995). *A model for overall description of food quality*. *Food Quality*

*and Preference*, 6, 185-190

Moskowitz H. R (1993). *Sensory analysis procedures and viewpoints: Intellectual history, current debates, future outlooks*. *Journal of Sensory Studies*, 8, 241-256

Moskowitz H. R. (1994). *Food concepts and products. Just-in time development*. Trumbull, Connecticut: Food & Nutrition Press, Inc

Muñoz, A. M., Civille G.V. & Carr, B. T. (1992). *Sensory evaluation in quality control*. New York: Van Nostrand Reinhold

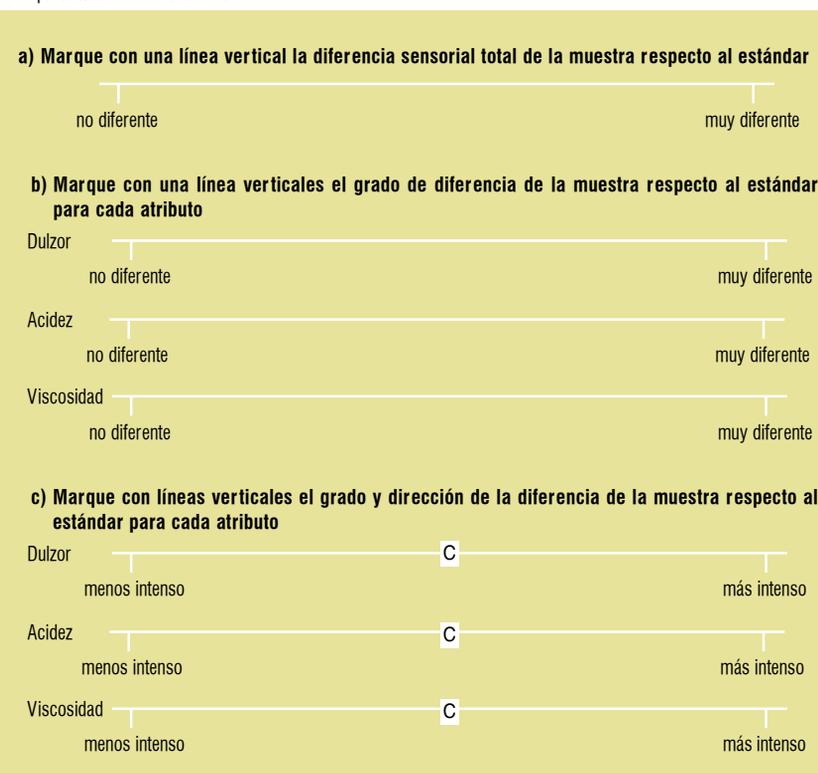
Punter, P. H. (1994). Software for data collection and processing. In J.R. Piggott & A. Paterson, *Understanding natural flavors*. (pp. 97-111). London: Blakie Academic & Professional.

UNE (1993) *Análisis sensorial. Metodología. Evaluación de los productos alimentarios por métodos que utilizan escalas*. UNE 87020. AENOR. Madrid

Yanes, M. (2002) *Influencia de la viscosidad en la liberación del sabor de los alimentos. Aplicación al desarrollo de una formulación de batidos lácteos de bajo contenido calórico*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

FIGURA 9

Escalas para: a) Cuantificar las diferencias sensoriales globales entre una muestra y un producto estándar; b) Cuantificar las diferencias entre una muestra y un producto estándar, respecto a varios atributos previamente seleccionados; c) Cuantificar la dirección de las diferencias entre una muestra y un producto estándar, respecto a varios atributos previamente seleccionados.



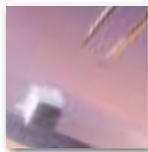
# Instituto *de* Productos lácteos

Modificación de propiedades probióticas y tecnológicas en microorganismos del género *Bifido bacterium* como consecuencia de la adquisición de resistencia a sales biliares



Queso artesanal probiótico:  
un ejemplo de queso funcional

Técnicas microbiológicas  
novedosas para caracterizar  
productos fermentados  
tradicionales



Las aminas biógenas  
en los alimentos

# Modificación de propiedades probióticas en microorganismos del género *Bifido* consecuencia de la adquisición de resis

CLARA G. DE LOS REYES-GAVILÁN, ABELARDO MARGOLLES, PATRICIA RUAS-MADIEDO, LUIS NORIEGA,

## Introducción

El desarrollo de alimentos funcionales es una de las áreas de investigación en alimentación de mayor relevancia en Europa. Está adquiriendo, además, una gran importancia económica debido a la creciente demanda por parte de los consumidores de nuevos productos “de diseño” con efectos beneficiosos para la salud y mejores características sensoriales y reológicas. Un tipo de alimentos funcionales son aquellos que contienen probióticos. Los probióticos orales se han definido como *microorganismos vivos que, tras su ingestión en cierto número, ejercen efectos beneficiosos sobre la salud más allá de la inherente nutrición básica* (Guarner y Schaafsma, 1998). Los probióticos son mayoritariamente, aunque no de forma exclusiva, bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Estos microorganismos son componentes importantes de la microbiota intestinal humana de individuos sanos, en donde se encuentran normalmente en número elevado (del orden de  $10^9$ - $10^{10}$  células por gramo de heces para bifidobacterias). A los probióticos se les atribuyen diversas acciones beneficiosas para la salud aunque la mayoría de estas propiedades no se han demostrado de forma efectiva para todas las cepas consideradas como probióticas, siendo suficiente haber demostrado una de ellas para que el microorganismo sea considerado probiótico.

Aunque cada vez es más amplia la oferta en el mercado de alimentos diferentes conteniendo probióticos, dichos microorganismos se consumen mayoritariamente incluidos en productos lácteos fermentados. Varias razones de tipo práctico y científico contribuyen a explicar este hecho. Los productos lácteos fermentados y en particular las leches fermentadas son alimentos de elevado valor nutricional, están bien introducidos en el merca-

do y gozan de gran aceptación entre los consumidores. Las leches fermentadas son una fuente importante de nutrientes esenciales, como la vitamina A y calcio, y contienen compuestos bioactivos como los esfingolípidos y derivados del ácido linoleico. Además, como consecuencia de la actividad metabólica de los microorganismos se pueden generar péptidos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud (antihipertensivos, anticancerígenos, inmunomoduladores, etc.), se reducen los niveles de lactosa por la actividad  $\beta$ -galactosidasa bacteriana, favoreciendo la mejora de los síntomas de intolerancia a lactosa en las personas que lo padecen, se favorece la solubilización y absorción intestinal de minerales y se pueden sintetizar algunas vitaminas (ácido fólico y niacina) (Clare y Swaisgood, 2000; Tamine y Robinson, 1999).

No obstante, para que los microorganismos probióticos incluidos en leches fermentadas puedan ejercer su efecto beneficioso, han de encontrarse en concentraciones elevadas en el producto y ser capaces de resistir el tránsito gastrointestinal (sobreviviendo a la elevada acidez del estómago, al efecto tóxico de las sales biliares en el intestino y a la acción de los enzimas digestivos) e implantarse o al me-

nos mantenerse un cierto tiempo en el colon, donde van a desarrollar su acción.

## Importancia fisiológica de la síntesis de sales biliares y su transformación microbiana en el colon

Desde el punto de vista de la fisiología humana, la excreción de bilis durante la digestión representa la vía principal de eliminación de colesterol. Los ácidos biliares primarios se sintetizan en el hígado a partir de colesterol y se almacenan como sales conjugadas de los aminoácidos taurina o glicina en la vesícula biliar. Durante la digestión, la bilis se vierte al duodeno (parte proximal del intestino delgado), emulsionándose con las grasas para facilitar su absorción así como la de los componentes liposolubles de la dieta. Las sales biliares conjugadas son reabsorbidas en su mayoría en el íleon (parte distal del intestino delgado), volviendo al hígado por la vena porta para comenzar nuevamente este proceso, que se conoce como “circulación enterohepática de las sales biliares” (Figura 1). Sin embargo, una pequeña fracción de sales biliares no es absorbida en el intestino delgado y alcanza el intestino grueso, eliminándose con las heces. El colon es la zona más densamente poblada de microorganismos del intestino grueso ( $10^{11}$  a  $10^{12}$  bacterias por ml). Allí las sales biliares pueden sufrir principalmente dos tipos de modificaciones por acción de la microbiota intestinal. Las hidrolasas de sales biliares de origen bacteriano liberan el aminoácido y el ácido biliar. El ácido biliar primario en su forma deconjugada puede sufrir a su vez una dehidroxilación para formar los correspondientes ácidos biliares secundarios. La deconjugación la llevan a cabo la mayoría de los microorganismos in-



# y tecnológicas **bacterium** como tencia a sales biliares

BORJA SÁNCHEZ E ISABEL CUEVAS. INSTITUTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE ASTURIAS.  
CSIC. CARRETERA DE INFIESTO S/N. 33300 VILLAVICIOSA. ASTURIAS.



testinales y parece estar más extendida entre las bifidobacterias que entre los lactobacilos (Tanaka y col., 1999). Por el contrario, la dehidroxilación se ha descrito en microorganismos considerados como “no beneficiosos” (Wells y Hylemon, 2000).

La hipercolesterolemia es el principal factor de riesgo en la enfermedad coronaria, habiéndose propuesto el consumo de probióticos como una alternativa para reducir el colesterol sérico en personas con hipercolesterolemia o para mantenerlo en niveles normales en individuos sanos (Taranto y col., 1998). La explicación fisiológica de este hecho se esquematiza en la Figura 1 y se expone brevemente en las siguientes líneas. Al pH ligeramente ácido del intestino grueso los ácidos biliares deconjugados son menos solubles que las correspondientes sales conjugadas (Dietschy y Wilson, 1970) y coprecipitan con el colesterol en el lumen

intestinal (Klaver y van der Meer, 1993; Tahri y col., 1996), uniéndose éste también a las células bacterianas y a la fibra dietética, lo que aumenta su excreción. A través de estos mecanismos la deconjugación aumentará la eliminación de sales biliares y colesterol con las heces (Reyner y col., 1981), conduciendo a una activación de la síntesis de nuevas sales biliares necesarias para reemplazar a las que se han eliminado, lo que provocará finalmente una reducción de los niveles de colesterol sérico. No obstante, y a pesar de esta acción beneficiosa de la deconjugación microbiana de sales biliares, se sabe también que una excesiva deconjugación puede dar lugar a una mala absorción de grasas y vitaminas liposolubles (Reyner y col., 1981). Además, una alta concentración de ácidos biliares secundarios se considera perjudicial y se ha relacionado con la formación de cál-

culos biliares y con un incremento del riesgo de padecer cáncer de colon (Marteau y Rambaud, 1993).

## Interacción de los substratos prebióticos con la microbiota beneficiosa del colon

Los principales substratos para la proliferación microbiana en el colon son los compuestos no digeribles procedentes de la dieta, mayoritariamente carbohidratos, que llegan a esta localización. Algunos de estos carbohidratos pueden ser fermentados de forma preferencial por la microbiota beneficiosa del colon (probióticos), confiriéndole así a estos microorganismos una ventaja selectiva en este ambiente. Estos substratos, denominados **prebióticos**, se definieron como *ingredientes alimentarios no digeribles que afectan de forma beneficiosa al hospedador estimulando selectivamente el crecimiento*

y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, pudiendo mejorar la salud del hospedador (Gibson y Roberfroid, 1995).

Entre los substratos prebióticos se incluyen componentes de la leche (aminoazúcares, galactosil-lactosa, glicomacropéptido de la k-caseína), componentes de las paredes vegetales entre los que se encuentran las hemicelulosas (arabinanos, xilanos, galactanos, glucanos, mananos) y pectinas, materiales de reserva de vegetales (inulina, almidón resistente) y recientemente se considera también que algunos polisacáridos exocelulares producidos por las bacterias lácticas podrían actuar como prebióticos (Ruas-Madiedo y col., 2002).

La fermentación de carbohidratos en el colon da lugar a la liberación al lumen intestinal de ácidos grasos de cadena corta (principalmente acetato, propionato y butirato), gases (anhídrido carbónico, metano e hidrógeno) y ácido láctico (Cummings y col., 2001). Los ácidos grasos de cadena corta pueden actuar directa o indirectamente sobre las células intestinales y participar en el control de varios procesos (Crittenden, 1999) (Figura 2). Junto con el descenso moderado del pH que produce la fermentación de estos carbohidratos, el aumento de las poblaciones de bacterias beneficiosas va a actuar dificultando la proliferación de poblaciones de patógenos, comensales, oportunistas y microorganismos de la putrefacción ("efecto barrera"), lo que conducirá a una mayor resistencia frente a infecciones y a una disminución del metabolismo de proteínas y aminoácidos así

como de enzimas y metabolitos genotóxicos, disminuyendo con ello el riesgo de cáncer. El descenso del pH incrementa la solubilidad de minerales mejorando su biodisponibilidad, contribuye a reducir la formación de ácidos biliares secundarios al inhibir su transformación enzimática a partir de los ácidos biliares primarios (y con ello, el riesgo de cáncer de colon) y aumenta la eliminación de ácidos biliares con las heces (con la consiguiente reducción de los niveles de colesterol sérico). Por otra parte, los ácidos grasos de cadena corta son rápidamente absorbidos por las células del epitelio intestinal. El butirato sirve como fuente de energía a las células del epitelio del colon (colonocitos) y, mediante diversos mecanismos contribuye a prevenir el cáncer de colon (Avivi-Green y col., 2000). Por su parte, el acetato y el propionato llegan al hígado desde el intestino a través de la vena porta. El acetato se incorpora a los procesos de síntesis de colesterol y triglicéridos en el hígado mientras que el propionato actúa como inhibidor competitivo del transporte de acetato al interior de la célula hepática, lo que provoca una disminución de la síntesis de lípidos y colesterol (Delzenne y Williams, 2002), contribuyendo con ello al descenso de los niveles de colesterol en sangre.

### Modificación de propiedades probióticas en bifidobacterias derivadas de la adquisición de resistencia a sales biliares

Entre las barreras fisiológicas que los microorganismos probióticos han de su-

perar para poder establecerse en el colon, la elevada concentración de sales biliares del intestino delgado tiene una particular relevancia. La presencia de sales biliares representa un importante factor de estrés para las células ya que son detergentes biológicos que desorganizan las membranas celulares. Por ello, los microorganismos intestinales han debido desarrollar estrategias a nivel celular y molecular para poder "tolerar" y defenderse de la acción altamente tóxica de estos compuestos. Se sabe que algunos microorganismos probióticos son capaces de adaptarse con relativa facilidad *in vitro* a altas concentraciones de ácidos y sales biliares por exposición progresiva a concentraciones gradualmente crecientes de estos compuestos (Ibrahim y Bezkorovainy, 1993). En nuestro laboratorio hemos comprobado recientemente que en bifidobacterias los niveles de resistencia adquiridos frente a sales biliares son estables y se mantienen invariables durante generaciones en ausencia del agente selectivo (sales biliares). De hecho, los derivados adaptados son capaces de multiplicarse *in vitro* en presencia de concentraciones de sales biliares muy superiores a las soportadas por las cepas de origen más sensibles (Margolles y col., 2003). Además, la adquisición de resistencia frente a una determinada sal biliar confiere resistencias cruzadas frente a otras sales biliares y conduce también, en algunos casos, a un aumento concomitante de la supervivencia a pH ácido (Noriega y col., 2004). De forma notable se produce en algunos

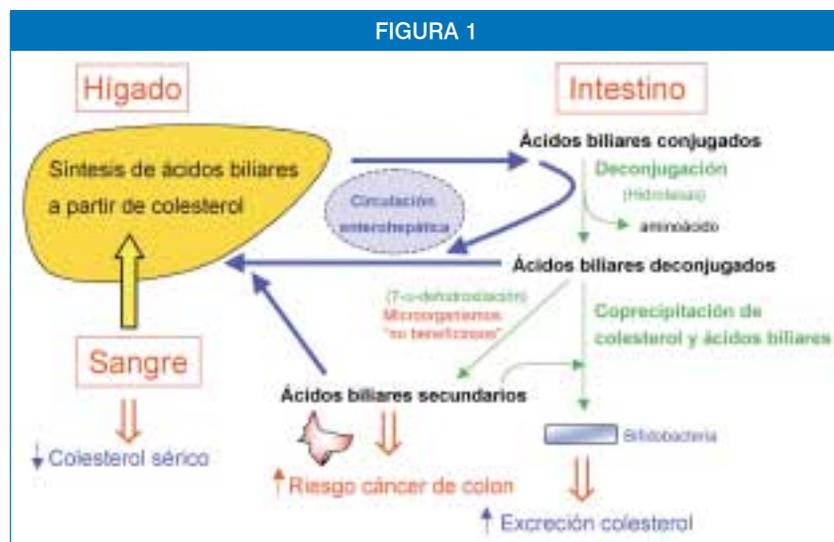


de estos microorganismos un incremento en los niveles de algunas actividades enzimáticas implicadas en la degradación de carbohidratos, lo que podría conducir a una utilización más eficiente de fuentes de carbono (Noriega y col., 2004; Sánchez y col., 2004). Otro hecho curioso es que estos microorganismos presentan una mayor adhesión a mucus intestinal humano que las cepas de origen (Gueimonde y col., resultados no publicados), lo que podría aumentar la eficacia del “efecto barrera” frente a la proliferación de microorganismos indeseables o inclusive modificar de alguna manera la acción moduladora del sistema inmune que se atribuye a algunos probióticos (McFarlane y Cummings, 2002). Todos estos fenómenos parecen indicar que la exposición de bifidobacterias a elevadas concentraciones de sales biliares podría inducir un efecto sinérgico de adaptación (Figura 3), aumentando en estos microorganismos su resistencia a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (pH bajo en el estómago, elevadas concentraciones de sales biliares en el intestino) y favoreciendo su permanencia posterior en el colon. La alteración del nivel de ciertas actividades enzimáticas relacionadas con la utilización de carbohidratos en las cepas de *Bifidobacterium* con resistencia adquirida a sales biliares podría tener, además, una función importante en el metabolismo celular, preparando a estos microorganismos para una utilización más eficiente de los carbohidratos disponibles en el colon.

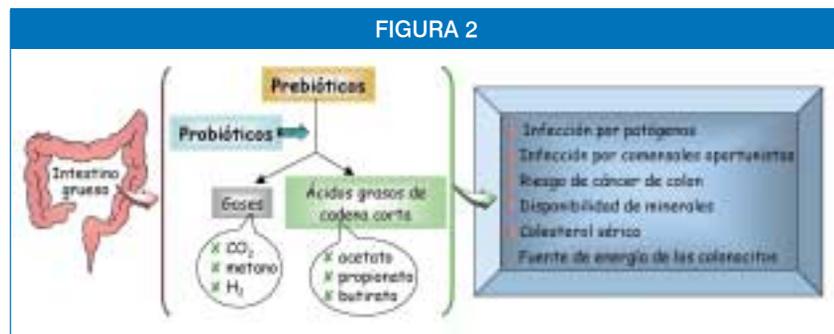
### Importancia tecnológica de la adquisición de resistencia a sales biliares

Como paso previo a la utilización de cepas de *Bifidobacterium* resistentes a sales biliares como cultivos adjuntos en ali-

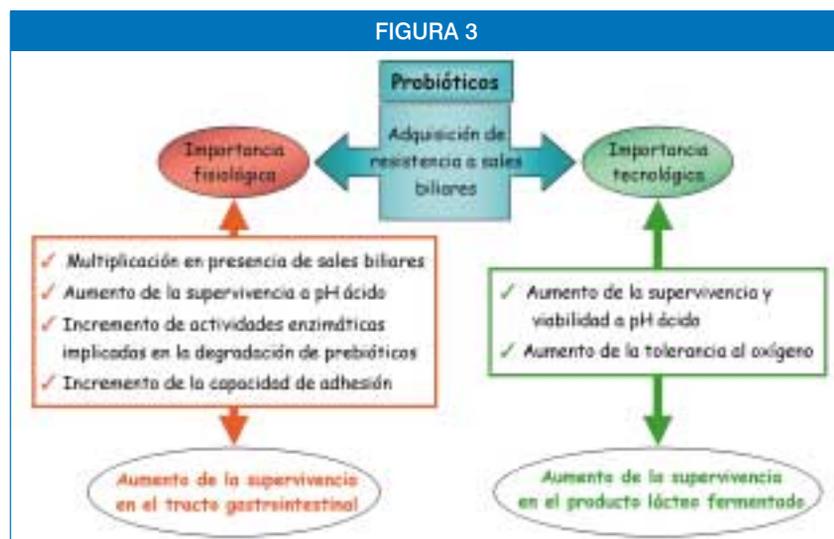
mentos, es conveniente comprobar que no hayan adquirido también propiedades indeseables tales como la resistencia a antibióticos, determinadas actividades enzimáticas relacionadas con la conversión de precarcinógenos en carcinóge-



Circulación enterohepática y transformación microbiana de las sales biliares en el colon.



Interacción de los substratos prebióticos con la microbiota beneficiosa del colon.



Importancia fisiológica y tecnológica de la adquisición de resistencia a sales biliares en bifidobacterias.



nos, capacidad de translocar y, por tanto, de atravesar la barrera intestinal y asentarse en otras localizaciones, etc.

A la espera de que las pruebas sobre la seguridad en el empleo de estos derivados resistentes a sales biliares se vayan llevando a cabo, se puede indicar que la adquisición de resistencia a sales biliares podría ser también de interés tecnológico (Figura 3). Así, el aumento de la supervivencia a pH ácido que se ha comentado anteriormente, podría contribuir también a aumentar la viabilidad y supervivencia de estos microorganismos en alimentos fermentados (principalmente productos lácteos), dado que uno de los principales problemas de la adición de probióticos es la pérdida de viabilidad de los mismos debido a la acidez del producto.

Las bifidobacterias presentan un grado de tolerancia al oxígeno variable, pero en general son considerablemente más anaerobias que otras bacterias lácticas, lo cual plantea dificultades para la utilización industrial (en especial para la elaboración de leches fermentadas) de algunas cepas con poca o nula tolerancia al oxígeno. Recientemente se ha comprobado que algunas bifidobacterias resistentes a sales biliares son también más tolerantes al oxígeno (Talwalkar y Kailasapathy, 2004), lo que podría contribuir a aumentar su supervivencia en los alimentos en los que no existan condiciones de anaerobiosis estrictas.

En resumen, podemos decir que los probióticos (particularmente bifidobacterias) con resistencia adquirida a sales biliares se perfilan como una herramienta útil para la obtención de microorganismos con propiedades probióticas y tecnológicas mejoradas que se pueden aplicar a la elaboración de alimentos funcionales, no sin antes realizar los necesarios estudios *in vitro* e *in vivo* para demostrar la seguridad y eficacia de su empleo.

Agradecemos al Ministerio de Ciencia y Tecnología la concesión del proyecto AGL2001-2296, con el que se han obtenido parte de los resultados aquí expuestos.

## Bibliografía

- Avivi-Green, C., Polak-Charcon, S., Madar, Z. y Schwartz, B. (2000). Apoptosis cascade proteins are regulated *in vivo* by high intracolonic butyrate concentration: correlation with colon cancer inhibition. *Oncol. Res.* 12: 83-95.
- Clare, D.A. y Swaisgood, H.E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *J. Dairy Sci.* 83: 1187-1195.
- Crittenden, R.G. (1999). Prebiotics. *En Probiotics, a critical review*, G.W. Tannock (ed.), p. 141-156. Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, England.
- Cummings, J.H., Macfarlane, G.T. y Englyst, H.N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2 Suppl.): 415-420S.
- Delzenne, N.M. y Williams, C.M. (2002). Prebiotics and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13: 61-67.
- Dietschy, J.M. y Wilson, D.J. (1970). Regulation of cholesterol metabolism. *New England J. Med.* 282: 1179-1241.
- Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- Guarner, F. y Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 237-238.
- Ibrahim, S.A. y Bezkorovainy, A. (1993). Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt. *J. Sci. Food Agric.* 62: 351-354.
- Klaver, F.A.M. y van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1120-1124.
- Macfarlane, G.T. y Cummings, J.H. (2002). Probiotics, infection and immunity. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15: 501-506.
- Margolles, A., García, L., Sánchez, B., Gueimonde, M. y de los Reyes-Gavilán, C.G. (2003). Characterisation of a *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to cholate- A preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 191-198.
- Marteau, P. y Rambaud, J.C. (1993). Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 207-220.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sánchez, B., Margolles, A. y de los Reyes-Gavilán, C.G. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* (en prensa).
- Reyner, M.O., Montet, J.C., Gerolami, A., Marteau, C., Crotte, C., Montet, A.M. y Mathieu, S. (1981). Comparative effects of cholic, chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on micellar solubilization and intestinal absorption of cholesterol. *J. Lipid Res.* 22: 467-473.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. y Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 12: 163-171.
- Sánchez, B., Noriega, L., Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C.G. y Margolles, A. (2004). Acquired resistance to bile increases fructose-6-phosphate phosphoketolase activity in *Bifidobacterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* (en prensa).
- Tahri, K., Grill, J.P. y Schneider, F. (1996). Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Curr. Microbiol.* 33: 187-193.
- Tamine, A.Y. y Robinson, R.K. (1999). *Yoghurt: Science and Technology*. A.Y. Tamine & R.K. Robinson (eds.). Pergamon Press, Oxford, England.
- Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T. y Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J. Dairy Sci.* 82: 2530-2535.
- Taranto, M.P., Medici, M., Perdigon, G., Ruiz Holgado, A.P. y Valdez, G.F. (1998). Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J. Dairy Sci.* 81: 2336-2340.
- Talwalkar, A. y Kailasapathy, K. (2004). The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 5: 1-8.
- Wells, J.E. y Hylemon, P.B. (2000). Identification and characterization of a bile acid 7 $\alpha$ -dehydroxylation operon in *Clostridium* sp. strain TO-931, a highly active 7 $\alpha$ -dehydroxylating strain isolated from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1107-1113. ■

**AgroCSIC**

CENTRO DEL CSIC: Instituto de Productos Lácteos de Asturias.

Web: [www.ipla.csic.es](http://www.ipla.csic.es)

Nombre Investigador: Clara González de los Reyes-Gavilán.

E-mail: [greyes\\_gavilan@ipla.csic.es](mailto:greyes_gavilan@ipla.csic.es)

Objetivo general de la investigación:

- Estudio de propiedades probióticas (resistencia a sales biliares, utilización de sustratos prebióticos, influencia en el metabolismo del colesterol y carbohidratos) y tecnológicas (mejora de la viscosidad y textura de leches fermentadas, viabilidad en productos fermentados) en microorganismos del género *Bifidobacterium* y otras bacterias lácticas de origen comercial y humano.

# Queso artesanal probiótico: un ejemplo de queso funcional

FERNANDA FERNÁNDEZ, COVADONGA BARBÉS. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. UNIDAD ASOCIADA DEL CSIC. DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL. UNIVERSIDAD DE OVIEDO. CAMPUS DEL CRISTO, S/N. 33006 OVIEDO.  
ANA RODRÍGUEZ. INSTITUTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE ASTURIAS (IPLA-CSIC). 33300 VILLAVICIOSA, ASTURIAS.



*El descubrimiento accidental de la capacidad de transformar la leche en productos lácteos (leches fermentadas y quesos) tuvo lugar hace unos 8.000 años en la antigua Mesopotamia, y esto supuso un importante hito en la historia de la humanidad: permitió la diversificación de la dieta y estableció un sistema de conservación de alimentos, la fermentación. La transformación de leche ocurría por acción de la microbiota presente en la misma de forma natural, principalmente las bacterias lácticas. Sin embargo, hasta el siglo XIX no se supo que en la coagulación ácida de la leche intervenían bacterias, concretamente, la especie *Bacterium lactis*, definida por Lister, denominada posteriormente *Streptococcus lactis* y actualmente, *Lactococcus lactis* (Fox et al., 2000).*

La elaboración industrial de productos lácteos fermentados se inició a principios del siglo XX. En esa época, el científico ruso Elie Metchnikoff (1845-1916) estableció la hipótesis según la cual, los habitantes de los Balcanes tenían una gran longevidad porque consumían leches fermentadas, lo que favorecía la colonización del intestino por bacterias lácticas, las cuales inhibían la putrefacción provocada por bacterias patógenas. Por lo tanto, éste sería el primer ejemplo de lo que actualmente se denominan **alimentos funcionales**, ya que se establecía una relación entre el consumo habitual de un producto lácteo fermentado y el efecto beneficioso para la salud, además del aporte nutritivo básico.

El término alimento funcional fue acuñado en Japón en los años ochenta para describir alimentos suplementados con ingredientes que resultaban beneficiosos para la salud. Desde entonces, el mercado de estos alimentos ha tenido un gran desarrollo, influido por el cambio en las actitudes y expectativas de los consumidores, por el mejor conocimiento de la relación entre componentes de la dieta y los procesos fisiológicos, y por los avances en el área de la ciencia y tecnología de los alimentos (Hillian, 1998).

En los últimos años se está realizando un gran esfuerzo investigador para establecer la base científica que demuestre la relación entre los componentes funcionales o los alimentos que los contienen y un determinado efecto positivo sobre la salud. En la Unión Europea aún no existe una legislación armonizada al respecto; sólo refleja con claridad la prohibición de incluir en las etiquetas cualquier referencia a propiedades preventivas, terapéuticas o curativas. Existen, no obstante, en diferentes Estados Miembros de la UE, directrices sobre las Alegaciones de Salud de los alimentos funcionales. En Estados Unidos, la FDA permite desde 1993 hacer

referencia a las alegaciones de salud siempre que existan evidencias científicas públicamente disponibles, pero es Japón quien tiene una legislación más desarrollada. En 1991 se estableció el concepto de “Alimentos para Uso Específico en la Salud” (Foods for Specified Health Use, FOSHU). Los alimentos incluidos en esta categoría deben estar avalados por ensayos científicos contrastados, que demuestren las propiedades beneficiosas para la salud cuando son consumidos en la dieta habitual.

En la larga lista de alimentos funcionales cabe destacar los aportados al mercado por la industria láctea: las *leches enriquecidas*, a las que se les añaden ácidos grasos omega-3, ácido oleico, ácido fólico, calcio, vitaminas, fósforo, etc; las *leches fermentadas* suplementadas con calcio, vitaminas y ácidos grasos omega-3, habiendo recibido una especial promoción aquellas que contienen **bacterias probióticas**, a las que se les atribuyen funciones sobre la fisiología y ecología intestinal.

El término “probiótico” fue inicialmente definido por Parker (1974) como *organismos y sustancias que contribuyen a mantener el balance microbiano intestinal*, concepto impreciso posteriormente revisado por Fuller (1989) que los define como *suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al huésped*



animal mediante la mejora del equilibrio microbiano intestinal. Años más tarde, Guarner y Schaafsma (1998) definen el término como *microorganismos vivos que, al ser ingeridos en un determinado número, ejercen efectos saludables sobre el huésped, más allá del aspecto nutricional*. Por último, Salminen *et al* (1999) ampliaron la definición al considerar probióti-

## “Un producto lacteo funcional alternativo potencialmente más largo, sería el que

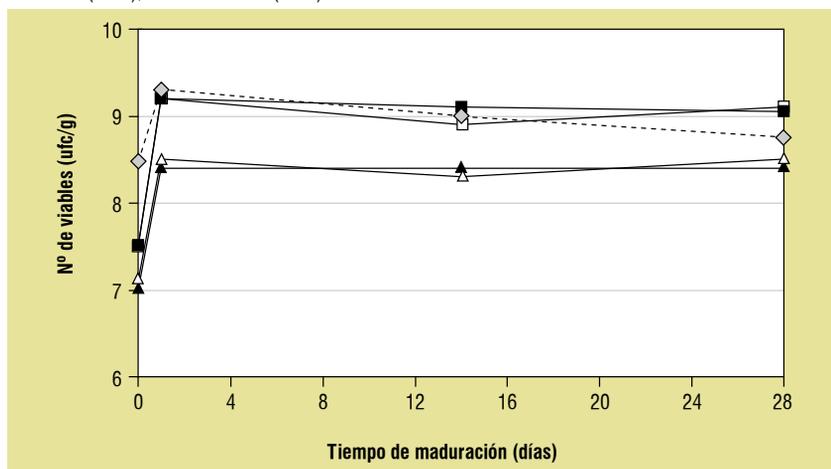
FIGURA 1. QUESO ARTESANAL ELABORADO CON LECHE DE CABRA: CONTROL (A) Y PROBIÓTICO (B)



Como cultivo iniciador se utilizó el fermento mesófilo IPLA-001. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004 fue la cepa probiótica utilizada como cultivo adjunto.

FIGURA 2

Supervivencia de la cepa probiótica *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004 y de las cepas del cultivo iniciador mesófilo IPLA-001 durante la maduración de un queso artesanal de leche de cabra. Los símbolos abiertos corresponden al queso control y los cerrados al queso probiótico: cepa probiótica (◊); lactococos (◻■); LEUCONOSTOC (△▲).





rium, siendo utilizados fundamentalmente en la elaboración de leches fermentadas. Estos productos se consumen normalmente en un plazo breve de tiempo tras su elaboración. Un producto lácteo funcional alternativo, con un período de consumo potencialmente más largo, sería el **queso probiótico**.

La utilización de un microorganismo probiótico como *cultivo adjunto* en la elaboración de queso solamente dará lugar a un queso funcional si se mantiene la viabilidad del microorganismo durante el período de maduración del queso, y si las características organolépticas no son afectadas negativamente. Por lo tanto, antes de incorporar una bacteria probiótica en un producto lácteo es necesario hacer ensayos de viabilidad y de funcionalidad durante el proceso de elaboración y el período de vida útil del producto. Fruto de esa necesidad son los trabajos realizados por diferentes científicos con diferentes cepas probióticas en distintos tipos de queso (Ross *et al.*, 2002; Stanton *et al.*, 1998; Gardiner *et al.*, 1998; Gardiner *et al.*, 1999).

El queso ofrece una serie de ventajas con respecto a las leches fermentadas como vehículo de microorganismos probióticos: el pH más elevado, la mayor consistencia, el mayor contenido en grasa y la mayor capacidad tamponante son fac-

tores que contribuyen a la protección de los microorganismos probióticos durante el tránsito gastro-intestinal, facilitando por lo tanto, la llegada al intestino de un mayor número de células viables.

Prácticamente todos los trabajos de desarrollo de quesos funcionales probióticos se han hecho en variedades de queso de producción industrial (Cheddar, Cottage, Gouda, Ras, etc.). En la elaboración de dichos quesos se han utilizado distintas cepas probióticas, que pertenecen a las especies *Lactobacillus paracasei*, *Lact. acidophilus*, *Lact. helveticus*, *Lact. rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. longum* y *B. lactis*.

Sorprendentemente, no existen referencias sobre ensayos similares realizados en *quesos artesanales*, los cuales son especialmente apreciados por los consumidores por la "singularidad" de sus características organolépticas, reflejo de la variedad de tradiciones y métodos de elaboración. La producción de estos quesos se restringe a áreas geográficas muy localizadas, a las que a menudo deben su nombre, y se lleva a cabo en pequeñas queserías, frecuentemente unifamiliares.

En este contexto, cabe señalar que Asturias es la Comunidad Autónoma española que posee la mayor variedad de quesos artesanales, contabilizándose en este momento más de 40 quesos diferentes, entre los que se encuentran quesos de leche de vaca, de cabra, de oveja, y de mezcla. La producción de queso se extiende por todo el territorio asturiano, si bien es en la zona oriental donde se elabora la mayor variedad. La importancia del sector lácteo en la región, con una producción anual de 665,2 millones de litros de leche de vaca, al que hay que añadir una pequeña producción de leche de oveja (145.000 litros) y de leche de cabra (550.000 litros), favorece sin lugar a dudas la producción de quesos (SADEI, 2002).

A pesar del escaso número de queserías artesanales asturianas que elaboran queso de leche de cabra (Varé, Ovin, Porrúa, La Collada, La Chivita), hemos elegido un queso de este tipo para desarrollar un *queso artesanal funcional* (Figura 1) por las interesantes características de este tipo de leche con respecto a la de vaca, tales como mayor digestibilidad (Alferez *et al.* 2001), y menor capacidad alérgica (Spurgin *et al.*, 1997), atribuyéndosele incluso valor terapéutico en nutrición humana (Barrionuevo *et al.*, 2002).

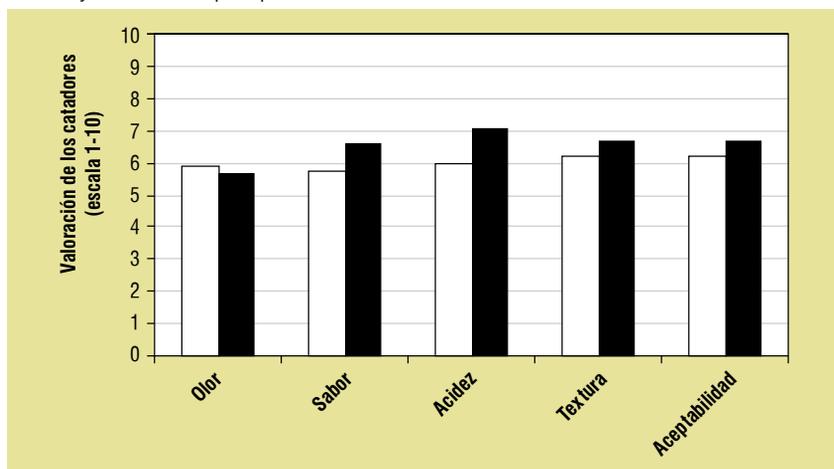
cos no sólo las preparaciones de células microbianas sino también a los componentes de células microbianas que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud humana.

Los microorganismos probióticos que se utilizan en la elaboración de productos lácteos pertenecen mayoritariamente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacte-*

## vo, con un periodo de consumo so probiótico”

FIGURA 3

Análisis sensorial de queso artesanal de leche de cabra (control y probiótico) de 28 días de maduración. Se representan las puntuaciones obtenidas en una prueba de aceptación (escala 1-10), en la que los catadores han valorado olor, sabor, textura, acidez y aceptabilidad. Las barras abiertas corresponden al queso control y las cerradas al queso probiótico.



## Material y Métodos

En la elaboración de queso probiótico se ha utilizado el cultivo iniciador mesófilo IPLA-001 constituido por las cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 947, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 y *Leuconostoc citreum* IPLA 616 (Cárcoba *et al.*, 2000). La cepa probiótica *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004, aislada de heces de un recién nacido, y con propiedades probióticas contrastadas, entre las que cabe citar la resistencia a las condiciones del jugo gástrico, adherencia específica a células intestinales humanas e inhibición del crecimiento de microorganismos enteropatógenos (Boris, 1997; Fernández, 2002), fue utilizada como cultivo adjunto (para facilitar la identificación de la cepa probiótica se utilizó un mutante resistente a rifampicina, obtenido por selección natural).

Se elaboraron dos lotes de queso de leche de cabra en la planta piloto del IPLA (CSIC) siguiendo el protocolo de fabricación tradicional empleado en una quesería artesanal de la zona oriental de Asturias. La leche de cabra, pasteurizada a 65°C durante 30 minutos, y enfriada posteriormente a 34°C, fue distribuida en dos cubas de quesería de 15 litros de capacidad (control y experimental). La leche fue entonces suplementada con CaCl<sub>2</sub> (0,02 %), añadiendo seguidamente el cultivo iniciador al 1% (vol/vol) a las dos cubas. La cepa prebiótica UO 004, previamente propagada en medio LAPTg (Raibaud *et al.*, 1961) durante 20 horas, y posteriormente suspendida en leche, se añadió a la cuba experimental en una

concentración final de entorno a 10<sup>8</sup> ufc/ml. Cuando la acidez de la leche alcanzó un 0,14% (porcentaje de ácido láctico), se añadieron a ambas cubas 0,3 g/l de cuajo de origen animal (actividad 1:10.000). El período de coagulación se prolongó durante unos 35 min. Se procedió entonces al corte de la cuajada hasta alcanzar un tamaño de grano de 5 mm, manteniéndose en agitación durante 30 min., al cabo de los cuales se procedió al escaldado de la misma eliminando la mitad del suero y reemplazándolo por agua pasteurizada caliente (55°C). Cuando los granos de cuajada alcanzaron la dureza adecuada, se eliminó el suero y se distribuyó la cuajada en moldes redondos que se prensaron (2 kg/cm<sup>2</sup>) durante 1,5 horas y posteriormente se mantuvieron en salmuera durante 5 horas. La maduración de las piezas de queso se prolongó durante 28 días a 12°C y 85% de humedad relativa.



## Análisis físico-químicos y microbiológicos

Se llevaron a cabo análisis físico-químicos y microbiológicos de muestras de leche y de queso a lo largo de la maduración. En dichas muestras se midió el pH, la acidez titulable (Cárcoba *et al.*, 2000), extracto seco, grasa y proteína (Rilla *et al.*, 2003). Asimismo, se determinó la evolución de las cepas del cultivo iniciador y de la cepa probiótica a lo largo de la maduración. Para el recuento de lactococos se utilizó agar M17-lactosa (Oxoid) (32°C, 48 h) y para el recuento de leuconostoc, agar de Mayeux (Scharlau) (21°C, 4 días). El recuento de la cepa probiótica se realizó en medio

LAPTg + rifampicina (100 µg/ml) (37°C, 48 h).

## Análisis sensorial

Al final del período de maduración, un panel de 13 catadores realizó el análisis sensorial de los quesos (control y experimental). Se utilizó una escala de 1 a 10 para evaluar las siguientes características: olor, sabor, acidez y aceptabilidad global.

## Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± desviación típica. La comparación entre los quesos control y experimental se llevó a cabo mediante el test Mann-Whitney.

## Resultados y Discusión

La evolución del pH (5,57-5,59) y de la acidez (0,75-0,8) del queso probiótico es prácticamente idéntica a la observada en

TABLA 1: EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE QUESO ARTESANAL DE LECHE DE CABRA (CONTROL Y PROBIÓTICO) DURANTE LA MADURACIÓN

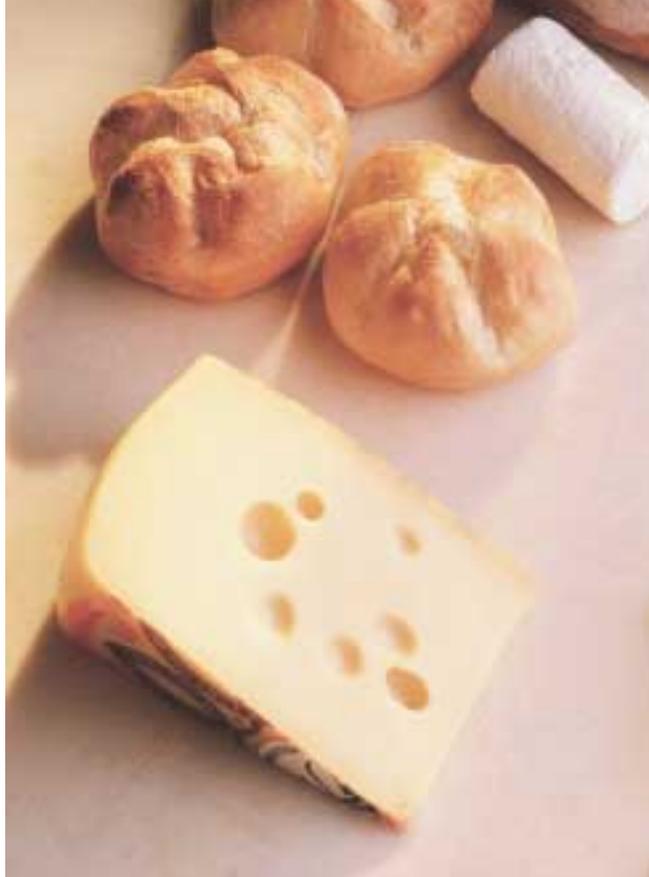
Muestra	pH	Acidez <sup>a</sup> (%)	ES <sup>b</sup> (%)	Proteína <sup>c</sup> (%)	Grasa <sup>c</sup> (%)
Leche	6,50 ± 0,06	0,11 ± 0,07	13,14 ± 1,07	25,24 ± 0,64	30,06 ± 3,75
Queso control (14 días)	5,57 ± 0,09	0,75 ± 0,07	63,29 ± 6,30	46,40 ± 2,06	48,51 ± 2,54
Queso probiótico (14 días)	5,57 ± 0,22	0,72 ± 0,02	63,45 ± 7,31	45,63 ± 2,53	50,10 ± 0,92
Queso control (28 días)	5,59 ± 0,08	0,75 ± 0,01	62,79 ± 8,73	47,62 ± 1,40	54,07 ± 1,25
Queso probiótico (28 días)	5,59 ± 0,37	0,80 ± 0,21	62,2 ± 1,04	42,91 ± 2,58	53,72 ± 4,71

<sup>a</sup>Acidez: se expresa en gramos de ácido láctico en 100 g. de leche o queso. <sup>b</sup>ES: extracto seco. <sup>c</sup>Proteína y grasa: expresadas como porcentaje de extracto seco.

el queso control (Tabla 1). Con respecto al extracto seco, grasa y proteína, ambos tipos de queso mostraron ligeras diferencias, que no afectaron a la aceptabilidad del queso por parte de los catadores.

La evolución de las cepas del cultivo iniciador y de la cepa probiótica a lo largo de la maduración se observa en la Figura 2. El aumento en el número de viables de las cepas del cultivo iniciador detectado en la cuajada se debe al crecimiento bacteriano y a la concentración celular que ocurre como consecuencia del desuerado, no observándose diferencias significativas entre los dos tipos de queso ( $P>0,05$ ). Los viables experimentan un ligero descenso en la fase intermedia

de maduración, recuperándose ligeramente al final de la misma. La tendencia evolutiva de la cepa de leuconostoc es similar, aunque siempre se mantiene en niveles inferiores a los lactococos. Especialmente destacable es el comportamiento de la cepa probiótica *Lact. delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004. A pesar de su escaso crecimiento en leche, esta cepa mantiene la viabilidad a lo largo de la maduración en niveles superiores a  $10^8$  ufc/g, por encima de la dosis recomendada para que la cepa ejerza el efecto probiótico (Knorr, 1998), lo que refleja su compatibilidad con las cepas del cultivo iniciador. Así pues, el queso de leche de cabra elaborado en este estudio, con un pH similar al de otros quesos elaborados con ese tipo de leche (Martín-Hernández *et al.*, 1992; Gomes & Malcata, 1998), es un vehículo adecuado para la ingestión de la cepa probiótica UO 004 por los consumidores,



de modo que la misma alcance el tracto gastro-intestinal.

La utilización de cultivos adjuntos constituidos por cepas del género *Lactobacillus* permite contrarrestar la escasa presencia de microbiota láctica secundaria en quesos elaborados con leche pasteurizada, a la cual se le atribuye un importante papel en el desarrollo del sabor y aroma del queso (McSweeney *et al.*, 1994). En nuestro estudio, el ácido láctico es el producto metabólico mayoritario en ambos tipos de queso, aunque los niveles detectados son ligeramente superiores en el queso control. Sin embargo, la presencia de la cepa probiótica parece favorecer el consumo del citrato por las cepas fermentadoras de citrato del cultivo iniciador, observándose concentraciones más elevadas de compuestos volátiles tales como diacetilo y acetoina; También se detectaron niveles de ácido acético superiores en el queso probiótico

(datos no mostrados). Así pues, la inclusión de la cepa probiótica *Lact. delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004 proporciona al queso una mayor complejidad de productos metabólicos implicados en el desarrollo de las características organolépticas. El resultado del análisis sensorial indica una valoración ligeramente superior del queso probiótico (Figura 3).

### Conclusión

Dada la amplia variedad de quesos existentes, entre los que podemos citar quesos frescos o madurados, blandos, semiduros o duros, elaborados con leche de vaca, de oveja, de cabra, o de mezclas, grasos, semigrasos o desnatados, etc. cada consumidor podrá elegir el que se adapte mejor a sus exigencias gastronómicas. Por lo tanto, esta amplia oferta abre enormes posibilidades al desarrollo de *quesos probióticos* con características organolépticas muy diversas que, sin lugar a dudas, contribuirán a satisfacer la creciente demanda de alimentos funcionales. En este contexto, las queserías artesanales tienen una gran oportunidad para consolidar su posición en un mercado muy competitivo si consiguen introducirse en el sector de alimentos funcionales mediante la elaboración de variedades probióticas de queso. Un claro ejemplo de que esto es posible lo constituye el queso presentado en este trabajo, elaborado con leche de cabra, en el que se ha incluido la cepa probiótica de origen humano *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto coordinado AGL2000-1611-CO3).

### Referencias

Alferez, M.J., Barrionuevo, M., López-Aliaga, I., Sanz-Sampelayo, M.R., Lisbona, F., Robles, J.C., Campos, M.S. (2001). Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *J Dairy Research*, 68: 451-461.

Barrionuevo, M., Alferez, M.J.M., López-Aliaga, I., Sanz-Sampelayo, M.R., Campos, M.S. (2002). Beneficial effect of goat milk on

nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *J. Dairy Science*, 85: 657-664.

Boris, S. (1997). Caracterización de cepas de *Lactobacillus* de origen humano par su posible uso como probióticos. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Oviedo. Asturias.

Cárcoba, R., Delgado, T., Rodríguez, A. (2000). Comparative performance of a mixed strain starter in cow's milk, ewe's milk and mixtures of these milks. *Food Research and Technology*, 211, 141-146.

Fernández, F. (2002). Propiedades probióticas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO

004, un aislado intestinal humano. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Oviedo. Asturias.

Fox, P. F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2000). Cheese: Historical Aspects. En *Fundamentals of Cheese Science*. AN Aspen Publication. pp. 1-9.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Applied Bacteriology*, 66: 365-378.

Gardiner, G., Ross, R.P., Collins, J.K., Fitzgerald, G., Stanton, C. (1998). Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl. Environ. Microbiology*, 64: 2192-2199.

Gardiner, G., Satanton, C., Lynch, P.B., Co-

llins, J.K., Fitzgeralds, G., Ross, R.P. (1999). Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *J. Dairy Science*, 82: 1379-1387.

Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. (1998). Development of probiotic cheese manufactured from gota milk: response surface analysis via technological manipulation. *J. Dairy Science*, 81: 1492-1507.

Guarner, F., Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *International J Food Microbiology*, 39: 237-238.

Hillian, M. (1998). The market for functional foods. *International Dairy J.* 8: 349-354.

Knorr, D. (1998). Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends in Science and Food Technology*, 8: 295-306.

Martín-Hernández, M.C., Juárez, M., Ramos, M. (1992). Biochemical characteristics of three types of goat cheese. *J. Dairy Science*, 75: 1747-1752.

McSweeney, P.L.H., Walsh, E.M., Fox, P.F., Cogan, T.M., Drinan, F.D., Castelo-Gonzalez, M. (1994). A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish J. Agricultural Food Research*, 33: 183-192.

Parker, R. B. (1974). Probiotics, the other

half of the antibiotic story. *Animal Nutr. Health.* 29: 4-8.

Raibaud, P., Caulet, M., Galpin, J.V., Moquot, G., (1961). Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *J. Appl. Bacteriology*. 24: 285-306.

Rilla, N., Martínez, B., Delgado, T., Rodríguez, A. (2003). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* I Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *International J Food Microbiology*, 85: 23-33.

Ross, R.P., Fitzgerald, G., Collins, K., Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures – probiotic cheese. *Aust. J. Dairy Technology*, 57: 71-78.

SADEI (Sociedad Asturiana de Estudios Económicos e Industriales). (2002). Cuentas económicas de la agricultura asturiana.

Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y.K. (1999). Probiotic: how should they be defined?. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 107-110.

Spuergin, P., Walter, M., Schiltz, E., Deichman, K., Forster, J., Mueller, H. (1997). Allergenicity of a-caseins from cow, sheep, and goat. *Allergy*, 52: 293-298.

Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P.B. Collins, J.K., Fitzgerald, G., Ross, R.P. (1998). Probiotic cheese. *International. Dairy J.*, 8: 491-496. ■

CENTRO DEL CSIC: Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA).

Web: [www.ipla.csic.es](http://www.ipla.csic.es)

Departamento: Biotecnología y caracterización de alimentos. Productos lácteos.

Nombre Investigador: Ana Rodríguez González (Científico Titular).

E-mail: [anarguez@ipla.csic.es](mailto:anarguez@ipla.csic.es)

Tendencias de Investigación:

- Desarrollo de cultivos indicadores para queso (quesos tradicionales y funcionales).
- Bioconservación de alimentos mediante bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (cultivos protectores y producción de bioconservantes).

CENTRO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO: Facultad de Medicina. Campus del Cristo, s/n. 33066 Oviedo. Asturias.

Web: [www.uniovi.es/biofun/microbiologia.html](http://www.uniovi.es/biofun/microbiologia.html)

Departamento: Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología (Unidad Asociada del CSIC).

Nombre Investigador: Covadonga Barbés Miguel (Profesora Titular).

E-mail: [cbarbes@uniovi.es](mailto:cbarbes@uniovi.es)

Tendencias de Investigación:

- Caracterización de lactobacilos de origen humano como probióticos: Estudios "in vitro" e "in vivo".
- 1. Aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales (lácteos).
- 2. Aplicación como agentes bioterapéuticos en la corrección de trastornos del tracto gastrointestinal y genitourinario.

# CTC Alimentación

## EN LA RED

A través de la página web del  
Centro Tecnológico Nacional  
de la Conserva,

[www.ctnc.es](http://www.ctnc.es)

puede descargar en su ordenador  
la publicación "CTC Alimentación".

El servidor del CTC dispone de la última revista  
publicada, así como números atrasados.

El archivo es en formato PDF y será necesario tener instalado  
Adobe Acrobat versión 3.0 o superior.



# Técnicas microbiológicas novedosas para caracterizar productos fermentados tradicionales

---

BALTASAR MAYO Y ANA BELÉN FLÓREZ. INSTITUTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE ASTURIAS (CSIC).  
CARRETERA DE INFIESTO, S/N. 33.300 VILLAVICIOSA. ASTURIAS. E-MAIL: BALTASAR.MAYO@IPLA.CSIC.ES





## INTRODUCCIÓN

Mediante la utilización de diversas técnicas moleculares se ha demostrado de manera convincente que las técnicas microbiológicas convencionales no son capaces de proporcionar una visión real de la diversidad microbiana de hábitats complejos. En estos nichos, un gran número de especies interactúan y compiten por todo tipo de recursos. Muchos microorganismos son difíciles de cultivar porque requieren factores de crecimiento desconocidos o tienen relaciones de dependencia con otros microbios o se encuentran en un estado fisiológico no cultivable. En estas condiciones las técnicas de cultivo clásicas subestiman la diversidad, y muchas veces ni siquiera son capaces de cuantificar los grupos mayoritarios.

Con el fin de paliar estas limitaciones, en los últimos tiempos se han desarrollado técnicas microbiológicas moleculares que no requieren del cultivo de los microorganismos para su detección y cuantificación (Amann y col., 1995). Algunas técnicas se utilizan para identificar y cuantificar los componentes individuales, mientras que otras sirven para tipificar las poblaciones. Entre las primeras tenemos la construcción y análisis de genotecas de secuencias muy conservadas y la

hibridación *in situ* con sondas fluorescentes. De las segundas las más importantes son la hibridación cuantitativa de ADN o ARN, la electroforesis en geles desnaturizantes, el análisis del polimorfismo conformacional de la cadena sencilla o su polimorfismo de restricción.

Excepto las técnicas de hibridación, las demás requieren una amplificación previa de los ácidos nucleicos (ADN o ARN) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”, PCR). En la mayoría de los casos las secuencias diana son los genes que codifican el ARNr 16S, muy conservados en todos los organismos y cuyas diferencias se relacionan con su distancia evolutiva. La utilización de sondas y cebadores universales o grupo- o especie-específicos permite dirigir el análisis hacia los componentes mayoritarios o hacia determinadas poblaciones específicas.

En los estudios microbiológicos más actuales, la combinación de técnicas clásicas y técnicas independientes de cultivo están dando resultados sorprendentes, tanto por el número como por los tipos microbianos que se detectan, muchos de los cuales no tienen representantes cultivados (Amann y col., 1995). En los últimos años, los métodos se han comenza-

do a aplicar a las fermentaciones tradicionales, puesto que con ellos es posible identificar la microbiota que dirige los procesos y estudiar la dinámica de poblaciones a lo largo de la elaboración y maduración (Giraffa y Neviani, 2001).

## Construcción y análisis de genotecas del ARNr 16S

Las genotecas o bibliotecas génicas son un conjunto de secuencias representativas de las que se encuentran en la muestra original. Para su construcción se aísla el ADN de todos los microorganismos de un hábitat, se amplifica por PCR y el producto se clona en un vector adecuado. El análisis de la secuencia de los clones y su comparación en las bases de datos permiten conocer su identidad y estimar sus relaciones filogenéticas. Aparte de algunas consideraciones metodológicas, la mayor limitación de esta técnica es la gran cantidad de tiempo y recursos que requiere, de forma que solo se puede analizar un número limitado de muestras.

La técnica se ha utilizado para identificar los microorganismos implicados en la fermentación del “pozol”, un producto mejicano a base de harina de maíz en cuya fermentación intervienen bacterias lác-



ticas (Escalante y col., 2001). Se ha aplicado también al estudio microbiológico de la corteza de un queso francés de pasta lavada elaborado con leche cruda, comparándolo con otro elaborado con leche pasteurizada (Feurer y col., 2004). Al lado de *Streptococcus thermophilus* y otras especies clásicas de corteza, en el queso han aparecido microorganismos emparentados con especies marinas como componentes de la microbiota dominante.

### Hibridación “in situ” con sondas fluorescentes

La hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (“fluorescent *in situ* hybridization”, FISH) se utiliza para la identificación y cuantificación de microorganismos íntegros, sean viables o no. La técnica se realiza diluyendo la muestra hasta obtener microorganismos aislados que se inmovilizan y se fijan. Las células se tratan después con agentes que aumenten su permeabilidad y, a continuación, se hibrida con las sondas oligonucleotídicas fluorescentes. Por último, la detección y cuantificación de las células se realiza por medio de microscopía. Además de sondas, se pueden emplear distintos colorantes con los que se puede determinar la viabilidad de los microorganismos.

De forma reciente, se ha desarrollado un método de FISH para su aplicación sobre matrices frágiles como el queso (Ercolini y col., 2002). Desde el punto de vista metodológico la técnica es sencilla y el recuento celular puede automatizarse por medio de citometría de flujo, lo que permite mayor rapidez en la cuantificación y la posibilidad de analizar un gran número de muestras (Bunthof y col., 2001).

### Hibridación cuantitativa de ADN o ARN

Esta técnica es útil para medir la cantidad de un ADN o ARN concreto en relación a la cantidad de total. Para ello, se precisa el aislamiento del ADN o ARN de la muestra, la unión de éstos a una membrana y la hibridación subsiguiente con una sonda marcada. La abundancia relativa de un ADN o ARN no refleja con exactitud la abundancia de un microorganismo. En el caso del ARNr, es claro que el número de ribosomas es diferente en distintas especies y cambia a lo largo del crecimiento. Su estimación, sin embargo, puede ser una medida razonable de la actividad fisiológica de una población.

La cuantificación de ARNr se ha utilizado en el estudio polifásico de la fer-

mentación del “pozol” (Ampe y col., 1999). Con ella se demostró que las bacterias lácticas constituían la flora activa mayoritaria y que los lactobacilos eran responsables de más del 50% de la actividad.

### Electroforesis en gradientes desnaturalizantes

El método de electroforesis en gradiente químico desnaturalizante (“denaturing gradient gel electrophoresis”, DGGE), y su pariente la electroforesis en gels de gradiente de temperatura (“temperature gradient gel electrophoresis” o TGGE), se emplearon originalmente para detectar mutaciones puntuales en genes humanos responsables de diversas enfermedades (Fischer y Lerman, 1983). La técnica se basa en la separación de amplicones de ADN en un gel desnaturalizante. La desnaturalización progresiva durante la electroforesis depende de la secuencia, permitiendo diferenciar fragmentos de igual tamaño. Los oligonucleótidos para DGGE/TGGE contienen en uno de sus extremos una secuencia “GC” de unas 50 bases, denominada pinza GC, cuya función es impedir la desnaturalización completa y la aparición de hebras de ADN de cadena sencilla. Como molde se puede utilizar tanto

ADN como ARN, con lo que podemos obtener información del número de microorganismos y de su estado metabólico. Las bandas se identifican por comparación con las que generan cepas patrón, o se purifican de los geles, se amplifican y se secuencian.

En un trabajo pionero, la técnica de DGGE se aplicó a la caracterización microbiológica y al estudio de la dinámica de poblaciones del “pozol” (Ampe y col., 1999). En resultado más sorprendente fue la identificación de bandas de ADN relacionadas con la especie *Streptococcus bovis*, las cuales representaban entre el 25 y el 50% de los microorganismos. Al lado de estas bacterias, aparecían cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* y diversas especies de *Leuconostoc*. Al final del trabajo, los autores proponían la utilización de la técnica para la caracterización de otras fermentaciones tradicionales, incluyendo la leche y los productos lácteos.

La respuesta a esta sugerencia fue tan explosiva que, en la actualidad, las técnicas de DGGE y TGGE se utilizan de forma corriente para el estudio de muchos productos lácteos (Coppola y col., 2001; Ercolini y col., 2001; Cocolin y col., 2002; Ogier y col., 2002; Fasoli y col., 2003; Temmerman y col., 2003; Cocolin y col., 2004; Lafarge y col., 2004). En uno de los trabajos más completos, Randazzo y colaboradores estudiaron mediante DGGE la dinámica de poblaciones en el queso Siciliano artesanal (Randazzo y col., 2002). Estos autores constataron cómo

los microorganismos dominantes en la leche cruda (*Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. y *Macroccoccus caseolyticus*) eran desplazados durante la fermentación por las especies dominantes en el queso maduro (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum*). Mención especial merece también el estudio de la evolución y estructura de la comunidades bacterianas en el queso azul Stilton (Ercolini y col., 2003). En este caso, la utilización combinada de las técnicas de DGGE y FISH permitieron determinar la composición de las poblaciones más numerosas, así como su distribución temporal (a lo largo de la maduración) y espacial (en las distintas secciones del queso).

### Polimorfismo conformacional de la cadena sencilla

El estudio del polimorfismo conformacional de la cadena sencilla (“single-strand conformation polymorphism” SSCP) se basa en la separación por electroforesis de capilaridad de distintos amplicones de DNA previamente desnaturalizados. Después de una desnaturalización con un agente químico (formamida), la muestra se renaturaliza bruscamente, permitiendo la formación de estructuras secundarias en las hebras de ADN de cadena sencilla. La electroforesis se realiza a bajas temperaturas y en condiciones no desnaturalizantes para mantener las uniones intracatenarias. En estas condiciones, la migración de las bandas depende de su conforma-

ción, determinada a su vez por la secuencia.

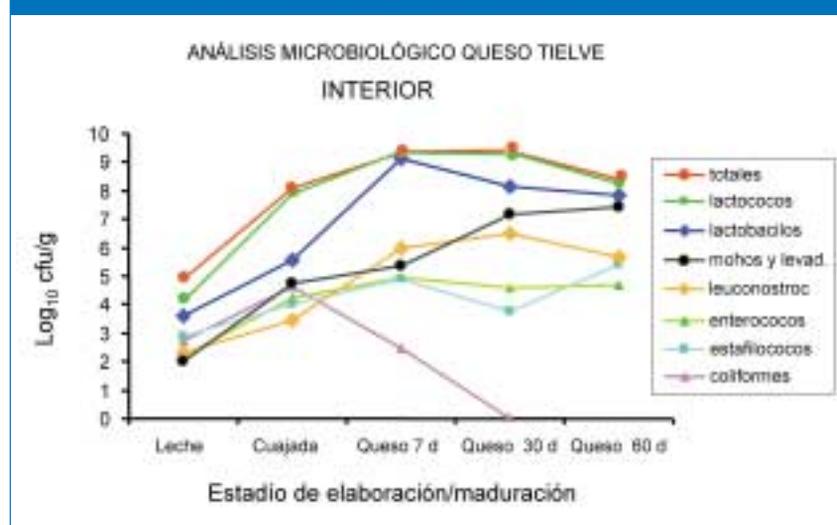
La SSCP se ha utilizado en la caracterización microbiológica del queso francés con denominación de origen Salers y en el estudio de su evolución durante la maduración (Duthoit y col., 2003). Se empleó también en el estudio de la corteza del queso de pasta lavada francés ya mencionado (Feurer y col., 2004).

### Polimorfismo de restricción del extremo amplificado de un gen

Esta técnica, denominada con las siglas T-RFLP (“terminal-restricción fragment length polymorphism”), se basa en la digestión por endonucleasas de restricción de los amplicones obtenidos con una o dos sondas fluorescentes. Los productos de la digestión se separan en geles o en sistemas de capilaridad acoplados a detectores láser. El patrón de T-RFLP define el número de unidades taxonómicas de una muestra compleja, ya que es específico para cada tipo microbiano (Moeseneder y col., 1999).

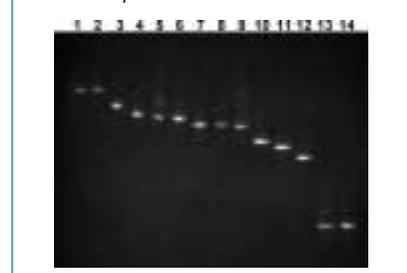
Esta técnica no se ha aplicado todavía en Microbiología de Alimentos, aunque sí una variante denominada LH-PCR (“length heterogeneity-PCR”). A diferencia de la anterior, la LH-PCR se basa en la separación de fragmentos según la longitud de amplificación y no el perfil de restricción. La metodología se utilizó para el estudio de la evolución bacteriana en el fermento de suero del queso Grana Padano (Lazzi y col., 2004).

**FIGURA 1: ENUMERACIÓN Y EVOLUCIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS MAYORITARIAS E INDICADORAS A LO LARGO DE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE CABRALES.**



**FIGURA 2**

Perfiles de DGGE de la región V3 del ARNr 16s de bacterias lácticas aisladas del queso de Cabrales en medios selectivos y diferenciales. Líneas: 1, *Lactobacillus paraplantarum*; 2, *Lactobacillus plantarum*; 3, *Leuconostoc citreum*; 4, *Leuconostoc mesenteroides*; 5, *Enterococcus faecium*; 6, *Enterococcus durans*; 7, *Lactobacillus brevis*; 8, *Leuconostoc lactis*; 9, *Leuconostoc pseudomesenteroides*; 10, *Enterococcus faecalis*; 11, *Lactobacillus farciminis*; 12, *Lactococcus lactis*; 13, *Lactobacillus casei*; 14, *Lactobacillus paracasei*.



## El queso de Cabrales

El queso de Cabrales es el producto estrella de los quesos asturianos y uno de los pocos quesos españoles tradicionales enmohecidos en su interior. Su característica más distintiva es el crecimiento en la masa de *Penicillium roqueforti*, moho responsable de gran parte de las cualidades sensoriales del queso. El Cabrales cuenta con Denominación de Origen Protegida desde el año 1981. Desde el punto de vista de su microbiología, el queso de Cabrales es, como otros quesos elaborados con leche cruda, un hábitat complejo en el que numerosas poblaciones microbianas (eucariotas y procariontas) interactúan y evolucionan a lo largo de la elaboración y maduración (Núñez, 1978; Marcos y col., 1985; Flórez y col., 2004).

## Microbiología del queso de Cabrales mediante PCR-DGGE

El trabajo se inició con un estudio microbiológico convencional de cuatro fabricaciones artesanales de dos elaboradores diferentes y en distintas épocas del año (con muestras de leche, cuajada y quesos de 3, 7, 15, 30, 60 y 90 días) (Flórez y col., 2004). En la Figura 1 se representan los recuentos de totales y diversas poblaciones indicadoras a lo largo de la elaboración y maduración de una de las elaboraciones. En todos los casos, las bacterias lácticas fueron mayoritarias, siendo los lactococos la población dominante y los lactobacilos la segunda en importancia. Los mohos y levaduras parten de ni-

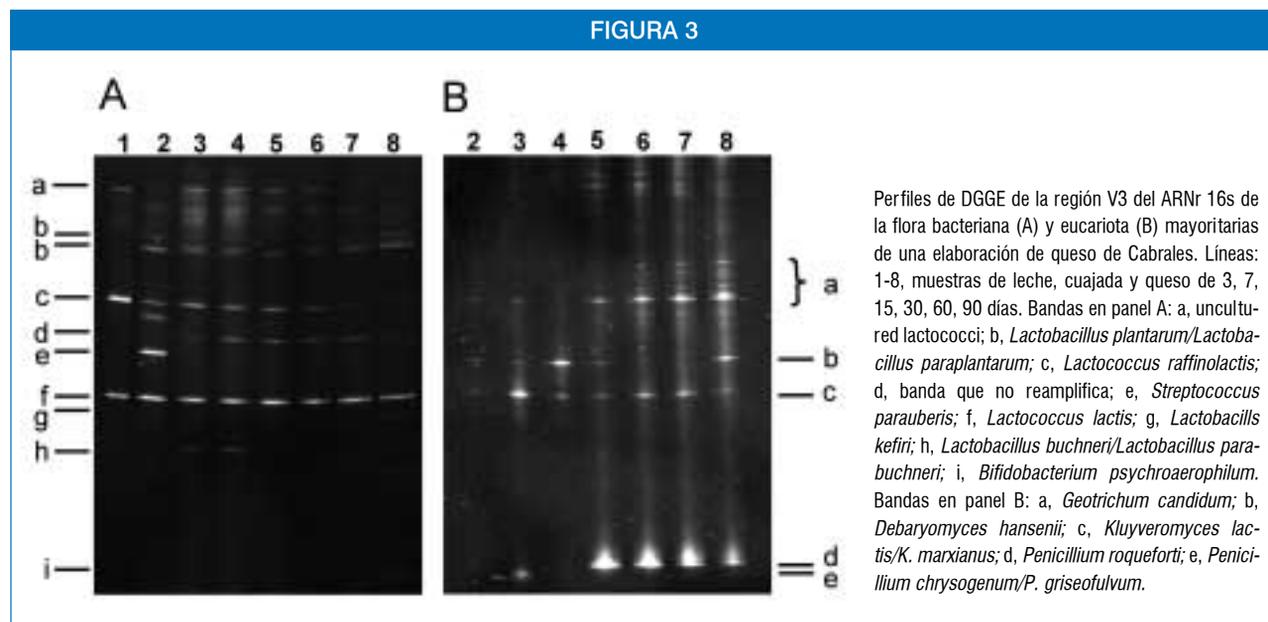
veles iniciales bajos pero llegan a convertirse, entre los 30 y 60 días, en una de las poblaciones más numerosas. Colonias aisladas de las placas de bacterias lácticas y mohos y levaduras se identificaron por métodos fenotípicos y genéticos.

De cada una de estas muestras se aisló ADN microbiano total que se utilizó como molde en reacciones de PCR utilizando cebadores universales que amplifican la región variable V3 del gen que codifica el ARNr 16S de las bacterias (oligos F357-GC, R518) (Oigier y col., 2002) o el dominio D1 de los eucariotas (oligos NL1-GC, LS2) (Cocolin y col., 2002). Los amplicones se separaron posteriormente mediante DGGE a 60°C en geles de poliacrilamida en un aparato DCode (Bio-Rad). Las bandas se visualizan en transiluminador tras tinción con bromuro de etidio. Las especies clasificadas durante la caracterización se utilizaron para optimizar las condiciones de amplificación y de DGGE (Figura 2), sirviéndonos de control en las fases siguientes. El perfil de las muestras se comparó con el de las cepas patrón. Además, para asegurar la identidad de las bandas, muchas se aislaron del gel y se secuenciaron.

Los perfiles de DGGE mostraron, como los recuentos, grandes diferencias entre las muestras y entre productores, indicando una composición y evolución microbiana distintas cada vez. En la Figura 3A se presentan, a modo de ilustración, los resultados de DGGE de una elaboración. La banda mayoritaria, corresponde a *Lactococcus lactis*, mayoritario también en los

cultivos. Acompañando a esta especie aparecieron ocasionalmente bandas de microorganismos relacionados, como *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus garviae*, que no se habían detectado nunca en las placas de recuento. En menor proporción, se detectó la banda de *Lactobacillus plantarum*, el lactobacilo cultivable mayoritario. Hacia el final de la maduración, detectamos, en algunas muestras, una banda tenue relacionada con *Lactobacillus casei*. La mayor variedad de bandas, sin embargo, se obtenía en las muestras de leche y cuajada, lo que sugiere que no todos los tipos presentes en la leche son capaces de crecer en el queso. En todas las muestras de una elaboración se detectó una banda de *Streptococcus parauberis*, especie relacionada con los enterococos. El proceso de DGGE se realizó también utilizando cebadores universales específicos para eucariotas. Los perfiles de bandas de cada elaboración fueron también distintos, como ocurría con los perfiles bacterianos. A modo de ejemplo, en la Figura 3B se incluyen los resultados de una elaboración. Los resultados de la DGGE concordaron bien con los obtenidos en la tipificación tradicional. Las bandas dominantes presentaban secuencias idénticas a las de las levaduras *Kluyveromyces lactis* y *Debaryomyces hansenii*, mayoritarias a su vez entre los aislados. Las secuencias de *Geotrichum candidum* aumentan en todas las muestras conforme la maduración progresa, al igual que las de *Penicillium roqueforti*, mayoritarias a partir de los 15 días.

FIGURA 3



## CONCLUSIÓN

La incapacidad de las técnicas microbiológicas de cultivo para dar una visión real del número y los tipos microbianos en determinados hábitats, ha conducido al desarrollo de técnicas microbiológicas de detección y cuantificación que no requieren cultivo previo. En la actualidad, se dispone de una gran cantidad de técnicas microbiológicas moleculares para la caracterización de los procesos y los productos fermentados que no precisan del aislamiento de los microorganismos. Nuestro Grupo ha utilizado la PCR-DGGE para complementar el estudio microbiológico convencional del queso de Cabrales; el queso azul tradicional español más conocido y de mayor producción. Por medio de esta técnica, detectamos especies de lactococos y otros tipos bacterianos que nunca se habían recuperado de las placas de recuento, con lo que queda demostrada su utilidad. La detección específica de una especie microbiana dada se realiza a concentraciones celulares superiores a las  $10^6$  ufc por gramo de muestra. La DGGE es una técnica cultivo-independiente, útil y versátil que puede adaptarse de forma sencilla al estudio de los quesos y otras fermentaciones tradicionales. ■



## Referencias

- Amann, R. I., W. Ludwig, y K.-F. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Ampe, F., N. ben Omar, C. Moizan, C. Wachter, y J.-P. Guyot.** 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5464-5473.
- Bunthof, C.J., K. Bloemen, P. Breeuwer, F. M. Rombouts y R. Abee.** 2001. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2326-2335.
- Cocolin, L., D. Aggio, M. Manzano, C. Cantoni, y G. Comi.** 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Int. Dairy J.* **12**: 407-411.
- Cocolin, L., N. Innocente, M. Biasutti, y G. Comi.** 2004. The late bowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *Int. J. Food Microbiol.* **90**: 83-91.
- Coppola, S., G. Blaiotta, D. Ercolini, y G. Moschetti.** 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 414-420.
- Duthoit, F., J.-J. Godon y M. C. Montel.** 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3840-3848.
- Ercolini, D., G. Moschetti, G. Blaiotta, y S. Coppola.** 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**: 610-7.
- Ercolini, D., P. J. Hill, y C. E. R. Dodd.** 2002. Development of a fluorescence *in situ* hybridization method for cheese. *J. Microbiol. Methods* **52**: 267-271.
- Ercolini, D., P. J. Hill, y C. E. R. Dodd.** 2003. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3540-3548.
- Escalante, A., C. Wachter y A. Farrés.** 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol by 16S rDNA sequence analysis. *Int. Dairy J.* **64**: 21-31.
- Fasoli, S., M. Marzotto, L. Rizzotti, F. Rossi, F. Dellaglio, y S. Torriani.** 2003. Bacterial composition of commercial probiotics products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **82**: 59-70.
- Feurer, C., F. Irlinger, H. E. Spinnler, P. Glaser y T. Vallaey.** 2004. Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA methods. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 546-556.
- Fisher, S. G., y L. S. Lerman.** 1983. DNA fragments differing by a single base-pair substitution are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1579-1583.
- Flórez, A. B., P. Álvarez, T. M. López-Díaz, T. Delgado, L. Alonso, I. Marcos, y**

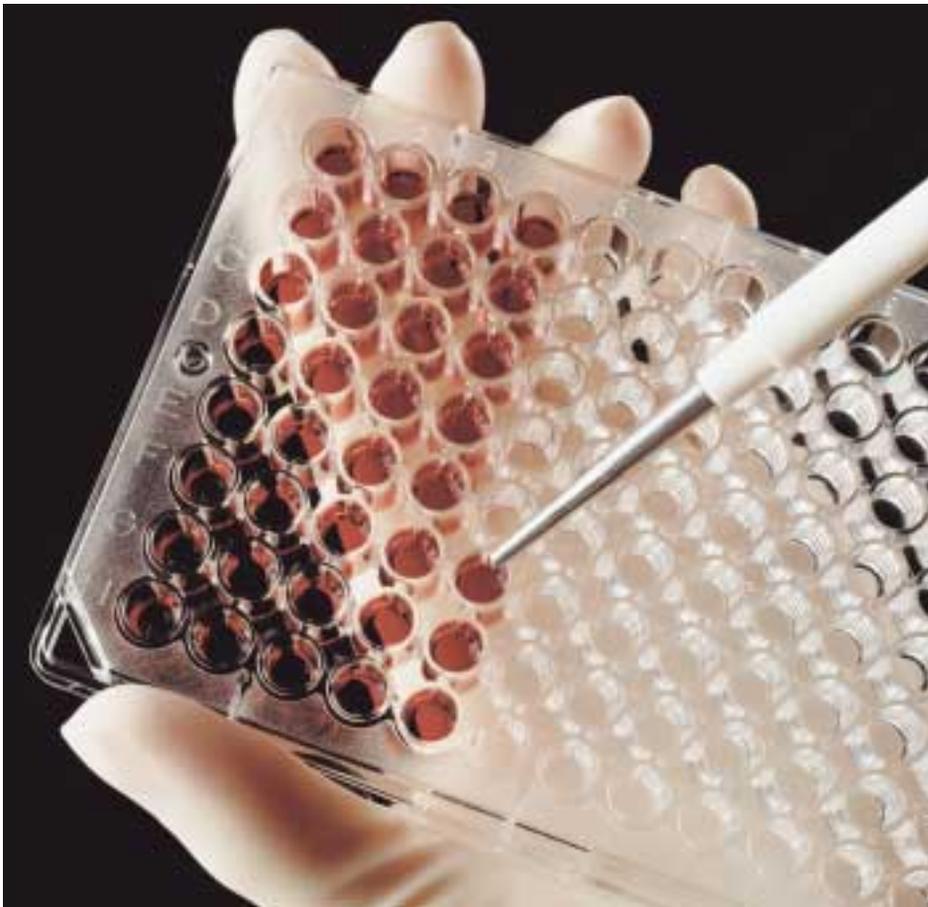
**Objetivos:**

Hemos dedicado mucho tiempo y esfuerzos a la tipificación de algunos de los quesos tradicionales asturianos y al estudio de distintos tipos de las bacterias lácticas más representativas (lactococos y lactobacilos), con el fin de diseñar fermentos específicos que reduzcan los accidentes tecnológicos y mejoren su calidad organoléptica y su salubridad. En particular, nuestro Grupo ha participado en el estudio de los quesos de Peñamejilla y Cabrales. En estos momentos estamos tratando de transferir al sector productivo los conocimientos que hemos ido acumulado a lo largo de estos años.

Desde hace un tiempo, nos interesa también la microbiología intestinal y las relaciones que existen entre microorganismos y salud. Puesto que las bacterias lácticas (y en particular bifidobacterias y lactobacilos) se cree que juegan un papel importante en el equilibrio microbiano intestinal, hemos aislado un numeroso grupo de cepas en las que caracterizamos sus propiedades de probiosis más importantes. El objetivo final es disponer de bacterias lácticas que puedan utilizarse para restablecer o prolongar el estado de salud.

**Tendencias de investigación:**

- Tipificación microbiológica y bioquímicas de quesos tradicionales.
- Caracterización fisiológica y genética de bacterias lácticas.
- Diseño de cultivos iniciadores específicos.
- Microbiología gastrointestinal humana.
- Estudio de las poblaciones mayoritarias y de bacterias lácticas en personas sanas y enfermas.
- Selección de cepas probióticas y caracterización de sus propiedades funcionales.



**B. Mayo.** 2004. Nuevos estudios microbiológicos y bioquímicos del queso de Cabrales: identificación y caracterización de su microbiota. *Industrias Lácteas Españolas (ILE) Anuario Lácteo* 2004: 89-103.

**Giraffa, G., y E. Neviani.** 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 19-34.

**Lafarge, V., J. C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J.-Y. Leveau, A. Gruss, y A. Delacroix-Buchet.** 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5644-5650.

**Lazzi C., L. Tosseti, M. Zago, E. Neviani y G. Giraffa.** 2004. Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. *J. Appl. Microbiol.* 96:481-490.

**Marcos, I., M. Quintana, B. Íñigo, D. Martín, y R. Barneto.** 1985. Estudio microbiológico del queso de Cabrales. I. Evolución de la flora. *Alimentaria Abril*:65-67.

**Moeseneder, M. M., J. M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter y G. J. Herndl.** 1999. Op-

timization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3518-3525.

**Núñez, M.** 1978. Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. *J. Dairy Res.* 45: 501-508.

**Ogier, J.-C., O. Son, A. Gruss, P. Taillez, y A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3691-3701.

**Randazzo, C. L., S. Torriani, A. D. L. Akkermans, W. M. de Vos, y E. E. Vaughan.** 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1882-1892.

**Timmerman, H. M., C. J. Koning, L. Mulder, F. M. Rombouts, y A. C. Beynen.** 2004. Monostrain, multistain and multispecies probiotics. A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol.* 96: 219-33.

La seguridad de los alimentos constituye una de las preocupaciones básicas en los países desarrollados ya que afecta directamente a la salud de todos los ciudadanos. Esta preocupación se ha visto incrementada en los últimos años debido a los graves incidentes ocurridos, que han convertido la seguridad alimentaria en un tema con gran repercusión social. En este contexto se sitúa la inquietud creciente, tanto por parte del consumidor como de las autoridades sanitarias, por la presencia de aquellos compuestos tóxicos que, como las aminas biógenas (AB), pueden aparecer en los alimentos. La investigación entorno a las AB se ha centrado en distintos aspectos, desde la visión toxicológica, al desarrollo de métodos de detección rápidos y sensibles, pasando por el estudio de los aspectos microbiológicos, bioquímicos y genéticos implicados en la síntesis de estas moléculas.

### ¿Qué son las aminas biógenas?

Las AB son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos. Atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermita, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina) y en función del número de grupo aminos de la molécula, podemos hablar de monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina) (Figura 1).

Desde un punto de vista biológico, las AB son moléculas con funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos. En plantas, la putrescina y algunas poliaminas como la espermidina y la espermina, están implicadas en diversos procesos celulares de respuesta al estrés y al envejecimiento. En animales están implicadas en procesos tan relevantes como la división celular o la transmisión nerviosa. Así por ejemplo, la histamina actúa como neurotransmisor y la tiramina es un intermediario de las rutas de biosíntesis de otros neurotransmisores (ten Brink y cols., 1990).

Sin embargo, la descarboxilación de algunos aminoácidos, llevada a cabo por determinados microorganismos, puede provocar la presencia de concentraciones altas de AB en los alimentos, de forma que tras su ingestión pasan a la circulación sanguínea desde donde ejercen diversos efectos tóxicos (Tabla 1).

### Intoxicaciones alimentarias causadas por aminas biógenas

Las AB más frecuentes en alimentos son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina,  $\beta$ -feniletilamina, espermina y espermidina, si bien, las intoxicaciones alimentarias más frecuentes están relacionadas con la histamina y la tiramina, cuyos aminoácidos precursores son la histidina y tirosina, respectivamente. La intoxicación por histamina es la más conocida, existiendo referencias desde finales del siglo XIX sobre la incidencia de esta enfermedad, conocida como enfermedad escombroides debido a que los trastornos tenían lugar tras la ingestión de pescados del grupo *Escombroidae*. La intoxicación producida por tiramina se conoce también como reacción del queso, debido a los altos niveles que esta AB presenta en algunos quesos. Además de su propia toxicidad, estudios recientes han demostrado que la tiramina favorece la adhesión de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 a la mucosa intestinal (Lyte, 2004). Por otro lado, diaminas como putrescina y cadaverina pueden reaccionar con nitritos dando lugar a la formación de nitrosaminas de conocido efecto cancerígeno.

Cabe destacar que hay personas especialmente sensibles a las AB debido a que los enzimas responsables de su detoxificación, la monoamino oxidasa (MAO) o la diamino oxidasa (DAO) no son funcionales, bien por problemas genéticos o por la presencia de inhibidores como el alcohol o determinados fármacos antidepresi-



vos. Por tanto, es difícil establecer los niveles tóxicos para cada una de las AB ya que depende de la eficacia de los sistemas de detoxificación y por lo tanto varía de unos individuos a otros. Además, también depende de la presencia de otras AB ya que pueden tener efectos sinérgicos. Sin embargo, aunque en la actualidad no existe una ninguna legislación sobre las concentraciones permitidas en los alimentos, las autoridades sanitarias recomiendan reducir al máximo la ingestión de estos compuestos. En el caso de personas con tratamientos antidepresivos basados en inhibidores de la MAO está contraindicado el consumo de queso, debido a los altos niveles de tiramina que puede contener. No obstante, es necesario subrayar que las concentraciones de AB varían no sólo de un tipo de alimento a otro, sino también dentro de un mismo tipo de alimento. Así por ejemplo, hemos



# Las aminas biógenas en los alimentos

MARÍA FERNÁNDEZ Y MIGUEL A. ÁLVAREZ. INSTITUTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE ASTURIAS (CSIC).  
CARRETERA DE INFIESTO, S/N. 33.300 VILLAVICIOSA. ASTURIAS.

encontrado dentro de un mismo tipo de queso, variaciones que van desde 90,75 mg kg<sup>-1</sup> hasta 2093 mg kg<sup>-1</sup>, resultados similares han sido también descritos por otros autores (Roig-Sagués y cols., 2002)

La presencia de AB en alimentos debe de atribuirse a la acción microbiana sobre la fracción proteica de la materia prima y más específicamente a las reacciones de descarboxilación de los aminoácidos precursores llevadas a cabo por determinadas bacterias. Por lo tanto, hay dos factores clave para su acumulación en los alimentos: la presencia de las bacterias con actividad aminoacil-descarboxilasa y la disponibilidad de los sustratos de la reacción. El primero de estos factores se trata en los apartados siguientes. En cuanto al segundo, los alimentos que presentan una mayor posibilidad de contener AB son aquellos que contienen una elevada carga proteica, aunque también

en este aspecto será necesaria la intervención de los microorganismos y de su maquinaria proteolítica para liberar los aminoácidos precursores.

## Las bacterias implicadas

En primer lugar hay que destacar que la presencia de actividad aminoacil-descarboxilasa implicada en la síntesis de AB, se trata de una característica de cepa y no de especie. Pueden ser bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y se pueden encontrar representantes en especies de diversos géneros como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Morganella*, *Vibrio* e incluso en bacterias GRAS ("General Regarded as Safe") como son las bacterias del ácido láctico (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* y *Lactococcus*.

En el caso de alimentos no fermentados serán bacterias contaminantes, principalmente gram negativas, las responsables de la síntesis de AB. Algunos autores han sugerido que en este tipo de alimentos la concentración de AB podría ser considerada como un indicador de la carga microbiana. Por lo tanto, la solución pasa por una correcta manipulación y conservación de los alimentos, de forma que se evite la contaminación y proliferación microbiana.

Mención aparte merecen los alimentos y bebidas fermentados en los que intervengan BAL (vino, sidra, productos lácteos, vegetales, embutidos...) donde, además de a los microorganismos contaminantes, la actividad descarboxilasa puede estar asociada a las bacterias que forman parte del cultivo iniciador o de la microbiota secundaria. Por lo tanto, al igual que otros autores (Bacus, 1984; Bo-

ver-Cid y cols., 2000; Hernández-Jover y cols., 1997; Suzzi y Gardini, 2003), consideramos muy importante incluir entre los criterios de selección de los cultivos iniciadores, la incapacidad de sintetizar AB. De hecho, este criterio comienza a ser aplicado por algunas industrias francesas en la selección de las BAL utilizadas en la fermentaciones vínicas (Lonvaud-Funel, 2001).

### La Bioquímica

El conocimiento de las condiciones favorables para la síntesis y actividad de las aminoacil-descarboxilasas, pasa por el estudio del papel fisiológico que la síntesis de AB tiene en las cepas productoras. La hipótesis más aceptada en la actualidad sugiere que las reacciones de descarboxilación podrían ser utilizadas por la célula para la obtención de energía y para el control del pH (Abe y cols., 1996; Konings y cols., 1995; Konings y cols., 1997). La descarboxilación de un aminoácido en el citoplasma y el transporte de la amina formada al exterior de la célula supondría, de forma indirecta, la expulsión de un protón al exterior, lo que permitiría controlar el pH intracelular. Además, el transporte de aminas generaría un gradiente electroquímico que podría ser utilizado por la célula para el transporte de nutrientes o para generar ATP a través de la  $F_1F_0$  ATPasa (Figura 2). Algunos autores (Rhee y cols., 2002) sugieren que este sistema de descarboxilación podría favorecer el crecimiento en ambientes ácidos. En este sentido, Schelp y cols.



(2001) demostraron que el enzima histidina descarboxilasa de *Lactobacillus* 30a es más activo a pH ácido.

### La Genética

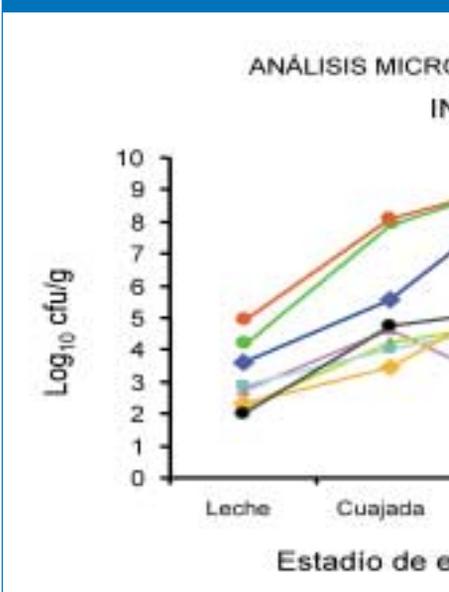
La presencia de una AB en los alimentos requiere de la expresión de al menos dos genes, el que codifica el enzima que cataliza la descarboxilación del aminoácidos correspondiente, y el que codifica una proteína transportadora implicada en el intercambio aminoácido /

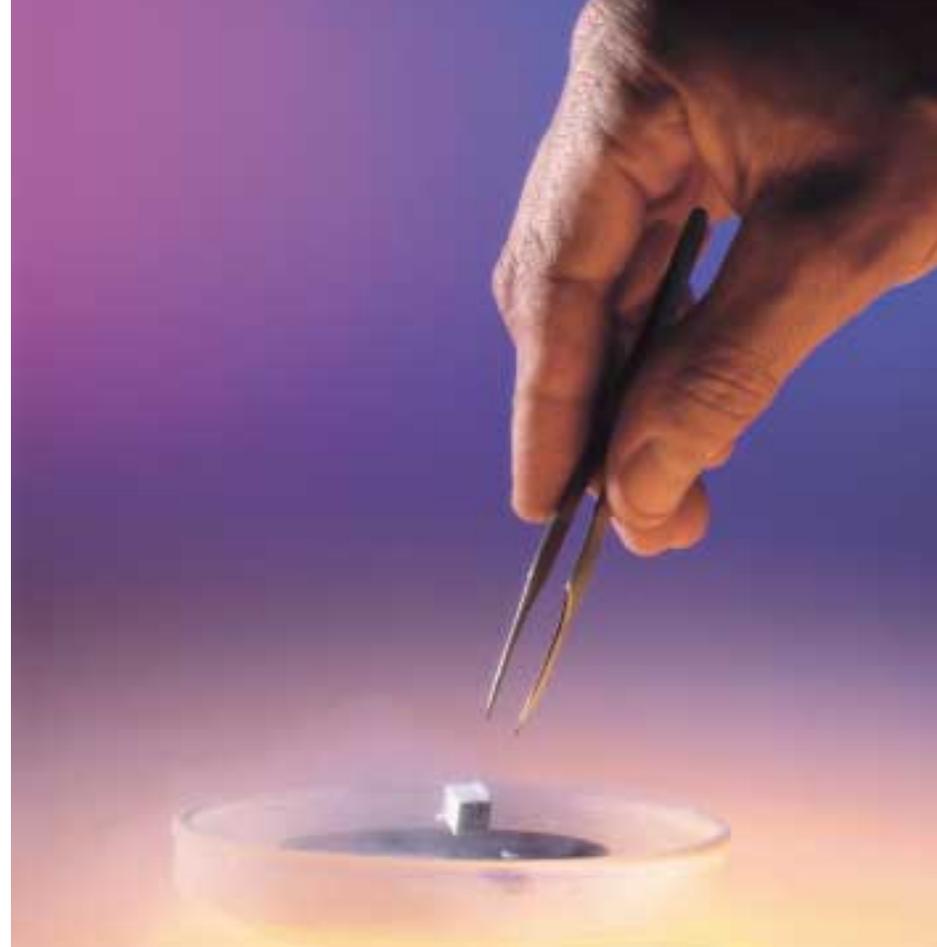
AB. Estos genes tienen que estar perfectamente regulados ya que su sustrato, los aminoácidos, son los componentes de las proteínas. Por lo tanto, la célula debe evitar su descarboxilación si no está asegurado el aporte suficiente para la síntesis de proteínas. Además, parecen estar inducidos por valores bajos de pH en el medio. Los datos genéticos que se tienen hasta el momento, han revelado que los genes que codifican estas dos proteínas se encuentran formando parte de un gru-

**TABLA 1: AMINAS BIÓGENAS EN ALIMENTOS Y SUS EFECTOS FARMACOLÓGICOS, TOMADA DE SHALABY (1996)**

Amina biógena	Efectos tóxicos
<b>Histamina</b>	Síntesis de noradrenalina y adrenalina Palpitaciones Vómitos, náuseas
<b>Tiramina</b>	Hipertensión Migrañas Vasoconstricción Lacrimación y salivación Incrementa el nivel de azúcar en la sangre Parálisis de las extremidades
<b>Putrescina y cadaverina</b>	Rigidez mandibular Bradycardia Hipotensión Potencia el efecto de otras aminas
<b><math>\beta</math>-feniletilamina</b>	Hipertensión Migrañas
<b>Triptamina</b>	Hipertensión

**FIGURA 1: CLASIFICACIÓN DE LA AB**





ción, se desarrollaron una serie de técnicas que se basan en la separación y la resolución mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Estas técnicas se fueron optimizando gracias al empleo de pre-columnas y a la derivatización de la muestras con distintos compuestos (Krause y cols., 1995; Novella-Rodríguez y cols., 2000). Para algunas AB se han desarrollado otras técnicas alternativas como la electroforesis capilar (Lange y cols., 2002 a; Cinquina y cols., 2004) o los métodos enzimáticos basados en las actividades monoamino y diamino oxidasa (Lange y cols., 2002 b). Todas estas técnicas requieren un primer paso de extracción de los compuestos a analizar y, teniendo en cuenta que las muestras de alimentos son matrices muy complejas, estos procesos de extracción son en muchas ocasiones largos y laboriosos. Además, el análisis realizado en un momento determinado no excluye que estos compuestos puedan formarse en fases posteriores cuando se alcancen en el alimento los valores de pH y la concentración de los sustratos adecuada para la síntesis de las AB. Este aspecto es especialmente crítico en alimentos fermentados, en los que los iniciadores continúan su actividad durante largos periodos de tiempo. Por ello, un método alternativo de control de la presencia de AB en alimentos se basa en la detección de cepas potencialmente productoras. Inicialmente los métodos utilizados se basaban en la capacidad de hidrólisis del aminoácido precursor en un medio de cultivo (Bover-

po de genes en el que también suelen estar presente un tercer gen que codifica una proteína reguladora (Nelly y Olson 1996). En el caso de la histamina y de la tiramina, se encuentra un tercer gen que codifica una proteína similar a aminoacil t-RNA sintetasas y que podría tener función reguladora, actuando como un sensor del aminoácido correspondiente (Fernández y cols., 2004; Martín y cols., 2005). La organización de algunos de los genes secuenciados que están implica-

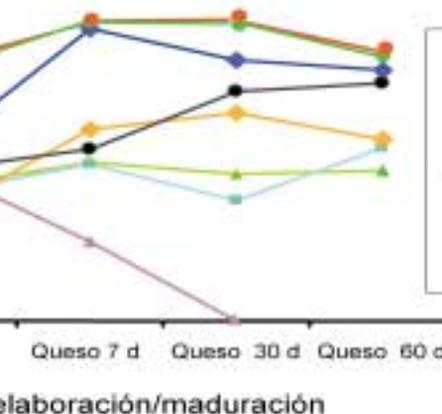
dos en la síntesis de AB se resume en la figura 3.

### Métodos de detección

Los métodos de detección de AB en los alimentos se han ido desarrollando de forma paralela al desarrollo de la cromatografía. Inicialmente, se determinaba su presencia mediante cromatografía en capa fina, pero este método no permitía la cuantificación. Con el fin de mejorar la sensibilidad y hacer posible la cuantifica-

### AB SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA

OBIOLOGICO QUESO TIELVE  
ANTERIOR



### FIGURA 2

Papel fisiológico de la síntesis de AB en las bacterias productoras. La descarboxilación de un aminoácido en el citoplasma y el transporte de la amina formada al exterior de la célula permitiría controlar el pH intracelular. Además, el gradiente electroquímico generado podría ser utilizado para generar ATP a través de la  $F_1F_0$  ATPasa.



Cid y cols., 1999). Pero este método requiere el aislamiento de los microorganismos a partir de los alimentos y su crecimiento en el medio diferencial, todo ello hace que sea muy largo y tedioso, dificultando su utilización de forma rutinaria. Surge por lo tanto la necesidad de desarrollar un método rápido, fácil y sensible de detección de cepas productoras de AB en muestras de alimentos.

### PCR: la herramienta maravillosa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por el Dr. Kary B. Mullis, el cual fue galardonado con el premio Nóbel de química en el año 1993 por esta trascendental técnica. Básicamente es un método enzimático que nos permite hacer muchas copias de un fragmento específico de DNA. Este proceso se conoce como amplificación del DNA. Para ello se utilizan dos oligonucleótidos cebadores o "primers", cuya secuencia es complementaria a los extremos del fragmento de DNA que pretendemos amplificar y que por tanto son los responsables de la especificidad del proceso. El primer paso consiste en subir la temperatura para que se separen las dos hebras del DNA original. Después se baja la temperatura para que se unan los "primers" en sus sitios específicos y así la DNA polimerasa pueda sintetizar la cadena complementaria. Estos ciclos se repiten sucesivamente en un termociclador, de forma que en cada uno de ellos se duplica el número de copias del DNA diana. De esta forma, partiendo de una única molécula inicial de DNA, en 35 ci-



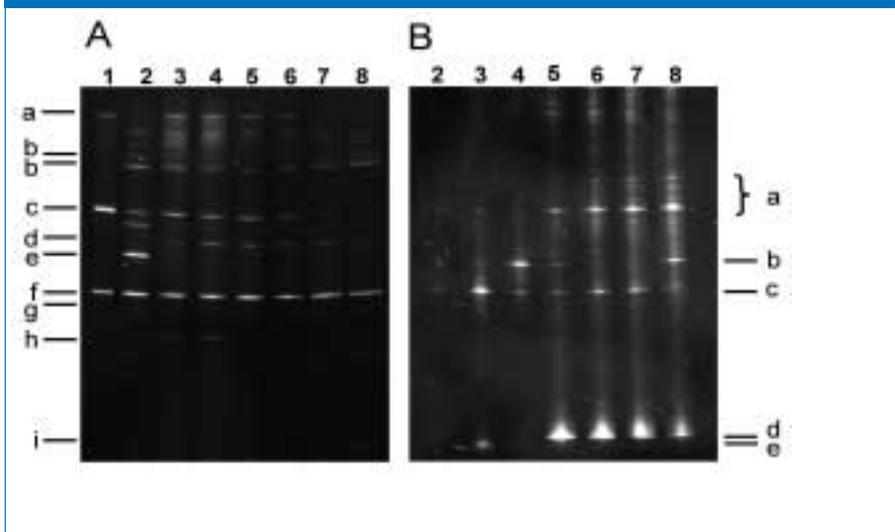
clos obtendríamos 34 mil millones de copias (Figura 4).

La PCR es sin duda una alternativa y de hecho ya se utiliza con éxito en la detección de microorganismos alterantes y patógenos en alimentos (revisión Hill, 1996; Rudi y cols., 2002; Malorny y cols., 2003).

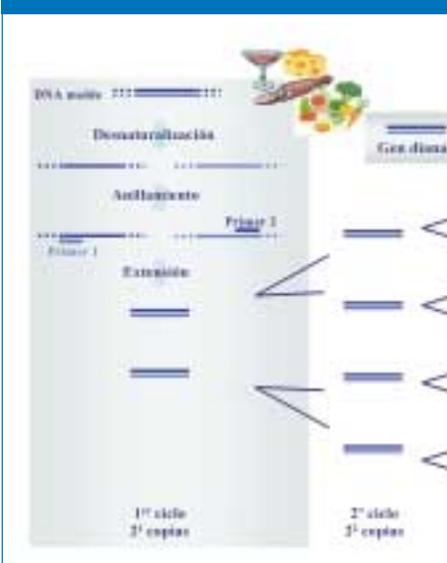
En el caso de las AB las investigaciones se han centrado principalmente en la histamina (Le Jeune y cols., 1995) y en la tiramina. En nuestro grupo del Instituto de Productos Lácteos de Asturias nos hemos centrado en la tiramina debido a que es, con diferencia, la AB más abun-

dante en quesos, llegando a alcanzar concentraciones realmente alarmantes. Se han diseñado los oligonucleótidos cebadores y se han optimizado las condiciones que permiten la amplificación específica de un fragmento interno del gen de la tirosina descarboxilasa (Fernández y cols., 2004). Este procedimiento permite comprobar que las cepas seleccionadas para usar como fermentos sean incapaces de sintetizar tiramina. Como ya hemos indicado nos parece imprescindible incluir la incapacidad de sintetizar AB como criterio de selección de los cultivos

**FIGURA 3: ORGANIZACIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE LAS AB MÁS FRECUENTES EN ALIMENTOS**



**FIGURA 4: REACCIÓN EN CADENA**





lo cual sería especialmente útil para aquellas personas que por cualquier razón sean deficientes en las actividades MAO y DAO.

En la actualidad, estamos desarrollando la detección de cepas productoras de AB por PCR a tiempo real. Esta técnica, aún más rápida y sensible que la PCR convencional, permitiría además su cuantificación.

### Agradecimientos

El proyecto que estamos realizando sobre AB ha sido financiado por la Unión Europea (QLRT-2001-02388).

### Bibliografía

- Abe, K., Hayashi, H., y Maloney, P.C. (1996). Exchange of aspartate and alanine. Mechanism for development of a proton-motrice force in bacteria. *J. Biol. Chem.* 271:3079-3084.
- Bacus, J. (1984). Update: meat fermentation. *Food Technol.* 38:59-63.
- Bover-Cid, S., y Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., y Vidal-Carou, M.C. (2000). Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. *J. of Food Prot.* 63:237-243.
- Cinquina, A.L., Longo, F., Cali, A., De Santis, L., Baccelliere, R., y Cosan, R. (2004). Validation and comparison of

iniciadores. Esta técnica también permite detectar de forma específica, rápida, sencilla y barata, bacterias productoras de tiramina aunque estén en muy baja concentración. Además, la reacción de PCR ha sido optimizada con éxito para poder detectar estas bacterias en muestras de alimentos. Así por ejemplo, se ha podido seguir su presencia en todos los pasos de elaboración (leche cruda, cuajada y distintas etapas del proceso de maduración) de un queso artesanal (Figura 5). Todas las muestras fueron paralelamente analizadas mediante HPLC y se pudo compro-

bar que aunque en los pasos iniciales de la elaboración no se detectó tiramina, se llegaron a alcanzar concentraciones altísimas, de más de 2.000 mg kg<sup>-1</sup> en el producto final. En cambio, mediante PCR ya se pudo detectar la presencia de los microorganismos productores en la leche cruda. La ausencia de estas bacterias sería la mejor garantía de que un alimento como el queso, con alta probabilidad de presentar tiramina, está libre de esta AB a lo largo de toda la cadena alimentaria. Por lo tanto, esta técnica permitiría certificar la ausencia de AB en los alimentos,

### ENNA DE LA POLIMERASA (PCR)

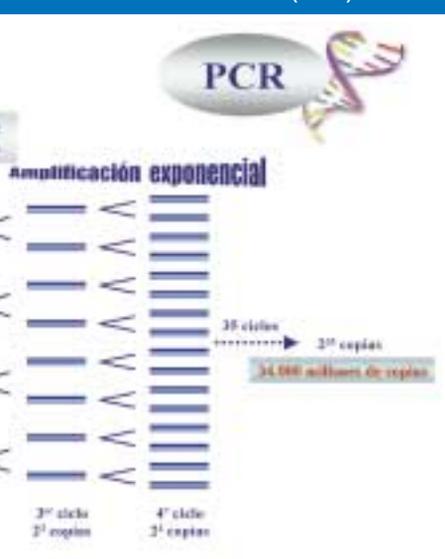
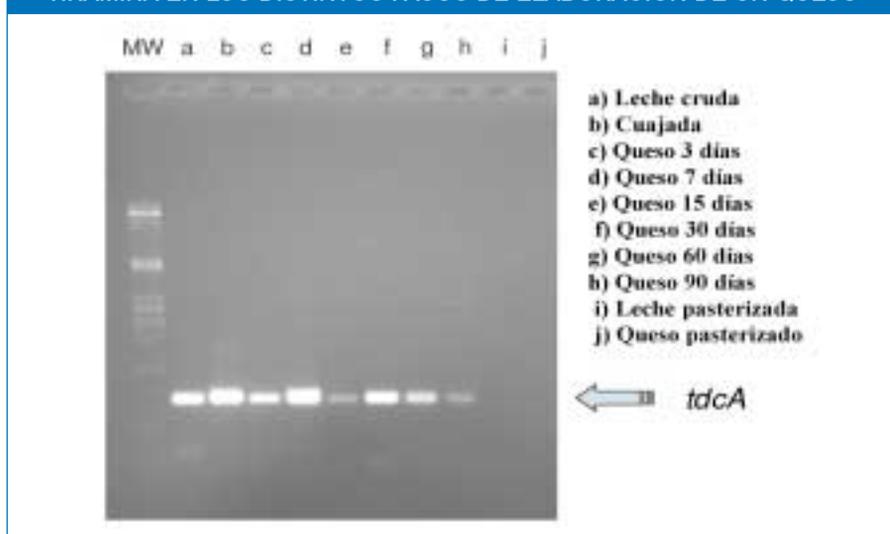


FIGURA 5: DETECCIÓN MEDIANTE PCR DE CEPAS PRODUCTORAS DE TIRAMINA EN LOS DISTINTOS PASOS DE ELABORACIÓN DE UN QUESO



- analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. *J Chromatogr A*. 1032:79-85.
- Fernández M., Linares, D.M. y Alvarez, M.A. (2004). Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 67:2521-2529.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., y Vidal-Carou, M.C. (1997). Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. *J. Food Prot.* 60: 825-830.
- Hill, W.E. (1996). The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 36:123-73.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., y Poolman, B. (1995). The generation of metabolic energy by solute transport. *Arch. Microbiol.* 164:235-242.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B., y Driessen, A.J. (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multi-drug resistance. *Antonie van Leeuwenhoek* 71:117-128.
- Krause, I., Bockhardt, A., Neckermann, H., Henle, T., y Klostermeyer, H. (1995). Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high performance liquid chromatography of the dansyl derivatives. *J. Chromatogr. A*. 715:67-79.
- Lange, J., Thomas, K., y Wittmann, C. (2002) a. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 779:229-39.
- Lange, J., y Wittmann, C. (2002) b. Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 372:276-283.
- Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., Ten Brink, B., Hofstra, H., y Van der Vossen, J.M.B.M. (1995). Development of a detection system for histamine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activities test. *J. Appl. Bacteriol.* 78:316-326.
- Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 199:9-13.
- Lyte, M. (2004). The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal mucosa. *J. of Food Prot.* 6:878-883.
- Malorny, B., Tassios, P.T., Radstrom, P., Cook, N., Wagner, M., y Hoorfar, J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol.* 25:39-48.
- Martín, M.C., Fernández, M., Linares, D.M. y Alvarez, M.A. (2005). Sequencing, characterisation and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology* (en prensa).
- Neely, M., y Olson, E.R. (1996). Kinetics of expression of the *Escherichia coli cad* operon as a function of pH and lysine. *J. Bacteriol.* 178:5522-5528.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M.T., y Vidal-Carou, M.C. (2000). Biogenic amines and polyamines in miles and cheeses by ion-pair High Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 48:5117-5123.
- Rhee, J.E., Rhee, J.H., Ryu, P.Y., y Choi, S.H. (2002). Identification of the *cadBA* operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 208:245-251.
- Roig-Sagués, A.X., Molina, A.P., y Hernández-Herrero, M.M. (2002). Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* 215:96-100.
- Rudi, K., Nogva, H.K., Moen, B., Nissen, H., Bredholt, S., Moretro, T., Naterstad, K., y Holck, A. (2002). Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial community analyses in foods. *Int J Food Microbiol.* 78:171-80.
- Schelp, E., Worley, S., Monzingo, A.F., Ernst, S., y Robertus, J.D. (2001). pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a. *J. Mol. Biol.* 306:727-732.
- Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. International.* 29:675-690.
- Suzzi, G., y Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 88:41-54.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., y Huis in 't Veld, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in food. *Int. J. Food Microbiol.* 11:73-84. ■

## AgroCSIC

CENTRO DEL CSIC: Instituto de Productos Lácteos de Asturias.

Nombre Investigador: Miguel Angel Álvarez González.

E-mail: maag@ipla.csic.es

Tendencias de investigación:

Nuestra investigación se centra principalmente en las bacterias del ácido láctico y abarca los siguientes aspectos:

- Bacteriófagos y mecanismos de resistencia.
- Desarrollo de herramientas genéticas de grado alimentario.
- Las bacterias del ácido láctico como vectores de vacunación oral.
- Rutas de descarboxilativas: aminas biógenas.



# Instituto *de* la **Grasa**

Aceituna de Mesa:  
de la fermentación tradicional  
a la utilización de cultivos  
iniciadores



Los hidrolizados proteicos en  
alimentación: Suplementos  
alimenticios de gran calidad  
funcional y nutricional

Los péptidos bioactivos en  
alimentación: nuevos agentes  
promotores de salud



Pigmentos carotenoides  
en frutas y vegetales;  
mucho más que simples  
"colorantes" naturales

Características químicas  
nutricionales y funcionales de  
los alimentos



Nuevos aceites de girasol:  
el futuro para una industria  
alimentaria más saludable

# Aceituna de Mesa:

## de la fermentación tradicional a la utilización de cultivos iniciadores

JOSÉ LUIS RUIZ BARBA Y RUFINO JIMÉNEZ DÍAZ. DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS. INSTITUTO DE LA GRASA. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS. AVDA. PADRE GARCÍA TEJERO, 4. APTDO. 1048. 41012 SEVILLA.

Los frutos del olivo (*Olea europaea sativa*), cosechados en un estado apropiado de madurez y procesados de una manera adecuada, se convierten en un producto comestible con unas características organolépticas muy apreciadas. Según la Norma de Calidad emitida por el Consejo Oleícola Internacional (1980), se denomina aceituna de mesa al fruto de determinadas variedades de olivo cultivado, sano, cogido en el estado de madurez adecuado y de calidad tal que, sometido a las preparaciones apropiadas, dé un producto de consumo y de buena conservación como mercancía comercial. La aceituna de mesa constituye un alimento de alto valor nutritivo y muy equilibrado, posee todos los aminoácidos esenciales en una proporción ideal y aunque su contenido en proteína es bajo, su nivel de fibra hace que sea muy digestiva. Destacan sus contenidos en minerales, especialmente calcio y hierro, y vitaminas como la provitamina A, la vitamina C y la tiamina.

Según la Norma citada anteriormente, las aceitunas de mesa se clasifican en los siguientes tipos:

- **verdes**, procedentes de frutos recogidos durante el ciclo de maduración. La coloración del fruto varía del verde al amarillo paja. Es el único tipo que se somete a fermentación láctica.

- **de color cambiante**, elaboradas a partir de frutos de color rosa vinoso o castaño, recogidos antes de su completa madurez, sometidos o no a tratamiento alcalino.

- **negras naturales**, obtenidas de frutos recogidos en plena madurez o poco antes de ella, de color negro rojizo, negro violáceo, violeta oscuro, negro verdoso o castaño oscuro.

- **negras oxidadas**, que se obtienen de frutos no totalmente maduros que han sido oscurecidos mediante oxidación y



han perdido el amargor mediante tratamiento con hidróxido sódico (sosa cáustica), envasándose en salmuera y conservándose por esterilización con calor.

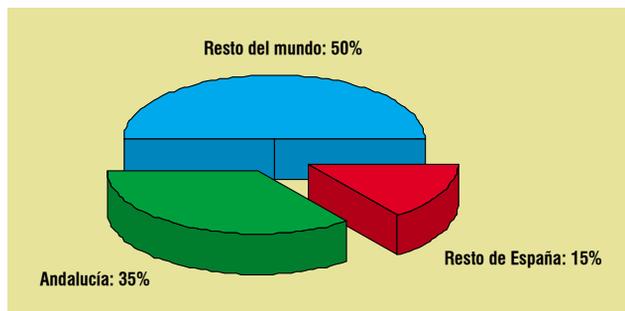
En España se cultivan un gran número de variedades de aceitunas siendo las

más importantes la manzanilla de Sevilla, la gordal sevillana (conocida internacionalmente con la denominación de "sevillano"), la morona, la hojiblanca, la caceña y la verdial. Otras variedades menos importantes son la cañivana, la picoli-

## PRODUCCIÓN DE ACEITUNAS DE MESA (2002/2003)



## EXPORTACIONES DE ACEITUNAS DE MESA (2002/2003)



món, la gordalilla, la aloreña, la rapazalla, la picuda, la cordobí y la cuquillo.

La industria de la aceituna de mesa constituye una actividad económica muy importante en España. Prueba de ello es que de los 1,6 millones de toneladas de aceitunas de mesa que se produjeron la pasada campaña 2002/2003 en todo el mundo, el 25% de ellas proceden de nuestro país. Esta actividad generó 7,2 millones de jornales, con un coste total del empleo de 222 millones de euros a un precio por jornal de 30,71 euros durante la campaña 2001/2002.

Además, España exporta el 50% del total mundial anual, de las que el 35% han sido elaboradas en la provincia de Sevilla. Ello supuso una facturación por encima de los 400 millones de euros en la campaña 2001/2002.

Así pues, no cabe la menor duda de la importancia económica que supone para todos los sectores sociales europeas la producción de aceituna de mesa.

Existen muchos métodos de procesamiento para conseguir que los frutos sean comestibles pero todos ellos están orientados a eliminar el amargor natural de los mismos provocado por la presencia de compuestos fenólicos, principalmente oleuropeína. Entre estos métodos, el más importante por el volumen de frutos procesados, los recursos económicos que genera y su complejidad microbiológica es el denominado de obtención de aceitunas verdes estilo español o sevillano. Este procedimiento, tradicional y empírico hasta hace poco, ha necesitado de un gran esfuerzo de investigación tecnológica a fin de mejorar la obtención del producto final. El Instituto de la Grasa ha tenido un papel relevante en el desarrollo de buena parte de esas investigaciones desde el primer momento de su fundación, a principios de los años 40 del siglo pasado. Y nuestro grupo de investigación ha tenido la fortuna de contribuir de

manera eficiente a la mejora de dicho procedimiento, ya que hemos dedicado todo nuestro esfuerzo investigador a la biotecnología de las bacterias lácticas en relación con la fermentación de vegetales. Ello nos ha permitido desarrollar cultivos iniciadores, cuyo uso no se ciñe exclusivamente a la fermentación de aceitunas sino de otros muchos productos vegetales con destino al consumo humano.

### El proceso de fermentación

En general, la evolución de los métodos de elaboración de aceitunas de mesa desde los tiempos de los griegos y romanos hasta nuestros días ha sido muy lenta, particularmente la del método tradicional de elaboración de aceitunas verdes estilo español. La utilización de vasijas de barro como recipientes de fermentación se sustituyó por bocoques de madera que a su vez dieron paso a los fermentadores actuales de fibra de vidrio o plástico a partir de 1970. De la misma forma, las cenizas alcalinas que utilizaron romanos y griegos para "cocer" los frutos se sustituyeron por sosa cáustica a principios del siglo XX. Estos cambios tecnológicos se propiciaron gracias a las investigaciones que demostraron el papel esencial que jugaban las bacterias lácticas en dicha fermentación, cuyo desarrollo adecuado en las salmueras de fermentación era imprescindible para lograr un producto final con las características organolépticas apropiadas, evitando a la vez el deterioro de los frutos.

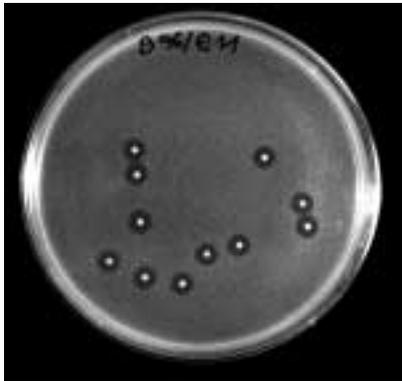
Consiste, básicamente, en procesar los frutos de forma tal que la flora epifítica ocasional (formada por levaduras y bacterias lácticas) comience a desarrollarse en las salmueras de fermentación, consumiendo los azúcares que contiene el fruto produciendo ácido láctico y, como consecuencia, se produzca una importante bajada del pH. Esta bajada de pH, junto al propio ácido láctico y otros metabolitos secunda-

rios producidos por las bacterias lácticas (pertenecientes a la especie *Lactobacillus pentosus*, principalmente) permite una conservación adecuada del producto final, preservando las aceitunas de posibles deterioros debido al desarrollo de microorganismos que producen alteraciones.

El procesamiento de los frutos es muy simple y en la industria del sector siempre obedece a criterios subjetivos de la persona que lo lleva a cabo: una vez recogidas las aceitunas del árbol se transportan al lugar de procesado, donde se eliminan las hojas y otras impurezas, se lavan los frutos y se clasifican los mismos por tamaño. Entonces están preparados para su tratamiento con una solución de sosa cáustica ("cocido") y posterior colocación en una salmuera. El procedimiento descrito, aunque simple, tiene el efecto deseado: propiciar que al cabo de unos días –y pese a que las bacterias lácticas representan aproximadamente entre 0,01-1,0% del total de la población microbiana de las salmueras en los estadios iniciales del proceso– se desarrolle de forma vigorosa una microbiota compuesta de levaduras y *L. pentosus* que persistirá hasta el final de la fermentación (entre 4-5 meses). Un balance adecuado de ambas poblaciones proporciona un producto final con unas características organolépticas precisas. Sin embargo, en numerosas ocasiones las aceitunas sufren alteraciones debido a un desarrollo inadecuado de los microorganismos que llevan a cabo el proceso, lo que es aprovechado por otros microorganismos oportunistas que colonizan las salmueras de fermentación y deterioran el producto final, privándole así de las características organolépticas que le hacen apreciado.

### Hacia un proceso más racional: diseñando cultivos iniciadores

Como en la producción de otros muchos alimentos fermentados, para la ob-



Aislamiento de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, procedentes de una fermentación de aceitunas.

tención de aceitunas es necesario controlar el proceso desde el punto de vista microbiológico. Ello se consigue añadiendo a las salmueras de fermentación un cultivo iniciador consistente en una(s) cepa(s) de bacterias lácticas, previamente seleccionada(s) por poseer una serie de características biotecnológicas adecuadas al proceso fermentativo en cuestión. Puesto que la fermentación de aceitunas verdes al estilo español o sevillano es un proceso abierto, en el que no se puede esterilizar el material de partida, es necesario seleccionar cuidadosamente aquellas características que hacen a una cepa de *L. pentosus* más competitiva frente a otras bacterias que se desarrollan en el mismo nicho ecológico, es decir, las salmueras de fermentación.

La selección de cepas de *L. pentosus* como posibles candidatas a formar parte de un cultivo iniciador se basa en diferentes criterios. En general, las bacterias lácticas son auxotrofas para casi todos los 20 aminoácidos esenciales (es decir, no los producen y deben tomarlos del medio) y a un gran número de vitaminas del grupo B. Con objeto, pues, de favorecer su desarrollo en los estadios iniciales de la fermentación (donde hay pocas levaduras que les aporten este tipo de compuestos) es preciso seleccionar cepas prototrofas para a dichas vitaminas y aminoácidos, es decir, que produzcan ellas mismas sus propias vitaminas y aminoácidos. Además, sería deseable que su tasa de crecimiento en las salmueras fuera lo más alta posible a temperaturas por debajo de su óptimo de crecimiento, ya que la mayoría de los fermentadores están emplazados en fábricas al aire libre y en zonas de intenso frío invernal. Por otro lado, aunque el contenido en polifenoles de las aceitunas sometidas a este tipo de elaboración es bajo, puesto que estos

compuestos son bactericidas, sería deseable que las cepas seleccionadas presentaran un grado de resistencia moderada a los mismos. Finalmente, y de capital importancia, que las cepas seleccionadas posean armas de competitividad efectiva y eficiente, como es la capacidad de producir bacteriocinas. Las bacteriocinas son sustancias producidas por una determinada bacteria láctica que inhiben el desarrollo de otras bacterias que crecen en el mismo medio donde lo hace la bacteria productora. Con ello, las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas se aseguran el dominio pleno de las salmueras de fermentación.

Teniendo en cuenta estas características, hemos diseñado dos tipos de cultivos iniciadores. Uno de ellos, constituido por una única cepa de *L. pentosus* cuya característica más sobresaliente es la de producir una bacteriocina, denominada plantaricina S. El segundo es un cultivo iniciador mixto formado por dos cepas de *L. pentosus*. Entre sus características biotecnológicas más destacadas figuran la producción de plantaricina S, en un caso, y una alta tasa de crecimiento en salmueras en el otro.

### Comprobando la idoneidad de los cultivos iniciadores en condiciones reales de fermentación

Aunque para diseñar los cultivos iniciadores atendimos siempre a criterios biotecnológicos que los dotaran de la ca-

pacidad de competitividad suficiente para dominar las salmueras de fermentación a lo largo del proceso fermentativo era necesario comprobar su idoneidad en condiciones reales. A nivel de planta piloto e industrial, tanto el cultivo iniciador de cepa única como el mixto demostraron una alta capacidad de colonización de las salmueras en fermentadores de diferentes capacidades, desde los 5 kg de frutos a los 15.000 kg, pasando por los de 50 kg y 300 kg. En todos estos casos se demostró que una de las características que dotaban a los cultivos iniciadores de mayor potencial competitivo frente a otras bacterias que se desarrollan en ese mismo nicho ecológico



gico era la capacidad de producir plantaricina S. De esta forma, el cultivo iniciador predomina sobre otras poblaciones bacterianas a lo largo del proceso fermentativo completo. Con ello se consigue no alterar la esencia del proceso tradicional pero se controla cualquier posible variación microbiológica que pudiera repercutir negativamente en la obtención de un producto final de alta calidad organoléptica, acortando además de manera drástica el tiempo de obtención de éste.

El desarrollo y aplicación de técnicas moleculares tales como PCR, RT-PCR nos permitió el seguimiento de la dinámica

### EXPORTACIONES DE ACEITUNAS DE MESA (FINAL DE CAMPAÑA) TM

Zona	2000	2001	2002
EE.UU., Canadá y Puerto Rico	78.115	83.202	84.266
Unión Europea	63.436	80.257	93.500 *
Europa del Este	15.047	20.441	27.471
Países Árabes	13.643	12.767	16.052
Otros países	8.560	9.151	10.437
TOTAL	196.347	219.261	243.558

\* Estados datos U.E. Diciembre.



Fermentadores de aceitunas.



Patio de fermentación.



de poblaciones no sólo de nuestros cultivos iniciadores sino el de otras bacterias lácticas que colonizan a la vez las salmueras de fermentación de aceitunas verdes estilo español o sevillano.

### Optimizando las condiciones de fermentación

Las condiciones físico-químicas iniciales de las salmueras de fermentación constituyen un conjunto de variables muy importante a tener en cuenta para una implantación correcta del cultivo iniciador. Para averiguar cuáles eran los parámetros óptimos de cada una de estas variables en la fermentación de aceitunas verdes estilo español o sevillano se procedió a aplicar un diseño matemático factorial fraccional en el que se tuvieron en cuenta el pH inicial de las salmueras, el ácido utilizado para bajarlo, la concentración de NaCl de las mismas, el tamaño del inóculo, el carrier del inóculo, la homogeneización de las salmueras después de la inoculación y el tiempo transcurrido desde la colocación de las aceitunas en salmuera hasta su inoculación. El análisis matemático del desarrollo del cultivo iniciador de cepa única en las fermentaciones llevadas a cabo en las condiciones señaladas nos indicó que se po-

dría mejorar de forma drástica su implantación si se inoculaban aproximadamente  $10^7$  bacterias lácticas por ml de salmuera, con una corrección del pH inicial con ácido acético (entre 4,5 y 6,5) y con un contenido en sal de las salmueras menor del 4%.

Sin bien éstas son las condiciones óptimas para una implantación adecuada de los cultivos iniciadores, la versatilidad de éstos hace que puedan desarrollarse también en condiciones menos favorables. Así, pudimos comprobar que a nivel industrial el cultivo iniciador mixto se desarrollaba de manera adecuada sin necesidad de una bajada previa de pH, con un contenido en sal de las salmueras del 6% y con inóculos iniciales de aproximadamente  $10^6$  y  $10^5$  bacterias lácticas por mililitro de salmuera. Otra prueba más de la versatilidad de dichos inóculos es que se pueden utilizar para fermentar productos afines, por ejemplo zanahorias.

### Conclusiones

El desarrollo de cultivos iniciadores para la fermentación de vegetales es una excelente herramienta tecnológica de incalculable valor. Gracias a ellos se mejora de manera ostensible la producción de estos alimentos con destino al consumo

humano, conservando a la vez el sabor tradicional del producto. En resumen, su uso implica volver al sabor del pasado evitando sus inconvenientes.

### Agradecimientos

Esta investigación así como otras no presentadas aquí llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación han sido subvencionadas por la CICYT, el MCYT y la D.G. XII de la UE. ■



**CENTRO DEL CSIC:** Instituto de la Grasa.  
**Departamento:** Biotecnología de Alimentos.  
**Nombre Investigador:** Rufino Jiménez Díaz y José Luis Ruiz Barba.  
**E-mail:** rjimenez@cica.es y jlruiz@cica.es  
**Tendencias de Investigación:**

- Estudios de bacterias lácticas que fermentan alimentos con destino al consumo humano y animal: caracterización bioquímica y genética de las bacteriocinas que producen.
- Elaboración y aplicación de cultivos iniciadores de bacterias lácticas para la fermentación de vegetales.
- Aplicación de las bacteriocinas como conservantes naturales de alimentos.

# Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional

JAVIER VIOQUE Y FRANCISCO MILLÁN.  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS. INSTITUTO DE LA GRASA (SEVILLA).

*Las proteínas representan uno de los componentes principales de los alimentos, tanto desde un punto de vista funcional como nutricional. Por ejemplo, determinan las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos. Así, la consistencia y textura de la carne, queso o pan, dependen en gran medida de la naturaleza de las proteínas que los constituyen. Pero también, en alimentos elaborados con una presencia menor de proteínas, pueden jugar un papel muy importante, influyendo en características funcionales, como la formación de emulsiones, geles, espumas o la absorción de agua o aceite. Además las proteínas también constituyen un aporte nutricional importante, representando una fuente de energía, nitrógeno y aminoácidos esenciales.*

Cuando hablamos de hidrólisis proteica, en primer lugar quizás pensemos en la digestión de las proteínas en nuestro cuerpo. Digestión mediada por la acción de proteasas como pepsina, tripsina o quimiotripsina, que se produce en el estómago e intestino y que va a generar la liberación de aminoácidos y pequeños péptidos que serán absorbidos por las células del endotelio digestivo. Sin embargo, la hidrólisis proteica es un fenómeno más extendido de lo que quizás podamos imaginar o saber, ya que también puede producirse durante el procesado de diversos tipos de alimentos. Así, como ejemplo, interviene en la manufactura y determina las características de alimentos como el queso o derivados cárnicos como por ejemplo el jamón. En la mayoría de estos casos esta proteólisis es debida a la acción de microorganismos, que están implicados en procesos de fermentación de la materia prima original, como sería la leche en el caso de la producción de quesos. En otros casos, son proteasas endógenas del material original las que van a actuar durante el procesado, como por ejemplo sería el caso de la curación del jamón serrano (aun-

que también intervienen enzimas de microorganismos).

Por último, la hidrólisis proteica también se observa en la producción de hidrolizados proteicos generados por la acción externa y aislada de enzimas. En este caso, la materia prima original, por lo común un aislado o concentrado proteico, es transformada en otro producto, un hidrolizado proteico, por la acción de proteasas externas que no proceden de microorganismos endógenos.

La esencia de la hidrólisis proteica es la rotura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La rotura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos o biológicos. Los primeros incluyen la hidrólisis mediante el tratamiento con ácidos o bases. Hoy día apenas se utiliza la hidrólisis química debido a sus efectos perjudiciales sobre la calidad nutricional del hidrolizado, ya que se destruyen L-aminoácidos, se forman D-aminoácidos y compuestos tóxicos como Lisinoalanina. Por otro lado, los métodos biológicos son aquellos que utilizan una proteasa para romper los enlaces peptídicos. Estos mé-



todos se realizan en condiciones más suaves de pH y temperatura que van a reducir la formación de compuestos indeseables.

La propiedad fundamental de un hidrolizado, que va a determinar en gran medida las restantes características del mismo, es su grado de hidrólisis, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El grado de hidrólisis final está determinado por las condiciones utilizadas, es decir, concentración de sustrato, relación enzima/sustrato y tiempo de incubación y



condiciones fisicoquímicas como son el pH y temperatura. Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la naturaleza de la actividad del enzima, es decir su actividad específica y tipo de actividad. Así, la naturaleza del enzima usado no solo va a influir en el grado de hidrólisis sino también en el tipo de péptidos producidos. En este sentido, las proteasas pueden dividirse en dos grandes grupos según su actividad catalítica (Figura 1). Pueden ser endopéptidasas si rompen enlaces del interior de la cadena proteica o exopeptidasas si rom-

pen los enlaces terminales de los extremos amino o carboxilo de las cadena. El origen de estos enzimas puede ser animal, vegetal, de bacterias u hongos, aunque los de origen bacteriano (*Bacillus sp.*) son las más abundantes en la industria de los hidrolizados proteicos dada la manejabilidad de estos organismos y los altos rendimientos de producción.

La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un sistema discontinuo o en batch en un reactor, con agitación y control de pH y temperatura (Figura 2). El sustrato, normalmente un aislado protei-

co, es disuelto en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan. A continuación se añade el enzima y comienza la hidrólisis enzimática del sustrato. A medida que esta progresa se produce una bajada del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos, pH que es mantenido al óptimo del enzima mediante la adicción de sosa diluida. Para finalizar la hidrólisis proteica el enzima puede ser inactivado con calor, mediante una bajada del pH o con una combinación de ambos. O también puede ser retirado del medio mediante filtración.

El material de partida utilizado para la obtención de los hidrolizados proteicos puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano. Sin embargo, hoy día en los países desarrollados el sustrato más usado son las proteínas de la leche, es decir, caseína y proteínas del lactosuero. Esto es debido fundamentalmente a su disponibilidad en grandes cantidades en estos países, alto valor nutricional y moderado coste del mismo. Entre los vegetales los más usados son las proteínas de soja, trigo y arroz. Sin embargo también se utilizan como sustrato proteínas de pescado, principalmente en países orientales, como Japón



o Corea. También se han aprovechado las proteínas de residuos carnicos como tendones o huesos y de microorganismos como algas.

Una vez descrito brevemente cuales son los elementos que intervienen en la hidrólisis proteica y como se realiza esta nos vamos a centrar en cual es el producto que se obtiene y sus aplicaciones hoy día en la industria alimentaria. Antes de comenzar comentar brevemente, que los hidrolizados proteicos también tienen aplicaciones no alimentarias, como fuente de fermentación para el crecimiento de microorganismos, como son los hidrolizados de levaduras o caseína que todos conocemos. También se usan en cosmética para el tratamiento del cabello ya que se ha sugerido su efecto en el fortalecimiento del pelo. Así mismo, también se usan como fertilizantes vegetales.

Las características del hidrolizado que se obtenga vendrán determinadas evidentemente por el uso que se le quiera dar a este. Como ya se ha comentado, el grado y tipo de hidrólisis va a determinar el resto de las propiedades del hidrolizado. Así pues, dependiendo de estos factores el hidrolizado tendrá una aplicación u otra.

En este sentido, hoy día, los hidrolizados que se producen para su uso en alimentación se pueden agrupar en:

Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1% y el 10% para la mejora

de las propiedades funcionales, hidrolizados con grados de hidrólisis variable para su uso como flavorizantes y por último, hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada (Tabla 1).

En el primer grupo, se va a producir una mejora de las propiedades funcionales. La hidrólisis proteica va a producir una disminución del tamaño de los pé-

ptidos y va a incrementar la generación de grupos polares como  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{COO}^-$ . Estos dos factores se van a traducir en un incremento de la solubilidad. Una buena solubilidad es una premisa básica necesaria para la aplicación del producto en multitud de alimentos procesados. Pero

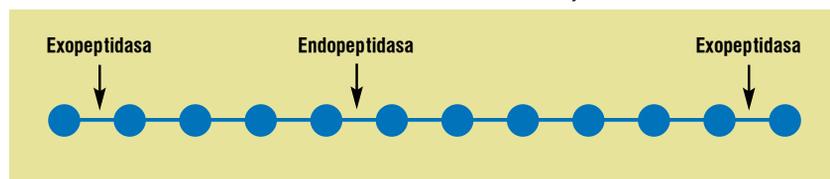
### Grado de hidrólisis, es el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original

buen poder emulsificante son usados en la fabricación de mayonesas, carne picada, salchichas o helados. Por último, hidrolizados con una buena absorción de aceite o agua son usados en derivados cárnicos y en productos bajos en grasas.

Como vemos se han hecho importan-

FIGURA 1

Las proteasas se clasifican en endoproteasas o exoproteasas según que corten los enlaces peptídicos del interior de la cadena aminoacídica o los enlaces de los extremos amino y carboxilo terminal.



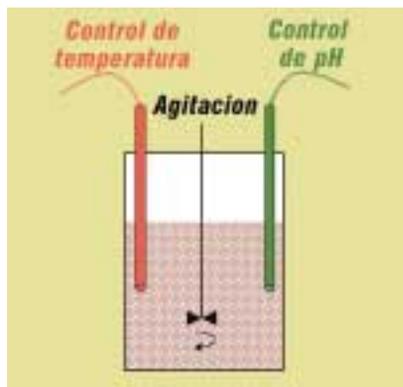
tes progresos que correlacionan el grado de hidrólisis, a nivel macro, con las propiedades funcionales. Estas funcionalidades van a depender del tamaño molecular, estructura e incluso secuencia aminoacídica de los péptidos producidos por la hidrólisis enzimática. Es decir, en el futuro un mejor conocimiento de la relación estructura-función de los péptidos en sistemas modelo y reales incrementará el uso de enzimas para mejorar las propiedades funcionales. De esta forma, con modificaciones enzimáticas apropiadas la funcionalidad de los hidrolizados proteicos puede ser diseñada o dirigida para cubrir las

necesidades específicas de un alimento concreto. En nuestro grupo hemos obtenido hidrolizados limitados a partir de proteínas de colza, *Brassica carinata* o altramuz que permitirían su aplicación en alimentos para la mejora de las propiedades funcionales de estos.

Otro tipo de hidrolizados son aquellos con grado de hidrólisis variable, generalmente alto, para ser usados como flavorizantes. En este sentido, los hidrolizados, según el sustrato usado y las condiciones de hidrólisis, también pueden aportar sabor y olor a los alimentos que se añadan.

**FIGURA 2**

La obtención de los hidrolizados proteicos se realiza en un reactor enzimático con control de pH y temperatura y agitación.



Tradicionalmente, los hidrolizados usados como flavorizantes se han obtenido mediante la hidrólisis ácida de proteínas vegetales con ácido clorídico durante 4 a 24 horas y a temperaturas entre 100° y

### Hidrolizados con buen poder emulsificante son usados en la fabricación de mayonesas, carne picada, salchichas o helados

125° C. Así, el grado de hidrólisis va a depender del tiempo, temperatura y concentración de ácido usada, todo lo cual va a influir en los atributos sensoriales del producto. La neutralización del producto con hidróxido sódico o carbonato sódico va a generar una cantidad de sal que es una parte substancial del producto final. El flavor del producto va a depender de la cantidad y tipo de péptidos o aminoácidos liberados. Por ejemplo, el ácido glutámico funciona como un potenciador del sabor, o la glicina o alanina tienen un sabor dulce. También determinados péptidos pueden producir amargor. Pero quizás el factor principal a la hora de determinar un flavor sea la interacción de estos aminoácidos o pequeños péptidos con otros componentes como azúcares o lípidos. Esta interacción puede producirse mediante reacciones de Maillard, generando compuestos secundarios volátiles responsables del olor y sabor del producto. Reacciones de Mai-

lard que se ven favorecidas también por el tratamiento con calor. Actualmente, el uso de estos hidrolizados obtenidos mediante tratamiento con ácidos está en desuso, por los componentes antinutricionales anteriormente comentados que pueden generarse. Así se está potenciando el uso de proteasas como alcalasa y flavorzima para la obtención de un hidrolizado extensivo que puede ser usado en alimentación como flavorizante. Sin embargo, ya que las condiciones de hidrólisis de pH y temperatura con proteasas son bastante suaves, estos hidrolizados presentan poco flavor en relación con los obtenidos con

ácidos. Este flavor puede mejorarse mediante un postratamiento térmico que permita la generación de reacciones de Maillard. Aun más, si el sustrato usado es una harina o concentrado donde hay

cantidades importantes de carbohidratos, estos pueden ser también hidrolizados con carbohidrasas que incrementen la cantidad de productos que pueden reaccionar con los aminoácidos para aumentar el número de compuestos volátiles. Es decir, en el futuro, controlando el grado de hidrólisis de las proteínas y azúcares y la temperatura de postratamiento se podrá definir y controlar el patrón de flavor de un determinado hidrolizado.

Para finalizar, un tercer grupo de hidrolizados están formados por aquellos con alto grado de hidrólisis o extensivos, por encima del 10%, para su uso en alimentación especializada, bien como suplemento proteico o en dietas medicas (Tabla 2). En este apartado entran los hidrolizados que buscan explotar o mejorar las características nutricionales de las proteínas de origen. El desarrollo y diseño de hidrolizados extensivos está siendo objeto de un enorme impulso en los últimos años. Estos hidrolizados podrían di-

vidirse a su vez en dos grandes grupos, por un lado aquellos para ser usados como suplemento proteico en la dieta y por el otro, hidrolizados con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos. En este último grupo se alcanza el máximo de especialización en lo que respecta al diseño del alimento ya que se obtiene un producto muy específico para un objetivo muy concreto. Respecto al primer grupo, dos factores favorecen el uso de los hidrolizados como suplemento proteico. Desde un punto de vista funcional su elevada solubilidad que permite su utilización en alimentos líquidos, y desde un punto de vista nutricional el hecho de que la absorción gástrica intestinal de los pequeños péptidos que componen el hidrolizado, principalmente di y tripéptidos, parece ser más efectiva en comparación con las proteínas y presentan menor osmolaridad que los aminoácidos libres.

Los sectores de la población a los que van dirigidos estos alimentos son diversos aunque, por diferentes razones, con necesidades todos ellos de un sobreaporte proteico. Por ejemplo, podemos citar su uso en la alimentación de la tercera edad. En las personas ancianas se produce una pérdida de apetito, causado por diversas razones, como factores sociales o falta de ejercicio. Esta pérdida de apetito genera una malnutrición que está correlacionada directamente con un incremento de enfermedades y mortalidad. Para estas personas, comer más cantidad no es la solución idónea dada la falta de apetito, pero la demanda de proteínas necesarias podría cubrirse con bebidas enriquecidas con hidrolizados proteicos, ya que su ingesta es más atractiva que la de alimentos sólidos. En este apartado también podemos incluir la alimentación enteral y parenteral en casos de hospitalización. Otro campo de aplicación es en la nutrición deportiva, sobre todo en ejercicios de resistencia como ciclismo o fondo o aquellos que requieren un desarrollo muscular importante como harterofilia o incluso culturismo. En este sentido, bebidas refrescantes suplementadas con péptidos pueden tomarse durante el ejercicio o tras su finalización. Por último, también tiene aplicación los hidrolizados para personas que están a dieta. De esta manera se proporcionan al cuerpo adecuadas cantidades de proteínas con un mínimo de otras fuentes de calorías, de manera que se mantiene el balance de N y se reduce peso con la pérdida de grasas.



Respecto a las aplicaciones medicinales de los hidrolizados proteicos, sin duda la más conocida e importante por su impacto en nutrición haya sido la producción de hidrolizados hipoalergénicos (Tabla 3). La alergia alimentaria es un problema al que no se le ha prestado mucha atención, a pesar de que en los últimos años son cada vez más las personas que se ven afectadas. Las consecuencias de una reacción alérgica pueden ir desde pequeños trastornos físicos hasta incluso la muerte por shock anafiláctico. Pero hoy día no existe ninguna medicación para prevenir las alergias alimentarias. De hecho, evitar estos alimentos de manera estricta es la única forma de impedir la reacción contra ellos. Otra posibilidad

es tomar dietas constituidas por hidrolizados proteicos hipoalergénicos. En alimentación, la alergia a las proteínas de leche de vaca observadas en recién nacidos es la más frecuente. Se ha estimado que alrededor del 10% de los niños que nacen en USA son alérgicos a la leche de vaca. Para aliviar esta situación, desde hace más de 40 años se vienen produciendo en este país hidrolizados de leche de vaca hipoalergénicos, denominados de primera generación, a partir de caseína con más de un 70% de aminoácidos libres y péptidos hasta 8 aminoácidos. Posteriormente, desde hace unos 10 años, se comercializan los hidrolizados de segunda generación, a partir de proteínas del suero, con 40-60% de aminoácidos

**TABLA 1: PRINCIPALES TIPOS HIDROLIZADOS PROTÉICOS Y SUS APLICACIONES**

Hidrolizado	Grado de hidrólisis	(%) Aplicación
Limitado (con bajo grado de hidrólisis)	1-10	Mejora de las propiedades funcionales
Variable	Variable	Mejora del flavor
Extensivo (alto grado de hidrólisis)	> 10%	Como suplemento proteico En alimentación especializada (dietas médicas)



puesto para el tratamiento de enfermedades o situaciones muy concretas. Por ejemplo, en el caso de errores metabólicos congénitos como la fenilcetonuria o tirosinamia se proponen hidrolizados sin los aminoácidos aromáticos que estos enfermos no pueden metabolizar. En estados hipermetabólicos como los procesos de cicatrización por cirugía o quemaduras se hace necesario un sobreaporte de aminoácidos azufrados que podrían ser proporcionados en forma de hidrolizados enriquecidos en estos aminoácidos. En enfermedades hepáticas, como las encefalopatías, donde son necesarios alimentos con una alta razón de Fischer (aminoácidos ramificados/aromáticos), hidrolizados proteicos enriquecidos en Val Leu e Ile y pobres en aromáticos también son apropiados. Finalmente, dada la buena solubilidad, digestibilidad y absorción intestinal de los hidrolizados extensivos, estos también son usados en enfermos con una actividad gastrointestinal deficiente, como en los casos con reducida superficie de absorción (enfermedad de Crohn) o cuando la capacidad digestiva esta reducida como en la fibrosis quística o la pancreatitis. En relación con estos hidrolizados extensivos nosotros hemos obtenido hidrolizados de colza, garbanzo o girasol con una alta solubilidad que permitiría su uso como suplemento proteico. También hemos obtenido hidrolizados hipoalergénicos de garbanzo y otros con una alta razón de Fischer a partir de proteínas de Brassica carinata que permitirían su uso para el tratamiento de encefalopatías hepáticas.

Dentro de los hidrolizados extensivos, existe una aplicación que por su interés, novedad y potencialidad requiere una mención especial. Esta constituye la obtención o generación de péptidos bioactivos a partir de proteínas hidrolizadas. Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, entre 2 y 15 residuos, inactivas dentro de la proteína intacta pero que pueden ser liberados bien durante la digestión del alimento o por un procesado previo del mismo, como por ejemplo mediante la generación de hidrolizados proteicos. Estos péptidos tendrían efectos beneficiosos para el organismo en diversos casos. En este sentido, habría que reconsiderar las características nutricionales de una proteína determinada ya que estas no se limitarían solo al aporte de N y energía que representan, así como a los contenidos en aminoácidos esenciales, sino también

cidos libres y péptidos hasta 12 aminoácidos, y finalmente desde hace poco años se producen los de tercera generación, con menos de un 20% de aminoácidos libres y péptidos hasta 15 aminoácidos. En estos hidrolizados el tratamiento con la proteasa rompe los epítomos alérgicos de la proteína, bien secuenciales o estructurales, eliminando la alérgenicidad del producto y de esta manera permitiendo su consumo por las personas sensibles a sus proteínas. En este sentido, al-

guno de estos productos, sobre todo los de tercera generación puede que no cumplan con las normas internacionales para un alimento hipoalérgico, ya que dada la longitud de algunos péptidos, la presencia de epítomos antigénicos es aun posible. Y dado que una mínima cantidad del mismo puede provocar una reacción muy fuerte, su ingesta representar un alto riesgo.

Hidrolizados proteicos con una composición definida también se han pro-

**TABLA 2: APLICACIONES DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS EXTENSIVOS**

Suplemento proteico	Alimentación 3.ª edad	
	Nutrición deportiva	
	Dietas de adelgazamiento	
Dietas médicas	Hidrolizados hipoalérgicos	
	Tratamiento de errores metabólicos congénitos	Fenilcetonuria
		Tirosinamia
	Regeneración de la piel	Quemados
		Postcirugía
		Enfermedad de Croh
	Otras enfermedades	Fibrosis quística
Pancreatitis		



habría que considerar la actividad de péptidos bioactivos que pueden ser liberados de estas proteínas durante el procesado del alimento o la digestión gastrointestinal ejerciendo diversas funciones metabólicas. Péptidos bioactivos con diferentes funciones se han encontrado en diversas proteínas aunque la leche es el material mejor estudiado. Así, se ha descrito la existencia de péptidos derivados de proteínas alimentarias con activi-

dad opioide, opioide antagonista, inmunomoduladores, antitrombóticos, hipotensores, hipocolesterolémicos o antioxidantes. En nuestro grupo hemos purificado péptidos con alguna de estas actividades a partir de hidrolizados proteicos de origen vegetal como girasol, garbanzo colza o altramuza.

Las tendencias en la investigación sobre hidrolizados proteicos van a coincidir con las generales de la tecnología de ali-

mentos propiamente dicha y al mismo tiempo van a estar determinadas por las demandas del mercado, es decir, por lo que nosotros como consumidores buscamos o exigimos. Estas tendencias también estarán determinadas por factores como el desarrollo de la biotecnología; el aprovechamiento de residuos y la revalorización de subproductos; el desarrollo de nuevos alimentos y alimentos más sanos. Así pues, podemos concluir el gran impulso que están recibiendo en los últimos años los estudios sobre hidrolizados proteicos debido a la demanda de alimentos muy específicos y más saludables y para el aprovechamiento de fuentes proteicas alternativas. Este impulso va en paralelo con el desarrollo biotecnológico de estos procesos. ■

**TABLA 3: HIDROLIZADOS HIPOALERGÉNICOS DE LECHE**

Tipo	Características
1.ª generación	> 70% aminoácidos libres péptidos < 8 aminoácidos
2.ª generación	40-60% aminoácidos libres péptidos < 12 aminoácidos
3.ª generación	< 20% aminoácidos libres péptidos < 15 aminoácidos

## AgroCSIC

CENTRO DEL CSIC: Instituto de la Grasa.  
Departamento: Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales.  
Nombre Investigador: Francisco Millán Rodríguez.  
E-mail: frmillan@cica.es

Tendencias de Investigación:

Una de las líneas de investigación del grupo se basa en el aprovechamiento de residuos agroindustriales de bajo valor añadido para la obtención de hidrolizados proteicos de alto valor añadido. Para ello, diversos subproductos como las harinas desengrasadas de girasol o colza son aprovechadas para la extracción de las proteínas presentes en estas. Estas proteínas en la forma de aislados proteicos, de por sí un producto ya de alto valor añadido, son usadas para la obtención de hidrolizados proteicos que pueden ser usados en alimentación especializada. Así hemos obtenido hidrolizados proteicos extensivos con una alta solubilidad que pueden usarse como suplemento proteico, o también hidrolizados hipoalergénicos o hidrolizados para el tratamiento de síndromes específicos como las encefalopatías hepáticas. También trabajamos en la obtención de hidrolizados proteicos enriquecidos en péptidos bioactivos con funciones hipocolesterolémicas, antioxidantes o hipotensoras.

# Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud

JAVIER VIOQUE Y FRANCISCO MILLÁN.  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS. INSTITUTO DE LA GRASA (SEVILLA).



*El concepto de componente bioactivo y su relación con los alimentos no es una idea nueva, aunque sí lo es el hecho de querer explotar su potencial y conocer las bases científicas de su modo de acción. Un componente bioactivo sería aquel compuesto químico que ejerce un efecto beneficioso para alguna función corporal del individuo produciendo una mejora en su salud y bienestar o reduciendo un riesgo de enfermedad.*

*Durante las últimas décadas hemos vivido un resurgimiento del interés por todo lo natural debido especialmente a la conciencia pública que se ha generado alrededor de los productos alimenticios seguros y saludables.*

*Nunca antes se había centrado tanto la atención en los efectos beneficiosos de los alimentos como ahora. El concepto de que los alimentos pueden ser promotores de salud más allá de su valor nutricional tradicional está ganando aceptación entre los científicos y profesionales de la salud y por tanto los profesionales de la nutrición y la dietética deben estar cualificados y en posición de traducir la evidencia científica en la aplicación práctica de la dieta diaria para el consumidor.*

Las proteínas representan uno de los componentes principales de los alimentos, tanto desde un punto de vista funcional como nutricional. Por una parte, determinan las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos. Así, la consistencia y textura de la carne, queso o pan, dependen en gran medida de la naturaleza de las proteínas que los constituyen. Pero también, en alimentos elaborados con una presencia menor de proteínas pueden jugar un papel muy importante, influyendo en características funcionales, como la absorción de agua o aceite o la formación de emulsiones, geles y espumas. Además, las proteínas también constituyen un aporte nutricional importante, representando una fuente de energía, nitrógeno y amino ácidos esenciales.

En los últimos años, el estudio de las proteínas de los alimentos como componentes beneficiosos, no solo desde un punto de vista funcional o nutricional, está recibiendo una gran atención. En este sentido, se viene investigando la presencia de diferentes péptidos bioactivos en proteínas de diversos tipos de alimentos. Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos (trozos de la proteína) de pequeño tamaño, entre 2 y 15 aminoácidos, inactivas dentro de la proteína intacta pero que pueden activarse al ser liberados bien durante la digestión del alimento en el organismo del individuo o por un procesado previo del mismo. En el segundo caso se encontrarían por ejemplo las proteínas de la leche, que son hidrolizadas (fragmentadas) durante la fabricación del queso. También, las proteínas de los alimentos pueden digerirse de manera artificial en el laboratorio mediante el uso de reactores de hidrólisis enzimática para liberar los péptidos bioactivos.

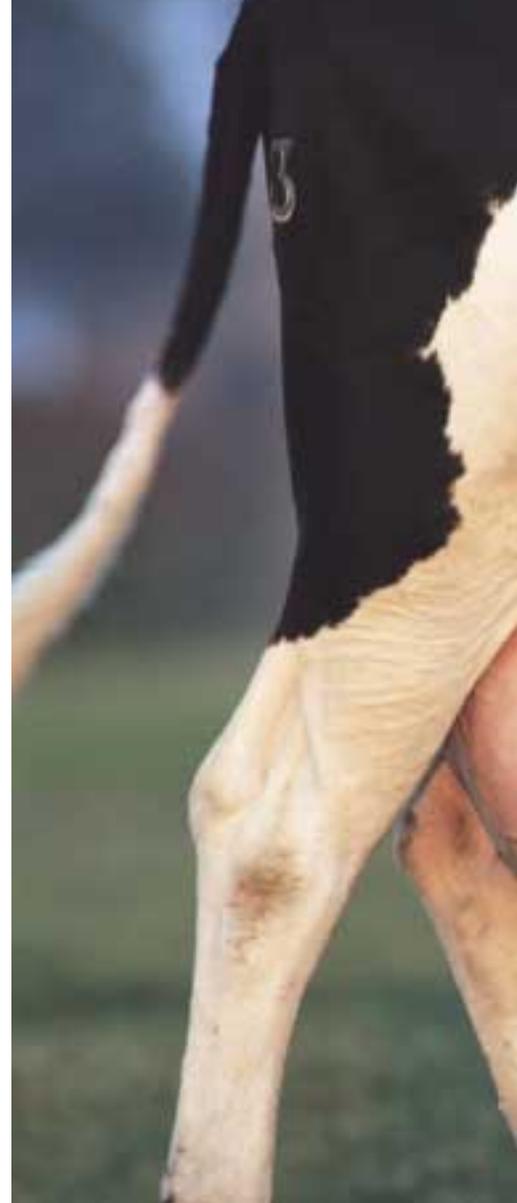
Estos péptidos tendrían efectos beneficiosos para el organismo en diversos casos (Tabla 1). Así pues, las características nutricionales de una proteína determinada no se limitarían solo al aporte de nitrógeno y energía que representan, así como a los contenidos en amino ácidos esenciales, sino también habría que considerar la actividad de péptidos bioactivos que pueden ser liberados de estas proteínas durante el procesado del alimento o la digestión gastrointestinal ejerciendo diversas funciones metabólicas beneficiosas para el organismo.

Los péptidos bioactivos han sido encontrados principalmente en las proteínas de la leche y en derivados de esta como quesos o yogurts. Pero también se ha observado su existencia en otras proteínas animales, pescados y diversos vegetales como soja, arroz o garbanzo e incluso hongos.

A continuación se describen los principales péptidos bioactivos encontrados hasta la fecha:

### Péptidos con actividad opioide

Se ha descrito la existencia de péptidos derivados de proteínas alimentarias con actividad opioide. El aislamiento por primera vez en 1975 de péptidos opioides endógenos denominados encefalinas, condujo a la detección en 1979 de la actividad opioide de péptidos derivados de hidrolizados proteicos de las proteínas de la leche. Estos son péptidos pequeños, entre 5 y 10 amino ácidos de longitud. Los más abundantes son las  $\beta$ -casomorfina denominadas así por derivar de la hidrólisis de la  $\beta$ -caseína y por su parecido efecto fisiológico al de la morfina. Otros péptidos aislados, aunque con menor actividad opioide, son las exorfinas generadas a partir de la hidrólisis de la  $\alpha$ -caseína,



na, las  $\alpha$ -lactorfinas derivadas de la  $\alpha$ -lactalbumina y las  $\beta$ -lactorfinas provenientes de la hidrólisis de la  $\beta$ -lactoglobulina.

La característica común en la secuencia aminoácida de todos estos péptidos es la presencia de un residuo de Tirosina en el extremo N-terminal así como la presencia de otro residuo aromático (Phe o Tyr) en la tercera o cuarta posición del péptido.

Se ha observado en ratas y perros que las casomorfina afectan la función gastrointestinal inhibiendo la tasa de vaciado gástrico y la motilidad intestinal y por lo tanto ralentizando el paso del alimento a través del tracto intestinal. También se ha descrito la presencia en el organismo de mujeres lactantes de  $\beta$ -casomorfina generadas a partir de  $\beta$ -caseína de la propia glándula mamaria y se ha sugerido que pueden producir cambios neurológicos en dichas mujeres.

Otras funciones propuestas para estos péptidos es la de ejercer una acción anti-diarreica o modular el transporte intestinal de amino ácidos.

TABLA 1: PÉPTIDOS BIOACTIVOS Y SUS EFECTOS SALUDABLES

Péptidos	Efecto beneficioso
Opioides	Regulan el tránsito intestinal Mejoran la digestión y absorción
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Transportadores de minerales	Mejoran la absorción de minerales y metales
Antitrombóticos	Reducen los riesgos de padecer trombos
Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Hipocolesterolemicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares



### Péptidos con actividad opioide antagonista

Se ha descrito también la existencia de péptidos derivados de la hidrólisis de la leche capaces de antagonizar la actividad de los péptidos opioides descritos anteriormente. Los principales, conocidos como casoxinas, son derivados de la  $\kappa$ -caseína y  $\alpha_{s1}$ -caseína humana o bovina. Así, las casoxinas A, B y C corresponden a los fragmentos aminoacídicos 35-41, 58-61 y 25-34 respectivamente de la  $\kappa$ -caseína. Por otro lado, la casoxina D es derivada de la  $\alpha_{s1}$ -caseína. También se han obtenido péptidos opioides antagonistas a partir de ésteres metílicos de otros fragmentos. Por ejemplo, la casoxina-6 que es un éster metílico del fragmento 33-38 de la  $\kappa$ -caseína. También, ésteres metílicos de péptidos derivados del lactoferrín, y conocidos como lactoferrinas tienen actividad opioide antagonista. En general, los péptidos opioides antagonistas tienen la estructura  $X_a$ -Aromático- $X_b$ -Tyr-OCH<sub>3</sub>. La naturaleza del

aminoácido  $X_a$  puede determinar la especificidad por uno u otro receptor opioide.

### Péptidos inmunomoduladores

Se ha observado que péptidos derivados de la hidrólisis de la  $\alpha$ -caseína y la  $\beta$ -caseína son capaces de estimular la fagocitosis de eritrocitos por macrófagos del peritoneo así como ejercer un efecto protector frente a infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* tras su administración intravenosa en ratones. Así mismo se ha descrito que la secuencia C-terminal de la  $\beta$ -caseína de vaca (que incluye a una  $\beta$ -casoquinina) induce una proliferación significativa de linfocitos de ratas. También, recientemente se ha descrito que la inmunoreactividad de linfocitos humanos era estimulada por varios péptidos bioactivos de proteínas de leche. Así, los péptidos Tyr-Gly y Tyr-Gly-Gly correspondientes a fragmentos de la  $\alpha$ -lactoalbumina y la  $\kappa$ -caseína de vaca respectivamente incrementaban significativamente la proliferación de linfocitos. Sin embargo, el mecanismo por el cual estos péptidos ejercen el mecanismo inmunomodulador no es bien conocido.

### Péptidos transportadores de minerales

También conocidos como caseinofosfopéptidos son fosfopéptidos derivados de la hidrólisis de caseína que pueden formar sales solubles organofosforadas y funcionar como transportadores de diferentes minerales. La caseína está fosforilada y los grupos fosfato están como monoésteres de los dos aminoácidos con grupos hidróxilo, serina y treonina. Los grupos fosfato parece que no se encuentran al azar en la cadena proteica, sino agrupados en secuencias del tipo Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu. Aunque los casei-

nofosfopéptidos son más conocidos por su capacidad de unir Ca, también se ha observado que pueden acomplejarse con macroelementos como Mg o Fe o oligoelementos como Zn, Ba, Cr, Ni, Co y Se.

### Péptidos con actividad antitrombótica o casoplatelinas

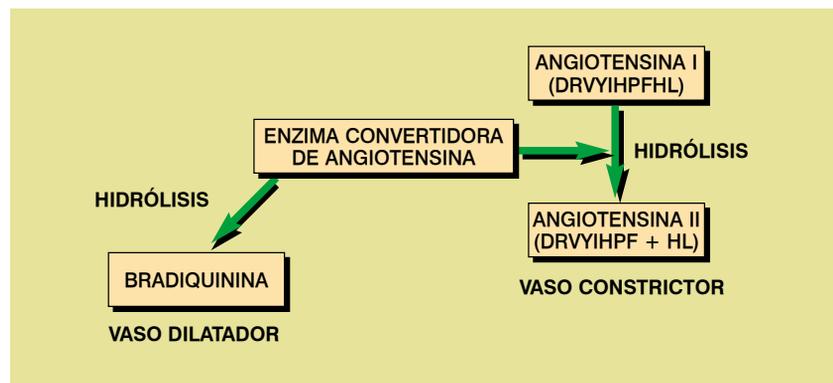
Estos péptidos son derivados del extremo C-terminal de la  $\kappa$ -caseína bovina. Presentan actividad inhibitoria de la agregación de plaquetas así como de la unión de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno humano a receptores específicos de la plaqueta. Los principales péptidos antitrombóticos de la  $\kappa$ -caseína son los correspondientes a la secuencia aminoacídica Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Glu-Asp-Lys, correspondiente a los aminoácidos 106 a 116. También tienen actividad los fragmentos menores 106-112, 112-116 y 113-116. Los residuos Ile<sub>108</sub>, Lys<sub>112</sub> y Asp<sub>115</sub> parecen ser importantes en el efecto inhibitorio que es debido a la competencia entre los péptidos y la cadena g por el receptor de la plaqueta.

### Péptidos inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina

La función más conocida y extendida de los péptidos bioactivos aislados hasta ahora es la de inhibición del enzima convertidor de angiotensina (ECA). Este enzima es una Zn-metalopeptidasa que se expresa como un ectoenzima unido a membrana en células endoteliales, fundamentalmente del sistema vascular. Por un lado, actúa incrementando la presión sanguínea al hidrolizar el decapeptido angiotensina I en el octapéptido vasoconstrictor angiotensina II. Por otro también degrada el péptido bradiquinina que es un potente vasodilatador (Figura 1). Esta peptidasa se encuentra localizada

FIGURA 1

Mecanismo de acción de la enzima convertidora de angiotensina



en múltiples zonas del organismo, como pulmón, riñón, corazón, músculos, páncreas, cerebro, arterias, útero e intestino. Los péptidos inhibidores de ECA son de pequeño tamaño, muchos di y tripeptidos, que son absorbidos fácil y rápidamente en el estómago e intestino. Pueden entrar en el sistema circulatorio e inhibir esta peptidasa, lo cual genera una bajada de la presión arterial. En este sentido, ya que la hipertensión está relacionada directamente con las enfermedades coronarias estos péptidos van a reducir los riesgos de generación de este tipo de enfermedades. Así, se han realizado ensayos de inhibición *in vitro* de la ECA, pero también *in vivo*, donde se ha observado que ratas hipertensas ven reducidas su presión arterial tras la ingesta de péptidos inhibidores de ECA demostrándose de esta forma el carácter beneficioso de su ingesta.

Péptidos inhibidores de ECA fueron aislados por primera vez en 1979 de un hidrolizado de gelatina obtenido con colagenasa. Desde entonces han sido encontrados en proteínas de leche fundamentalmente, y conocidos como casoquininas. Aunque también se han descrito en proteínas de pescado, maíz, trigo o arroz. En nuestro laboratorio hemos obtenido y purificado péptidos inhibidores de ECA a partir de las proteínas hidrolizadas del garbanzo, girasol o colza.

### Péptidos antioxidantes

Compuestos oxidantes se producen constantemente en los seres vivos. Estos compuestos pueden generar daños en proteínas, lípidos o ADN. Este daño ha sido relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades y con el envejecimiento. El daño oxidativo también tiene una gran importancia en los alimentos pudiendo afectar a su calidad nutricional y funcional. Los péptidos antioxidantes pueden limitar este daño oxidativo, tanto en alimentos (usándolos como antioxidantes naturales), como proteger frente a la oxidación a las células del organismo cuando sean ingeridos en la dieta. Péptidos antioxidantes se han obtenido a partir de proteínas de leche, soja, huevo o pescado. En nuestro laboratorio hemos observado que las proteínas de garbanzo hidrolizadas también generan péptidos con actividad antioxidante.

### Péptidos antimicrobianos y antivíricos

Péptidos resultantes de la hidrólisis de proteínas de leche han mostrado activi-



dad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas, gram-negativas, levadura e incluso hongos. También péptidos

arterial. El colesterol es un componente esencial de los seres vivos, sin embargo, también representa un factor de riesgo en

### Un componente bioactivo es aquel compuesto químico que ejerce un efecto beneficioso en la salud

de proteínas hidrolizadas de huevo mostraron actividad antibactericida.

En nuestro laboratorio hemos observado que péptidos obtenidos a partir de proteínas hidrolizadas de colza pueden inhibir la infección celular por el virus del HIV.

### Péptidos hipocolesterolémicos

Las enfermedades cardiovasculares representan el mayor problema de salud en nuestro medio. La cardiopatía isquémica es la complicación principal de la aterosclerosis, proceso inflamatorio que se desarrolla por la interacción entre el colesterol transportado en las lipoproteínas de baja densidad, los monocitos-macrófagos, las plaquetas y las células de la pared

muchas enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, es sabido que la dieta es en parte responsable de los niveles de colesterol en sangre. Así, se ha observado que una disminución de la ingesta de colesterol reduce los riesgos de padecer este tipo de enfermedades. En este sentido, aquellos mecanismos o sustancias que reducen la incorporación de colesterol a la sangre son considerados beneficiosos para la salud. Se ha observado que hidrolizados proteicos de soja reducen la absorción de colesterol. Y se ha demostrado que estos hidrolizados disminuyen los niveles de colesterol en sangre de personas hipercolesterolémicas, y decrecen la absorción *in vivo* del colesterol en ratas e *in*



**FIGURA 2**

Ejemplos de productos enriquecidos en péptidos bioactivos que se comercializan hoy día



versificar su oferta con la opción de productos elaborados con un alto valor añadido. Por último, los científicos apreciamos este campo como un area donde se plantean nuevos retos continuamente en la búsqueda de nuevos péptidos bioactivos, pero también en la verificación y comprobación mediante ensayos *in vivo* de los efectos beneficiosos para la salud de los nuevos péptidos. ■

*in vitro* en cultivos celulares. Esto es debido a que los péptidos disminuyen la solubilidad micelar del colesterol. Para su absorción el colesterol es solubilizado en micelas formadas por ácido bilicos. Sin embargo, los péptidos que forman parte de los hidrolizados compiten con el colesterol por las micelas disminuyendo la solubilidad final de este y por tanto la absorción por las células del epitelio digestivo. En nuestro laboratorio hemos obtenido hidrolizados proteicos hipocolesterolémicos tras hidrólisis de las proteínas del girasol con pepsina. Estos hidrolizados disminuyen de forma significativa la solubilidad micelar del colesterol.

Como vemos, una gran variedad de péptidos con actividad biológica en diversas fuentes alimenticias han sido descritos hasta la fecha. Sin duda, a medida que continuen las investigaciones y se amplie el espectro de proteínas alimentarias analizadas, nuevos péptidos serán descritos y otros efectos beneficiosos serán atribuidos. Las posibilidades son muy

numerosas, no solo por la diversidad del componente proteico de los alimentos. A esto hay que sumarle que estas proteínas pueden ser hidrolizadas de muy distinta forma en función de las proteasas que se usen para su digestión. En cada caso obtendremos un perfil peptídico diferente.

Hoy día ya se comercializan diversos productos alimentarios, todos derivados de la leche, enriquecidos en péptidos bioactivos. En la Figura 2 se muestran algunos de estos productos. Concretamente estos tres están enriquecidos con péptidos inhibidores del enzima convertidor de angiotensina.

Sin duda, el campo de los péptidos bioactivos es altamente prometedor en el area de los alimentos funcionales. Existe un gran interés por parte del consumidor, la industria y los científicos. Los consumidores ven la posibilidad de mejorar la salud o prevenir enfermedades mediante una alimentación más saludable. La industria percibe este campo como una oportunidad de ampliar su mercado y di-

## AgroCSIC

CENTRO DEL CSIC: Instituto de la Grasa.  
Departamento: Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales.  
Nombre Investigador: Francisco Millán Rodríguez.  
E-mail: frmillan@cica.es

**Tendencias de Investigación:**  
La actividad del grupo está centrada en la obtención, purificación y caracterización de péptidos bioactivos a partir de diversas fuentes proteicas. En la actualidad se está investigando la presencia de péptidos antioxidantes, hipocolesterolémicos o inhibidores del enzima convertidor de angiotensina a partir de las proteínas de garbanzo, girasol o colza. Estas proteínas son hidrolizadas mediante el uso de proteasas microbianas como alcalasa y flavorzima o digestivas como pepsina y pancreatina para la obtención de un hidrolizado proteico a partir del cual mediante técnicas cromatográficas purificamos los péptidos con actividad biológica. Así mismo, se están realizando también ensayos con cultivos celulares para determinar la tasa de absorción celular de estos péptidos y su resistencia a la hidrólisis.

# Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples “colorantes” naturales

MARÍA ISABEL MÍNGUEZ MOSQUERA, ANTONIO PÉREZ GÁLVEZ Y DÁMASO HORNERO MÉNDEZ. GRUPO DE QUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE PIGMENTOS. DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS. INSTITUTO DE LA GRASA (CSIC). SEVILLA



*El color de los alimentos es quizás el primer atributo que el consumidor valora cuando determina la apariencia y calidad de un producto, y por tanto va a condicionar su aceptabilidad. Una apariencia natural siempre será evaluada positivamente mientras que se tomarán precauciones ante un color extraño o inesperado que suele ser interpretado en términos de deterioro o manipulación inadecuada de las frutas y vegetales.*



El color externo a través de la experiencia, la educación y alguna componente innata, informa sobre el estado higiénico-sanitario, el valor nutricional, y además nos anticipa y proporciona sensaciones de otras características sensoriales como el olor y sabor. Existen estudios que demuestran interacciones cruzadas entre la percepción del color y otros sentidos, y que intervienen en la aceptabilidad de los alimentos (color-gusto, color-olor, color-flavor). El color se convierte en un índice de calidad y nos indica el deterioro de la misma.

En las frutas y vegetales, el color se debe principalmente al concurso de tres familias de pigmentos: clorofilas, carotenoides y antocianinas, que son responsables de la coloración verde, roja-amarilla, y azul-violeta respectivamente. La principal función observable de estos pigmentos en los vegetales, es la atracción de animales para actuar como vectores en la diseminación de las semillas y frutos, asegurando así el éxito reproductivo y la perpetuación de la especie. Sin duda la adquisición de estos colores llamativos ha sido seleccionada en el transcurso de la evolución y ha ayudado a la fijación de otros caracteres. Los humanos no quedamos ajenos a este fenómeno de atracción, de tal forma que la industria alimentaria conocedora de este hecho trata de hacer a los alimentos más atractivos normalmente a través del color.

Se puede afirmar que entre todos los pigmentos presentes en los organismos vivos, no hay duda que los carotenoides son, después de las clorofilas, los más ampliamente distribuidos en la Naturaleza. Se los encuentra en todo el reino vegetal, tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos (siendo responsables del color amarillo, naranja y rojo de la mayoría de frutos), en bacterias, algas, hongos y animales. Estos últimos no son capaces de sintetizarlos y los incorporan a través de la dieta. Se estima que la producción anual en la Naturaleza es de  $10^9$  toneladas, y en la actualidad se conocen cerca de 700 carotenoides.

Estructuralmente hablando los carotenoides son los únicos tetraterpenos natu-

rales, derivados de la unión de 8 unidades de isopreno que origina un esqueleto de 40 átomos de carbono. En general los carotenoides se clasifican en dos grandes grupos: carotenos (estrictamente hidrocarburos) y xantofilas, derivados de los anteriores por incorporación de funciones oxigenadas. Los carotenoides pueden presentar una estructura acíclica como licopeno, o poseer distintas estructuras cíclicas de cinco o seis carbonos en uno o ambos extremos, como  $\beta$ -caroteno. Dado el gran número de dobles enlaces de la cadena polienoica central, los carotenoides pueden existir en diversas conformaciones *cis/trans*, aunque la más estable y por tanto presente en la naturaleza es la *todo-trans*. En la Figura 1 se representa la estructura de los carotenoides más habituales y de mayor importancia biológica.

Los carotenoides se localizan en las células vegetales en el interior de orgánulos especializados, cloroplastos y cromoplastos; en los primeros acompañan a las clorofilas. En el caso de los frutos maduros, los carotenoides se acumulan en los plastoglóbulos de los cromoplastos de forma masiva y es donde la diversidad estructural alcanza un mayor grado. La presencia del extenso sistema de dobles enlaces conjugados de la cadena polienoica de los carotenoides conforma un cromóforo (parte de la estructura responsable de la absorción de luz visible y por tanto del color del compuesto) cuya capacidad de absorción de luz da lugar a los llamativos y característicos colores de estos pigmentos. El número de dobles enlaces conjugados y la presencia de diferentes grupos funcionales determinará en última instancia las características espectroscópicas propias de cada pigmento.

### Función y actividad biológica

La principal función biológica de los carotenoides es la de servir como pigmentos accesorios en la recolección de la luz durante el proceso fotosintético, y como sustancias fotoprotectoras, inhibiendo la propagación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, por tanto impidiendo la acción nociva de és-

tos a nivel celular. En los animales, este conjunto de pigmentos presenta varias actividades biológicas muy importantes desde el punto de vista nutricional y fisiológico. Como se ha mencionado anteriormente, los animales no pueden sintetizar carotenoides de *novo* aunque sí metabolizarlos a vitamina A (retinol, Figura 2), siempre y cuando reúnan los requisitos estructurales necesarios para ello, esto es, un anillo tipo  $\beta$  no sustituido. Aproximadamente un 10% de los carotenoides cumplen esta configuración, siendo  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxanteno, los más representativos. La Tabla 1 recoge la actividad de provitamina A relativa a  $\beta$ -caroteno de carotenoides presentes en la dieta. La única fuente de estos precursores de retinol es la dieta, y en la mayoría de los casos son las frutas y vegetales los alimentos que principalmente aportan carotenoides con actividad de provitamina a nuestra ingesta. Pero además, nuestro organismo utiliza otra actividad de estos componentes, común a todos ellos: la capacidad antioxidante frente a radicales libres de muy diversa naturaleza y origen, integrando a los carotenoides en el complejo sistema de antioxidantes primarios junto a los tocoferoles y la vitamina C, entre los que existe un ciclo regenerativo que aumenta sinérgicamente la capacidad antioxidante. Finalmente, nuestro metabolismo ha encontrado otros roles para los carotenoides, las denominadas actividades no antioxidantes, que se describen posteriormente.

### Carotenoides en la dieta mediterránea

De todos los carotenoides presentes en la Naturaleza, obviamente y atendiendo a nuestros hábitos dietéticos no todos están disponibles en nuestra ingesta, y solo accedemos en cantidades significativas a 30-40 de estos componentes. De ellos sólo se describen, de forma regular en plasma y tejidos periféricos a 13, entre los que destacan  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxanteno, licopeno, luteína y zeaxanteno. La dieta Mediterránea, es quizás la que mayor diversidad y canti-

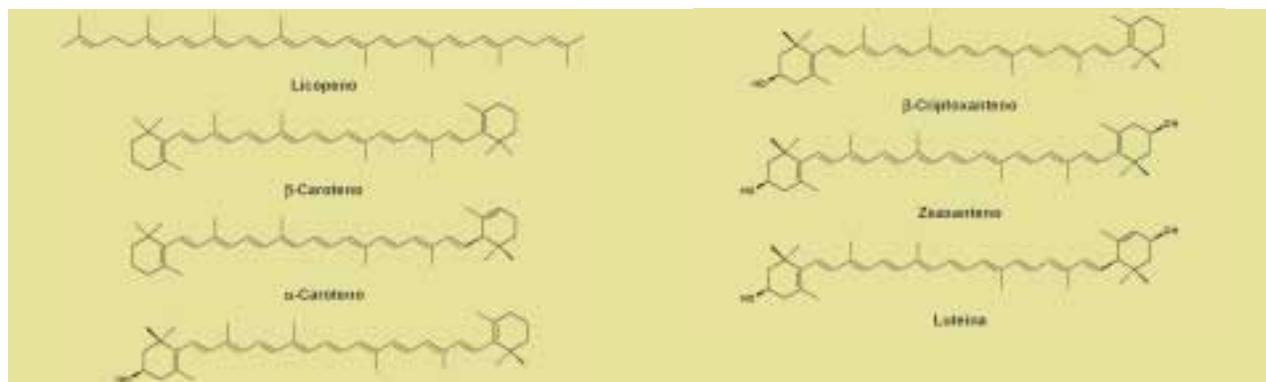


Figura 1. Estructura química de los pigmentos carotenoides habitualmente presentes en nuestra dieta y de mayor relevancia nutri-funcional.

dad de carotenoides aporta a la ingesta, por su elevado contenido en frutas y vegetales (frescos y/o procesados) y aceites de origen vegetal. Teniendo en cuenta los 6 carotenoides más representativos anteriormente mencionados, en la Tabla 2 se detallan las cantidades en las que se encuentran en alimentos del ámbito de la dieta Mediterránea. Todos los vegetales verdes aportan en mayor o menor cantidad luteína,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxanteno, pudiendo variar la concentración enormemente de una fuente a otra. La mejor fuente de  $\alpha$ -caroteno es la zanahoria y la calabaza, mientras que  $\beta$ -caroteno está más diversificado en frutas y vegetales como la zanahoria, el pimiento rojo, la naranja, la patata, el brócoli y vegetales verdes.  $\beta$ -Criptoxanteno se encuentra mayoritariamente en el pimiento maduro rojo y frutas de origen tropical como la papaya. La principal fuente de licopeno es el tomate y sus productos derivados (pasta y salsas) así como la sandía y el pome-

lo rojo. Entre las fuentes ricas en luteína destacan los vegetales verdes como las espinacas, coles de Bruselas, brócoli, y guisantes, mientras que zeaxanteno se encuentra en concentraciones altas en la yema del huevo y el maíz. Actualmente no existe una recomendación de ingesta diaria de carotenoides, aunque si se ha propuesto un valor de referencia de 6 mg/día, basado en el aporte de los carotenoides con actividad de provitamina A. La importancia del resto de funciones fisiológicas (actividades antioxidantes y no antioxidantes) demanda un estudio más profundo de las mismas y de la correlación dosis-efecto, para que permitan establecer unos valores de ingesta diaria para estos componentes.

### Absorción y acumulación

La liposolubilidad de los carotenoides es la principal característica que determina las etapas del proceso de liberación, transporte y asimilación desde el alimen-

to, y la eficacia de ellas. En el hombre, la eficiencia del proceso es baja, ya que sólo un 30% del total carotenoides ingerido se absorbe de forma efectiva. El proceso incluye una etapa de liberación del conjunto de carotenoides desde la matriz alimentaria y su incorporación a glóbulos lipídicos, que tiene lugar en el estómago, la formación de micelas, y la absorción del contenido de éstas por las células intestinales. En estas etapas interviene un sistema multifactorial que selecciona qué carotenoides se absorben preferentemente y en qué cantidad.

- *Liberación y solubilización desde la matriz alimentaria.* Los carotenoides se solubilizan en glóbulos lipídicos desde el alimento. Es un proceso mecánico y enzimático en el que la masticación y la acción de las secreciones gástricas permiten liberar los carotenoides e incorporarlos en pequeñas gotas de grasa. En esta etapa, un mayor grado de procesado del alimento, y la cantidad de

TABLA 1: CAROTENOIDES CON ACTIVIDAD DE PROVITAMINA A. VALOR PROVITAMÍNICO REFERIDO A  $\beta$ -CAROTENO SEGÚN BAUERNFEIND

Carotenoide	Porcentaje de actividad
<i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	100
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	38
13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	53
<i>trans</i> - $\alpha$ -caroteno	53
9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	13
13- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	16
<i>trans</i> - $\beta$ -criptoxanteno	57
9- <i>cis</i> - $\beta$ -criptoxanteno	27
15- <i>cis</i> - $\beta$ -criptoxanteno	42
$\beta$ -caroteno-5,6-epóxido	21
mutatocromo	50
$\gamma$ -caroteno	42-50
$\beta$ -zeacaroteno	20-40

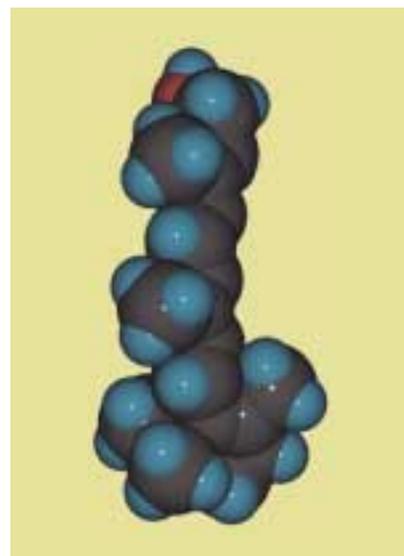


Figura 2. Estructura química de la forma activa de vitamina A (Retino)

grasa co-ingerida con éste aumentan la solubilización de carotenoides. Alimentos cocinados, y/o previamente homogeneizados son fuente de carotenoides más absorbibles. La naturaleza de la matriz, también es un factor a considerar; si es rica en fibras la disponibilidad final de carotenos se reduce en comparación con una matriz oleosa.

- *Incorporación a micelas.* Las gotas lipídicas se reducen considerable de tamaño gracias a los movimientos gastrointestinales y a la acción de las secreciones biliares que forman y estabilizan las micelas.

Las micelas son agregados moleculares cuyo exterior está formado por componentes hidrofílicos y un interior liposoluble rico en triglicéridos y en el que se encuentran los carotenoides. En esta etapa, la cantidad y tipo de grasa ingerida es el principal factor, puesto que estimulan las secreciones imprescindibles para solubilizar y estabilizar las micelas, e hidrolizar el conjunto de lípidos. En función del tipo de grasa ingerida se observa una respuesta diferente. Triglicéridos de cadena corta o media producen una absorción reducida, mientras que los tri-

glicéridos de cadena larga aumentan la disponibilidad de carotenoides. Elementos como la fibra y los sustitutos de las grasas (como los poliésteres de glucosa) son interferentes con la absorción.

- *Absorción por el enterocito.* Las micelas chocan con la pared intestinal y su contenido se difunde a través de la membrana del enterocito. En este punto se ha establecido una preferente absorción de las xantofilas respecto a los carotenos ya que la mayor polaridad de las primeras supone una ventaja en este proceso final.

**TABLA 2: CONTENIDO EN CAROTENOIDES EN ALIMENTOS REPRESENTATIVOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA, EXPRESADO EN  $\mu\text{g}/100 \text{ G}$ .**

<i>Vegetales verdes</i>	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxanteno	luteína o zeaxanteno	licopeno
Lechuga	–	1.272	–	2.635	–
Espinaca	–	5.597	–	11.938	–
Coles de Bruselas	6	450	–	1.590	–
<i>Hortalizas/Tubérculos</i>					
Judías	147	408	–	–	–
Brócoli	1	779	–	2	–
Pimiento	59	2.379	2.205	–	–
Calabaza	4.795	6.940	–	–	–
Patata	–	6	–	–	–
Tomate	112	393	–	130	3.025
Zanahorias	4.649	8.836	–	–	–
Cebolla	6	–	–	–	–
<i>Frutas</i>					
Piña	30	–	–	–	–
Plátano	5	21	–	–	–
Uva	5	603	12	13	–
Mango	17	445	11	–	–
Melón	27	1.595	–	40	–
Naranja	16	51	122	187	–
Sandía	–	295	103	17	–
Pera	6	27	–	17	4.868
<i>Cereales</i>					
Maíz	33	30	–	884	–
Trigo	–	100	–	35	–
<i>Aceites vegetales</i>					
Oliva	–	219	30	5.990	–
Palma	24	38	–	–	–

Principalmente, los carotenoides se acumulan en el tejido adiposo e hígado, aunque se ha descrito la presencia de estos componentes en el pulmón, riñón, piel, y médula espinal. El plasma, al ser el medio de distribución de estos pigmentos, mantiene siempre una reserva de carotenoides circulando, transportados en lipoproteínas. Tejidos en los que se depositan carotenoides de forma muy específica son la macula lutea y la próstata. En la macula lutea, se depositan preferentemente zeaxanteno y luteína. Su escasa presencia se correlaciona con una actividad preventiva de la degeneración macular, que se comentará más adelante. En la próstata también se observan cantidades apreciables de licopeno, ligado al desarrollo de actividad anticancerosa. La correlación entre la concentración tisular carotenoides y la ingesta de estos compuestos es directa por lo que los carotenoides se utilizan como biomarcadores del consumo de frutas y vegetales, ligado a una reducción del riesgo a desarrollar enfermedades degenerativas según múltiples estudios epidemiológicos.

### Actividades no antioxidantes

Como ya se ha indicado, la principal función fisiológica de los carotenoides es su actividad como provitamina A, función que por causas estructurales sólo puede desarrollar algunos carotenoides. Junto a esta función, se describe la capacidad antioxidante como la más representativa de los carotenoides, y que se hace extensiva a todos ellos (con o sin actividad provitaminica). Los carotenoides inhiben el proceso de auto-oxidación lipídica, por lo que su presencia en las membranas celulares evita los consecuentes procesos negativos. Reaccionan además

con otros radicales de múltiple naturaleza, como por ejemplo los formados durante el metabolismo de compuestos xenobióticos. En el desarrollo de esta función está basada la correlación entre luteína y zeaxanteno y la disminución del riesgo de degeneración macular, una enfermedad que provoca ceguera y que tiene un elevado nivel de incidencia en la tercera edad. En el estrés oxidativo y la génesis de radicales libres están basados la aparición de procesos degenerativos como ciertos cánceres y tumores, las enfermedades cardiovasculares, la depresión del sistema inmune, etc. Por tanto, la implicación de los carotenoides en la inhibición o reducción del estrés oxidativo, participando como antioxidantes sería el principal mecanismo de acción de estos compuestos y la caracterización de ellos como anticancerígenos e inmunoactivadores.

Sin embargo no es este el único mecanismo de acción posible. La proliferación celular está controlada mediante la comunicación que se establece entre las células de un mismo tejido. En caso de proliferación anómala, el restablecimiento o la estimulación de la comunicación es fundamental para controlarla, y este sería el sistema mediante el que los carotenoides pueden regular la proliferación y actuar como anticancerígenos, ya que se ha establecido que los carotenoides estimulan la expresión de un gen, con-



xin 43, que permite la comunicación intercelular. Las células del sistema inmune también se basan en la comunicación intercelular para ejercer su actividad de forma efectiva por lo que este mismo mecanismo sustentaría la promoción del sistema inmune por parte de los carotenoides. Todas estas actividades han generado dos líneas de investigación que sustentan la funcionalidad fisiológica de los carotenoides: su actividad como antioxidantes de membrana, integrándose en el ciclo oxidativo de la célula junto con otros antioxidantes primarios, y por otro lado, su implicación en los procesos de control de la diferenciación y proliferación celular.

Los conocimientos adquiridos a partir de 1980 fueron los principales impulsores de varios ensayos clínicos, en los que se suministró  $\beta$ -caroteno en dosis supra-fisiológicas (25-50 mg), llevados a cabo con grupos de población de riesgo. Los seis estudios completados hasta la fecha se exponen en la Tabla 3, que incluye la dosis suministrada, el grupo de población empleado y el resultado. En general se observa ausencia de correlación entre la suplementación y el desarrollo del proceso degenerativo; ni beneficios ni riesgos es la conclusión más extendida. Sin embargo, en un estudio se detectó un incremento de la mortalidad en el grupo de riesgo, lo que llevó a la suspensión del tratamiento y provocó alertas y cierta confusión, puesto que el resultado era el contrario al esperado. Experiencias posteriores han revelado que la suplementación a dosis elevadas (más de 20 mg) con  $\beta$ -caroteno en fumadores sí incrementa el

**TABLA 3: ENSAYOS CLÍNICOS DE SUPLEMENTACIÓN CON  $\beta$ -CAROTENO EN GRUPOS DE POBLACIÓN DE RIESGO Y CORRELACIÓN ENCONTRADA**

Dosis	Grupo de población	Efecto	Referencia
50 mg $\beta$ -caroteno (5 años)	Pacientes con cáncer de piel en periodo de latencia	Ausencia de correlación	Greenberg et al 1990
50 mg $\beta$ -caroteno con o sin vitamina C y $\alpha$ -tocoferol (5-8 años)	Pacientes con historial de adenoma colorectal	Ausencia de correlación	Greenberg et al 1994
20 mg $\beta$ -caroteno (5-8 años)	Fumadores	Correlación negativa	ATBC Cancer Prevention Study Group 1994
30 mg con 25.000 UI de vitamina A	Fumadores o personas expuestas a asbesto	Correlación negativa	Omenn et al 1996
50 mg $\beta$ -caroteno (12 años)	Fumadores desde el inicio del ensayo	Ausencia de correlación	Hennekens et al 1996
15 mg $\beta$ -caroteno 50 $\mu$ g selenio, 30 mg $\alpha$ -tocoferol (5-6 años)	Adultos aquejados de malnutrición	Correlación positiva	Blot et al 1993



tablecido además una correlación entre el depósito de estos pigmentos en los tejidos mencionados y la protección de los mismos contra el daño degenerativo.

No cabe duda que estas actividades sirven para reconocer la importancia de estos componentes en nuestra dieta, actividades cuya valía supera ampliamente a la función de proporcionar un color atractivo, adecuado, o reconocible como natural, a un alimento. Sin embargo nos dejamos llevar por las llamativas coloraciones y que por supuesto añaden un toque de fantasía y variedad cromática a nuestros platos. Y está bien que así sea, puesto que enmascarados por el color se ocultan muchos beneficios derivados no sólo ya de los carotenoides sino del conjunto de componentes de frutas y vegetales (fibra, vitaminas y otros ingredientes funcionales) para los que los carotenoides también sirven como reclamo. En definitiva dejemos que la Naturaleza nos atraiga con sus llamativos colores y aprovechémonos de las recompensas que nos esperan por haber sido persuadidos.

riesgo de enfermedad debido a la génesis de metabolitos que incrementan el ciclo oxidativo y disminuyen el control de la diferenciación y proliferación celular.

La estrategia de utilizar a  $\beta$ -caroteno como quimioprotector, por tanto, no está avalada por los ensayos clínicos en las condiciones estudiadas. La dosis es quizás el factor clave a controlar en estos estudios, que probablemente en el futuro sí tengan repercusiones positivas. No se trata por tanto de utilizar a los carotenoides como fármacos, intentando obtener de una ingesta puntual un efecto agudo, sino como componentes bioactivos de la dieta, cuya acción positiva se obtiene de una ingesta a la dosis habitual y de la que se deriva un efecto crónico. Esta idea está en concordancia con las recomendaciones dietéticas actuales de consumir cinco raciones de frutas y hortalizas frescas al día, lo que nos proporciona agua, vitaminas hidrosolubles y liposolubles, fibra y compuestos fitoquímicos como los carotenoides.

Los resultados más positivos encontrados entre la ingesta de un carotenoide y la disminución efectiva de riesgo a desarrollar un proceso degenerativo se han encontrado para luteína, zeaxanteno, y licopeno. Existen evidencias claras que las mencionadas xantofilas reducen las dos enfermedades más comunes en la tercera edad: las cataratas y la degeneración macular, e incluso pueden retardar el progreso de estos procesos una vez comenzados. También existen pruebas correlacionando dietas ricas en licopeno con una disminución del riesgo a desarrollar cáncer de próstata. En estos casos sí se ha es-

tablecido además una correlación entre el depósito de estos pigmentos en los tejidos mencionados y la protección de los mismos contra el daño degenerativo.

#### Bibliografía

- Bauernfeind, J.C. (1972). *Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds*. J. Agric. Food Chem. 20: 456-473.
- Blot, W.J., Li, J.Y., Taylor, P.R., Guo, W., Dawsey, S., Wang, G.Q., Yang, C.S., Zheng, S.F., Gail, M., Li, G.Y., Yu, Y., Liu, B., Tangrea, J., Sun, Y., Liu, F., Fraumeni, J.F., Zhang, Y.H., Li, B. (1993). *Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population*. J. Natl. Cancer Inst. 85: 1483-1492.
- Gandul-Rojas, B., Mínguez-Mosquera M.I. (1996). *Chlorophyll and carotenoids composition in virgin olive oils from various spanish olive varieties*. J. Sci. Food Agric. 72: 31-39.
- Graham, R.D., Rosser, J.M. (2000). *Carotenoids in staple foods: their potential to improve human nutrition*. Food Nutr. Bull. 21: 405-409.

Greenberg, E.R., Baron, J.A., Stukel, T.A., Stevens, M.M., Mandel, J.S., Spencer, S.K., Elias, P.M., Lowe, N., Nierenberg, D.W., Bayrd, G., Vance, J.C., Freeman, D.H., Clendenning, W.E., Kwan, T., *The Skin Cancer Prevention Study Group*. (1990). *A clinical trial of beta carotene to prevent basal-cell and squamous-cell cancers of the skin*. N. Engl. J. Med. 323: 789-795.

Greenberg, E.R., Baron, J.A., Tosteson, T.D., Freeman, D.H., Beck, G.J., Bond, J.H., Colacchio, T.A., Collier, J.A., Frankl, H.D., Haile, R.W., Mandel, J.S., Nierenberg, D.W., Rothstein, R., Snover, D.C., Stevens, M.M., Summers, R.W., Van Stolk, R.U., *The polyp prevention study group*. (1994). *A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma*. N. Engl. J. Med. 331: 141-147.

Hennekens, C.H., Buring, J.E., Manson, J.E., Stampfer, J., Rosner, B., Cook, N.R., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, J.M., Ridker, P.M., Willet, W., Peto, R. (1996). *Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease*. N. Engl. J. Med. 334: 1145-1149.

Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh, J.P., Meyskens, F.L., Valanis, B., Williams, J.H., Barnhart, S., Hammar, S. (1996). *Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease*. N. Engl. J. Med. 334: 1150-1155.

The alpha-tocopherol, beta carotene cancer prevention study group. (1994). *The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers*. N. Engl. J. Med. 330: 1029-1035. ■

## AgroCSIC

CENTRO DEL CSIC: Instituto de la Grasa.  
Departamento: Biotecnología de Alimentos.

Nombre Investigador: María Isabel Mínguez Mosquera (profesor de Investigación).  
E-mail: minguez@cica.es  
Web: www.ig.csic.es

#### Tendencias de Investigación:

1. Biosíntesis y catabolismo de pigmentos clorofílicos y carotenoides durante el desarrollo y maduración de los frutos.
2. Transformaciones de pigmentos durante el procesado y almacenamiento de alimentos de origen vegetal.
3. Influencia de la estructura y entorno bioquímico y físico-químico de clorofilas y carotenoides en sus propiedades antioxidantes y nutricionales.

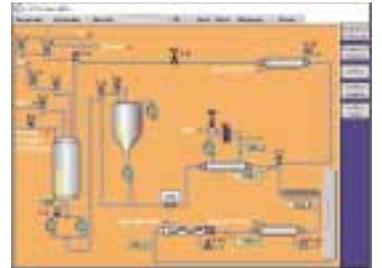
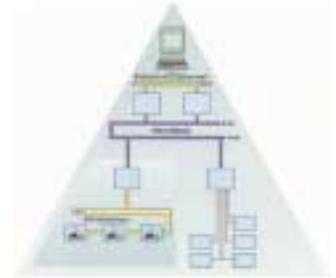
INTERCAMBIADORES DE CALOR



# Gémina<sup>®</sup>

versatilidad  
cercanía  
compromiso  
confianza  
seriedad  
innovación  
calidad

AUTOMATIZACIÓN



BOMBA VOLUMETRICA DE PISTONES



BOMBA VOLUMETRICA DE PISTONES



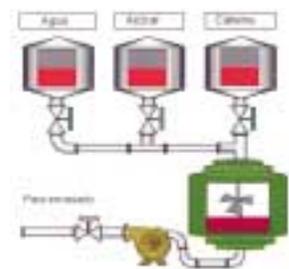
PLANTAS DE PASTEURIZACIÓN



PLANTAS LLAVE EN MANO



MANIFOLD DE VALVULAS



Simón Ingeniería, S.L.

# Características químicas nutricionales y funcionales de los alimentos

MARÍA ISABEL MÍNGUEZ MOSQUERA, ANTONIO PÉREZ GÁLVEZ. GRUPO DE QUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE PIGMENTOS. DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS. INSTITUTO DE LA GRASA (CSIC). SEVILLA



*El concepto de calidad sensorial es difícil de definir porque no está ligado exclusivamente a características o propiedades intrínsecas del alimento sino que es el resultado de la interacción entre éste y el consumidor (Figura 1).*



**D**urante los últimos 10-15 años la noción que la industria y el consumidor tenían de los alimentos se ha modificado sustancialmente. Las diversas crisis que arrasaron los mercados alimentarios durante ese periodo habían propiciado una falta de confianza del consumidor en el funcionamiento de la cadena alimenticia. La discusión sobre la aplicación de nuevas tecnologías, como la modificación genética, no hizo sino introducir nuevos temores y mayor confusión. Esta tendencia negativa (el alimento se concibe como un elemento potencialmente peligroso para la salud al contener contaminantes, virus, bacterias y polución orgánica e inorgánica) se incrementaba con la investigación en nutrición y las advertencias de los organismos de salud pública que recomendaban modificar los hábitos dietéticos en la ingesta de macro y micro-nutrientes (grasas, proteínas, azúcares, fibra y constituyentes inorgánicos). A consecuencia de todo esto se produjo una modificación progresiva de la dieta y del concepto de alimento, transformando con ello la percepción del mismo. El consumidor se hace más responsable de su alimentación y muestra su deseo de cambiar los hábitos dietéticos hacia una dieta saludable, pero demandando la introducción de componentes “positivos” que contribuyan a la salud más que la exclusión de ingredientes considerados “negativos”. Conceptos como “antioxidantes”, “regulación del colesterol”, “ $\omega$ -3”, “pro-bióticos”, “enriquecido en fibra” inundan el vocabulario actual con la idea de que con ellos se puede mantener e incrementar la salud.

A este cambio de tendencia han contribuido enormemente los siguientes factores:

1. Los estudios epidemiológicos que demuestran que con una dieta sana y equilibrada, que incluya la mezcla óptima de compuestos fito-químicos, se reduce el

riesgo de contraer una serie de enfermedades crónicas de carácter degenerativo.

2. El envejecimiento de la población mundial. En 1999 la población mayor de 60 años representaba el 19% mientras que para 2050 será un 33%. En España se espera que para 2010 esa población alcance los 7.5 millones de personas con edades entre los 75 y 85 años lo que constituye una nueva redistribución de la vejez. Por sí este he-

rácter neuro-degenerativo que también están relacionadas con la dieta.

4. Aumento de los costes de sanidad que representan actualmente entre el 20% y el 30% del presupuesto total en los países Occidentales.

Ante esta situación el consumidor toma una actitud activa y se hace responsable de su propia salud a través de la alimentación, demandando productos con renovadas características nutriciona-

## Nuestra alimentación se caracteriza por el consumo de productos de alto contenido calórico

cho es suficiente para modificar el concepto y tipo de alimentación ya que aunque la tercera edad requiere una menor contribución energética, necesita mantener su ingesta en micronutrientes lo que implica la demanda de alimentos con un contenido nutricional de mayor densidad (alimentos enriquecidos) y además de mayor digestibilidad (alimentos modificados). Este factor se concatena con los dos siguientes:

3. Aumento en el nivel de dependencia de esa población, por el desarrollo de nuevas enfermedades crónicas de ca-

les, y la industria alimentaria responde ante esta demanda introduciendo dos medidas:

1. La aplicación de tecnologías de procesamiento emergentes para obtener alimentos seguros y saludables implementando la trazabilidad.
2. La creación de productos alimentarios, que ayuden al consumidor a mantener e incrementar su salud: los alimentos con ingredientes funcionales.

La investigación en ciencia y tecnología de alimentos ha contribuido positivamente a estos cambios generando los aspectos tecnológicos necesarios para de-

**TABLA 1: FACTORES LIGADOS AL ESTUDIO DE INGREDIENTES FUNCIONALES Y DISEÑO DE NUEVOS ALIMENTOS**

Factor clave	Causa/Efecto
<p>Investigación</p> <p>Valor añadido</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- industria</li> <li>- consumidor</li> </ul> <p>Diseño y digestibilidad</p> <p>RDA, UL, toxicología</p> <p>Aplicaciones</p> <p>Grupo de población</p> <p>Aspectos legales</p>	<p><b>Nuevos ingredientes, mecanismo de acción</b></p> <p>“Know-how”, ventaja competitiva</p> <p>Promoción de la salud</p> <p>Alternativas</p> <p>General, definido, indefinido</p> <p>Definición, dosificación</p>

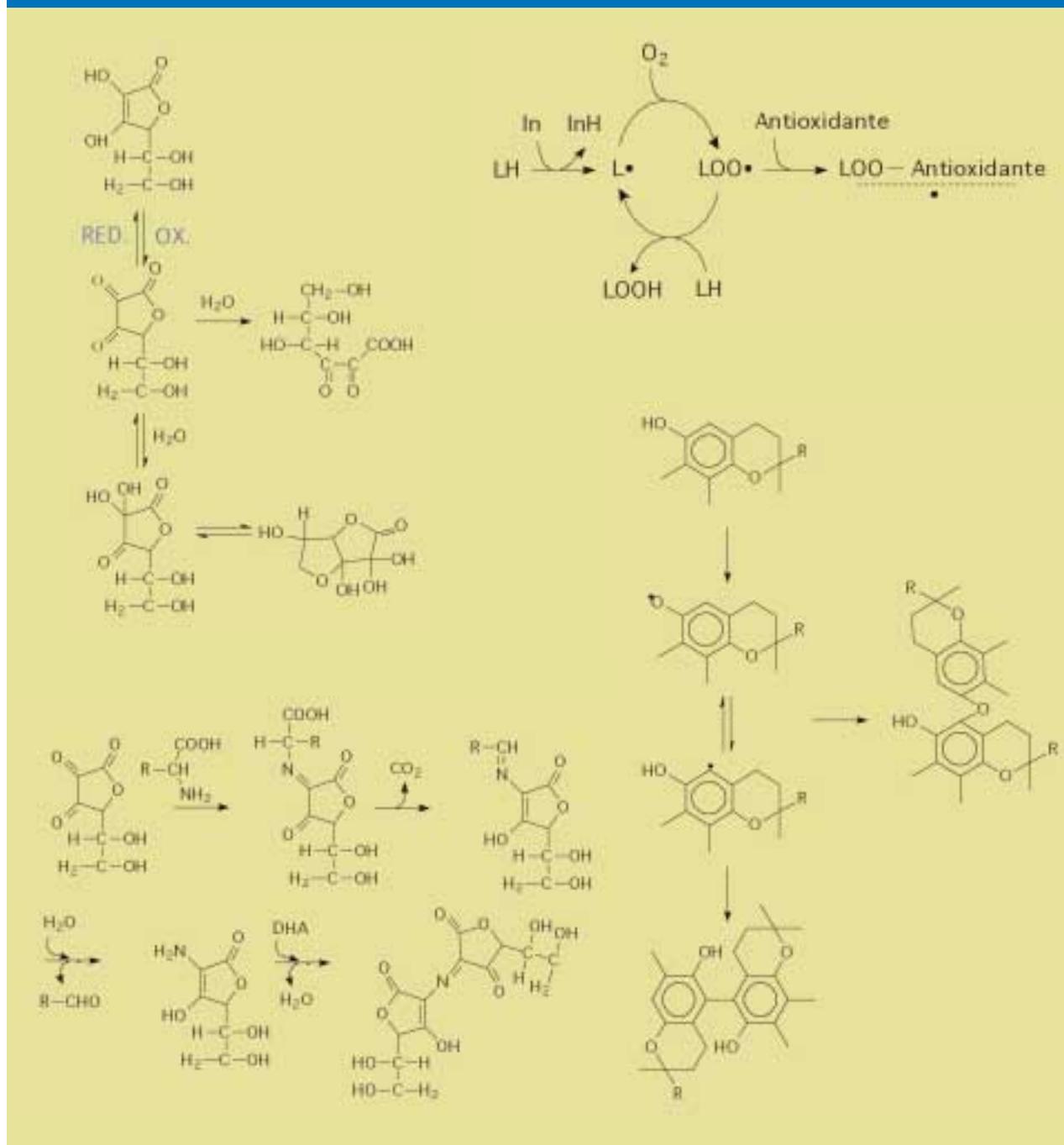
sarrollar nuevos procesados, y delimitando los beneficios y riesgos de nuevos ingredientes alimentarios, recurriendo a la biomedicina. Para ello ha sido, es y será necesario que la investigación en ciencia de alimentos sea multidisciplinar y con ello capaz de aunar las características químicas, nutricionales y funcionales de los ingredientes de los alimentos para concretar los siguientes elementos:

1. El empleo de técnicas de procesado que aseguren el contenido nutricional del alimento modificando su funcionalidad en su sentido tecnológico: *procesado* y *funcionalidad*.
2. El *diseño de alimentos funcionales* más que introducir ingredientes funcionales en la dieta por el mero hecho de serlos.
3. La *evaluación de las características nutricionales* y funcionales de los ingre-

dientes alimentarios.

Como se ha mencionado existen dos acepciones del término funcional, y que incluyen su significado "tecnológico" y su significado "fisiológico". Ambas acepciones, junto con la propiedad nutricional surgen a partir de las características químicas de los ingredientes que componen los alimentos, principalmente por la estructura y presencia de grupos reactivos

FIGURA 1. REACCIONES REDOX PARA ANTIOXIDANTES TIPO Y ESQUEMA DE LOS PROCESOS DE AUTOOXIDACIÓN LIPÍDICA





característicos de dichos componentes. De las características químicas se derivan, el valor nutricional del producto y su atractivo sensorial, y son el origen del desarrollo, durante y después del procesado del alimento, de cambios tanto convenientes como indeseables. Y posteriormente, cuando dichos ingredientes son ingeridos, éstos participarán en las actividades metabólicas del organismo por las que tienen un valor nutricional determinado, y en ocasiones un beneficio extra del cual se deriva su carácter funcional en el sentido fisiológico.

### Procesado y funcionalidad

El concepto de funcionalidad tecnológica implica que a partir de la interacción

## La microencapsulación evitaría los problemas de inestabilidad de AGPI

de los constituyentes en el alimento, interacción propiciada o acentuada por las condiciones de procesado, emergen las características, tanto organolépticas como nutricionales, adecuadas para satisfacer la demanda del consumidor pero también cambios negativos. El análisis y aplicación de la funcionalidad tecnológica

ca hace posible el desarrollo de técnicas que favorezcan los cambios positivos y minimicen los negativos.

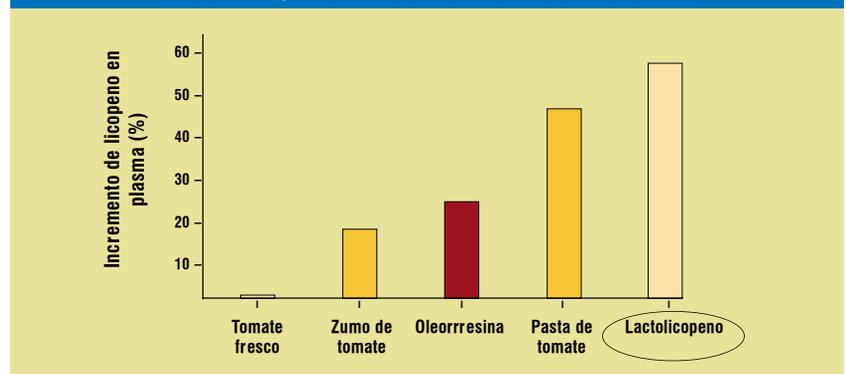
En la mayoría de los casos estos últimos afectan principalmente a los componentes clave del alimento, modificando entonces la estructura química de micronutrientes como antioxidantes, vitaminas, minerales y compuestos fitoquímicos. Nuestra alimentación está caracterizada por el consumo de productos con alto contenido calórico que se ha incrementado a lo largo de la historia, con productos deficientes en los micronutrientes anteriormente mencionados bien porque la selección de la materia prima sea inadecuada bien por el impacto negativo del procesado. El desarrollo de las tecnologías emergentes hace y hará posible un procesado más suave, el descenso tanto en el empleo de aditivos como en el uso de grasas y azúcares, y el uso más acertado de los envasados. Estas expectativas se pueden hacer realidad sin afectar a la estabilidad del producto mediante el desarrollo de las mencionadas técnicas emergentes aplicadas a la estabilidad biológica (preservación) y química (conservación).

Durante estos procesados, las características químicas de los componentes de los alimentos, grupos funcionales de mayor o menor reactividad, de carácter electrófilo o nucleófilo, se modifican al interaccionar los distintos constituyentes entre sí, siendo alguna de las modificaciones más representativas las que se presentan en la Figura 1. Estas reacciones son generalmente procesos redox como las que afectan a distintos antioxidantes, por las que se transforman los grupos funcionales de la molécula o su estructura cambiando completamente las propiedades originarias que de ellas se derivaban. Entre las reacciones que afectan negativamente a las cualidades organolépticas y nutricionales de los alimentos se describen a las reacciones de autooxidación lipídica y las de Maillard.

Una estrategia bastante frecuente para evitar estos procesos es la aplicación de métodos endógenos, es decir, *disminuir* la susceptibilidad a la oxidación de la fracción lipídica modificando el contenido en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y su distribución en los triglicéridos, o *modificar* la interfase de la matriz lipídica. La década pasada implicó cambios sustanciales en el tipo de aceite comestible que



FIGURA 2. PORCENTAJE DE INCREMENTO DE LICOPENO EN PLASMA TRAS LA INGESTA DE TOMATE CRUDO, ZUMO DE TOMATE, OLEORRESINA DE TOMATE, PASTA DE TOMATE Y LACTOLICOPENO.





se procesaba gracias a la introducción de nuevas especies vegetales con proporciones de AGPI más adecuadas, considerando su estabilidad. La hidrogenación reduce el contenido en AGPI del aceite de soja desde el 61% hasta el 2% incrementando el 100% en grasa saturada y el 50% en forma *trans*, ambas cuestionables desde el punto de vista nutricional. El caso de los aceites de pescado resulta más llamativo ya que el 90% de su producción es sometida a hidrogenación para producir margarinas y aceites de fritura. La investigación debe proporcionar herramientas adecuadas para el procesado y conservación de este tipo de aceites ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3. En este sentido se definen dos líneas de investigación: el diseño de lípidos estructurales y la modificación de la matriz alimenticia.

La esencialidad en nutrición de algunos ácidos grasos de la familia  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 se contraponen a la generación de procesos degradativos que tienen su origen en la naturaleza poliinsaturada de los ácidos grasos. Ambos aspectos se pueden conciliar mediante el uso de lípidos estructurales, aquellos que presentan una composición en ácidos grasos y una distribución de esos ácidos en glicerol, definidas. Un

ejemplo de ellos son los triglicéridos con ácidos grasos de cadena media (AGCM) que al presentar un metabolismo distinto son fuente de energía directa. Estos lípidos se aplican para cubrir las necesidades nutricionales de pacientes hospitalizados o aquellos con problemas en la digestión de grasas. También se utilizan en la elaboración de alimentos de bajo contenido calórico. Para no faltar a la provisión de ácidos grasos poliinsaturados, esenciales para el organismo, se combinan de forma específica AGCM y AGPI en triglicéridos como el que les presenta en esta transparencia. La colocación de AGCM en las posiciones 1 y 3 y del AGPI en 2 es la más ventajosa para favorecer la absorción de estos componentes y sus efectos beneficiosos en la salud. Además se disminuye la proporción de AGPI con lo que aumenta la estabilidad oxidativa del alimento del cual forman parte. Tanto la aplicación, como los beneficios de los lípidos estructurales están muy definidos, por lo que el aporte de la investigación incide sobre los aspectos relacionados con la elaboración de estos lípidos, que se pueden producir por

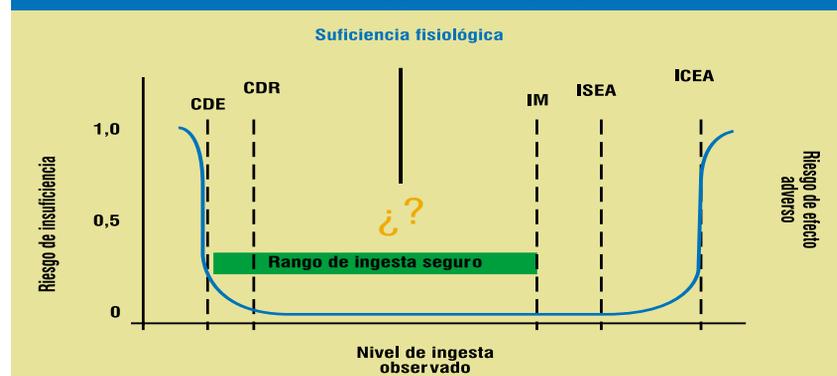
métodos enzimáticos o químicos. Los métodos químicos generan mezclas al azar de triglicéridos utilizando condiciones de procesado muy drásticas con un impacto negativo sobre los AGPI. Es el procesado enzimático, que ofrece una

## Los consumidores varían sus hábitos hacia una dieta saludable

mayor selectividad en la composición y en la distribución, el de mayor futuro y en el que se centran los estudios actuales.

La segunda línea de investigación propone la modificación de la interfase de la matriz lipídica como alternativa para prevenir las interacciones negativas entre lípidos y los productos derivados de su oxidación, y el resto de componentes del alimento. Con técnicas como la microencapsulación se evitarían los problemas referentes a la inestabilidad de AGPI, su desplazamiento por grasas saturadas, así como el excesivo uso de la hidrogenación. Actualmente se desarrollan materiales de recubrimiento adecuados no solo para ácidos grasos sino también para vitaminas y minerales. Un ejemplo de completa actualidad es el uso de liposomas en nutrición por sus adecuadas pro-

**FIGURA 3. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS FISIOLÓGICOS DURANTE EL AUMENTO EN LA INGESTA DE INGREDIENTES FUNCIONALES Y NUTRIENTES**



propiedades como distribución de tamaños, eficiencia en la encapsulación y capacidad de emulsión. Además de la contribución a una mayor estabilidad del material encapsulado se deriva otra función muy interesante y que les quiero reseñar: el aumento de la biodisponibilidad de micronutrientes insertados en liposomas. Los nutrientes encapsulados en liposomas son absorbidos más eficientemente al mejorarse aspectos como su solubilización y estabilización, mayor grado de micelarización, o entrada directa en el torrente sanguíneo. La evolución de esta línea de investigación pasa por el desarrollo de materiales de encapsulación adicionales para estabilizar los liposomas en el tracto intestinal, como los polímeros, y la mejora de los métodos de obtención de estas partículas lipídicas.

Relacionado con este campo de trabajo y con los micronutrientes en los que se centran nuestras tareas de investigación, los carotenoides, se expone el siguiente ejemplo que reúne los elementos comentados hasta este punto: la eficiencia en el control de la interacción química de diversos componentes, y el diseño e innovación en el procesado de ingredientes clave modificando la matriz en la que se incorporan. En concreto se trata de una reciente formulación que utiliza a licopeno como ingrediente nutricional: el lactolycopeno. Esta formulación aumenta significativamente la estabilidad de licopeno al preservarlo del contacto con compuestos oxidantes. Pero además incrementa considerablemente la biodisponibilidad de este caroteno en comparación con las fuentes naturales y productos derivados caracterizados por la presencia de licopeno. Como se observa en la Figura 2 el incremento de licopeno en plasma espec-

to al nivel basal es significativamente superior cuando se suministra a este caroteno encapsulado en comparación con cualquier otra fuente de licopeno. A falta de delimitar la estabilidad de esta preparación al interaccionar con otros componentes del alimento, la mejor solubilidad junto con el incremento en biodisponibilidad que presenta posibilitan su uso en el diseño de formulaciones de alimentos como los zumo-lácteos.

Nuestra contribución actual a los aspectos relacionados con el procesado y funcionalidad se basa en el signo contrario de las interacciones químicas que he expuesto hasta el momento, cuando a través de ellas se producen cambios *positivos*. En concreto se trata de las modi-



## Se da un efecto positivo en la salud humana ante la presencia de algunos ingredientes de los alimentos

ficaciones del potencial antioxidante de alimentos de origen vegetal durante el procesado. Las condiciones de procesado pueden producir diversos efectos sobre esta capacidad: ningún cambio, una disminución o un aumento, siendo este último caso el más interesante y que tendría lugar a través de reacciones redox que modificarían el estado de oxidación que presenta inicialmente el compuesto al que se le atribuyen propiedades antioxidantes. Por ejemplo, los antioxidantes fenólicos con un estado intermedio de oxidación muestran una mejor eficiencia antioxidante en comparación con estados no oxidados. Promoviendo una oxidación, bien enzimática bien química, se puede aumentar la capacidad antioxidante inicial. En qué medida se produce dependerá de las condiciones de proce-

sado y a variables intrínsecas del alimento (actividad de agua, pH, tiempo, temperatura, disponibilidad de oxígeno). Más interesante resulta la formación a partir de las interacciones químicas, de nuevos compuestos con actividad antioxidante. Ejemplo de ello son los productos de reacciones de Maillard, que a pesar de que son consumidos en grandes cantidades en nuestra dieta todavía se desconocen datos acerca de su efecto en la salud humana lo que será una línea de investigación de futuro.

El tratamiento térmico también produce efectos desiguales sobre la capacidad antioxidante de la matriz alimentaria. Para tratamientos cortos se produce una reducción de la actividad antioxidante total debido a la pérdida de antioxidantes o a la formación de compues-

**FIGURA 4. CORRELACIÓN ENTRE NIVELES DE INGESTA, RIESGO DE INSUFICIENCIA Y RIESGO DE EFECTO ADVERSO.**

**CDE= CANTIDAD DIARIA ESTIMADA; CDR= CANTIDAD DIARIA RECOMENDADA; IM= INGESTA MÁXIMA; IMSEA= INGESTA MÁXIMA SIN EFECTO ADVERSO; IMCEA= INGESTA MÍNIMA CON EFECTO ADVERSO**





materia prima para la obtención de productos estándar que llegan al consumidor, prestando especial atención a la reducción de costes y aumento de la producción. La nueva cadena de producción agroalimentaria, estará condicionada por la introducción de ingredientes funcionales y la mejora en la calidad, elaborando productos intermedios que se utilizarán posteriormente en la fabricación del alimento final que satisfaga la demanda del consumidor.

La introducción de los ingredientes funcionales, en este proceso de innovación en la industria agroalimentaria tiene su origen en los factores expuestos en la tabla 1. En primer lugar la investigación dedicada a éste área de trabajo, que aporta los conocimientos básicos sobre los aspectos nutricionales y funcionales de los ingredientes. El valor añadido de esos ingredientes se utiliza en la industria agroalimentaria como una ventaja competitiva, promocionando los efectos beneficiosos para la salud del consumidor. Otros aspectos no menos importantes son la diversidad de aplicaciones que sean posibles, los grupos de población a los que el producto está dirigido y los aspectos legales. Pero el factor clave a destacar es el papel del diseño y digestibilidad de los alimentos (con características funcionales o no) en el que existe un vacío de información tanto en el ámbito de investigación como de uso en la producción. Aspectos no considerados como los toxicológicos, la dosis adecuada que

tos con propiedades prooxidantes. Un tratamiento térmico prolongado podría minimizar la pérdida e incluso aumentar la originaria capacidad antioxidante. La investigación en este tema debería abordar aspectos como la identificación de nuevos compuestos formados durante el procesado que muestren actividad anti-prooxidante, los mecanismos de reacción responsables de ello, y su efecto en la capacidad antioxidante global. Determinar su biodisponibilidad y acción en sistemas *in vitro* completaría información sobre la contribución de estos nuevos compuestos al binomio alimento-salud.

tecnológica está dando paso a un cambio en la producción y gama de alimentos disponibles, con renovadas propiedades nutricionales y funcionales. Como se indicaba en la introducción, los estudios epidemiológicos demuestran el efecto positivo en la salud humana de ciertos ingredientes de los alimentos, que incluyen no solo las 30 vitaminas y minerales requeridos básicamente en nutrición, sino otros como antioxidantes, AGPI, probióticos etc, ingredientes que son utilizados en la fabricación de alimentos. Para hacer efectiva la potencial aplicación de las características funcionales de los alimentos es necesario que la industria agroalimentaria modifique su cadena de producción. Actualmente ésta elabora la

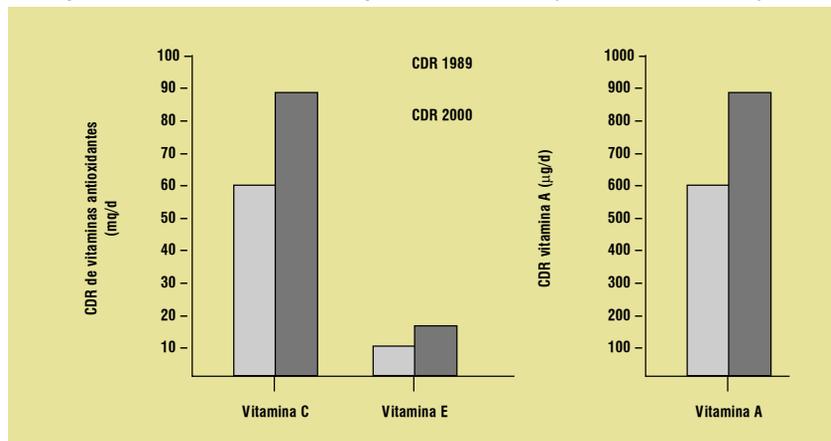
### Diseño de alimentos funcionales

Una mejora en el procesado, modulando tanto el efecto de las condiciones físicas aplicadas como la interacción química que da origen a la funcionalidad

## La producción agroalimentaria condicionará la introducción de alimentos funcionales y su calidad

FIGURA 5

Comparación de los niveles de CDR para vitaminas A, C y E en los años 1989 y 2000.



ejerce el efecto beneficioso en la salud, y la interacción durante la digestión y absorción de los distintos componentes del alimento, son de especial importancia, y sobre los que la investigación debe afrontar una necesaria labor en un futuro inmediato.

Para ello se considera el concepto de funcionalidad desde su sentido fisiológico. Los componentes que forman parte de los alimentos, una vez ingeridos, absorbidos y metabolizados interaccionarán con biomoléculas, interacción de la que se deriva un efecto fisiológico concreto: reducción del colesterol, disminución del azúcar en sangre, regulación de la presión arterial o reducción del riesgo de desarrollar enfermedades degenerati-



vas (cáncer, cardiovasculares, neuronales). Estos efectos que provocan un beneficio en la salud y los ingredientes que los realizan han llevado a la creación del concepto alimento funcional que se define como aquel alimento o ingrediente que tiene un impacto positivo en la salud del individuo más allá de su valor nutritivo, mediante mecanismos de acción que mejoran el estado salud y bienestar. Desde un punto de vista práctico, un alimento funcional puede ser: un *alimento natural*, un alimento del que un ingrediente se ha eliminado, alimento en el que la naturaleza de uno o más ingredientes se ha modificado, alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más componentes se ha modificado, o cualquier combinación entre las posibilidades anteriores. En estos ejemplos se puede apreciar la importancia de la funcionalidad tecnológica.

La estrategia para desarrollar los alimentos funcionales parte de la evaluación de ingredientes considerando sus propiedades. Y en este punto se puede realizar un primera clasificación de ingredientes funcionales: aquellos presentes, o específicamente adicionados, en los alimentos que producen su efecto fisiológico funcional pero que no muestran características nutricionales, y aquellos en los que ambas características (nutrición y funcionalidad) coexisten. La posibilidad de que ingredientes alimentarios clásicos, en los que el aspecto nutricional era el que los definía más claramente, tengan características funcionales es actualmente punta de lanza en investigación y está revolucionando y renovando todos los aspectos relacionados con la nutrición.

### Evaluación de características nutricionales y funcionales

La evaluación de ingredientes con características nutricionales y funcionales se realiza en función de su incremento en la ingesta, estableciendo un paralelismo entre ambas características y el efecto que producen (Figura 3). Desde el punto de vista nutricional se ha establecido la ingesta recomendada para alcanzar la suficiencia nutricional, evitando los efectos negativos derivados de un consumo deficiente así como los niveles de ingesta máximos tolerables, deducidos a partir de los efectos adversos en la salud que produce un consumo superior. Cuando el ingrediente presenta además propiedades funcionales, lo deseable sería que tanto la suficiencia nutricional como la suficiencia fisiológica (derivada a partir del efecto funcional de ese ingrediente) coincidieran, obteniendo un máximo beneficio para la salud. Sin embargo no es esta la situación habitual y existe un desajuste entre el efecto fisiológico funcional y el estatus nutricional adecuado ya que el primero se alcanza normalmente con una ingesta superior a la recomendada, desajuste que se puede ilustrar con ingredientes funcionales y nutricionales como las vitaminas.

Para las vitaminas, reconocidas como elementos básicos en la nutrición, están establecidos aquellos niveles de ingesta adecuados que producen una suficiencia nutricional (Figura 4). Esta cantidad es muy inferior a aquella fijada como nivel de ingesta máximo, a partir del cual su

consumo en exceso provoca efectos adversos en la salud. Entre ambos niveles de ingesta (recomendada y máxima) existe un amplio rango de concentración, en el que evidentemente no se detectan efectos negativos, pero sí efectos fisiológicos positivos para la salud. En ese punto, cuya posición exacta se desconoce, es donde aparecen las características funcio-

### Se considera el concepto de funcionalidad desde su sentido fisiológico

nales de las vitaminas. El descubrimiento de nuevas acciones fisiológicas a dosis superiores que provocan beneficios en la salud, a través de determinados mecanismos en estudio, está produciendo una extensa revisión de la CDR, que como se aprecia en la Figura 5 se ha incrementado significativamente. El caso contrario es el de la vitamina A que se comenta particularmente más adelante. Otro ejemplo es la suplementación de cereales con ácido fólico que se va a promover en Estados Unidos a consecuencia de las acciones positivas que una ingesta superior de esta vitamina ejerce en la salud.

Más interés suscita la investigación acerca de los mecanismos que posibilitan estos beneficios, no solo revisando los ya establecidos, introduciendo en ellos aspectos novedosos, sino también definiendo aquellos que surgen de la interacción de estos nutrientes, con propiedades funcionales, con lípidos, proteínas, ADN, etc como el caso de las vitaminas. La determinación de estos mecanismos de acción sólo es posible, si en esta área de trabajo se es capaz de integrar a grupos con especialidades diferentes para originar una



investigación de carácter multidisciplinar.

El desconocimiento de los niveles de ingesta, que producen los efectos fisiológicos funcionales, de ingredientes básicos en nutrición conduce a la suplementación de la dieta con esos ingredientes. Pero también se pueden producir efectos negativos derivados de una suplementación irregular que muestra deficiencias en tres frentes: excesiva individualización, abuso en la concentración y estado. El primer factor surge cuando se ignora el hecho de que los ingredientes que consumimos se integran en un complejo sistema metabólico en el que muchas de las acciones están concatenadas y requieren la presencia de varios elementos. El ejemplo más claro es el sistema de antioxidantes de naturaleza bifásica (hidrofílica e hidrofóbica) que implica a diferentes compuestos. La carencia de alguno de ellos provoca irregularidades en el desarrollo de la actividad antioxidante del conjunto. Para los carotenoides se está demostrando que el desarrollo de su acción antioxidante presenta un flujo en cadena donde el potencial redox pasa de unos a otros hasta llegar a carotenos que frenan el proceso autooxidativo sin pro-

Pero no sólo a través de mecanismos redox se producen efectos negativos a escala fisiológica sino también mediante interacciones y procesos más complejos que están actualmente en fase de estudio. Un ejemplo de ello son las rutas de señalización que producen efectos muy variados en el ciclo de diferenciación y proliferación celular y su modulación por los retinoides. Cuando se genera un exceso de estos compuestos o bien otros similares estructuralmente, como los derivados a partir del proceso autooxidativo de carotenoides, se interfiere en las rutas de señalización celular lo que puede tener consecuencias negativas. La validez de esta hipótesis podría establecer la existencia de grupos de población sensibles a las deficiencias de una suplementación irregular como los fumadores. Todo esto lleva al esfuerzo necesario que hay que realizar para concretar los niveles de ingesta adecuados para grupos de población específicos. En el caso de la vitamina A, por ejemplo, recientes estudios demuestran que existe una correlación entre su ingesta excesiva y un aumento del riesgo de fractura de cadera en la tercera edad. Algunos autores establecen hi-

los carotenoides en los que se pueden distinguir elementos que pertenecen a uno u otro grupo. Aquellos carotenoides con actividad de provitamina A entrarían en el primero ya que además de mostrar dicha actividad, su estructura química les permite desarrollar otras acciones biológicas como la comunicación intercelular y la potenciación del sistema inmune. Estas dos acciones son las que caracterizan al resto de carotenoides que no presentan actividad provitamínica y que serían ingredientes estrictamente funcionales. Entre ellos tienen una especial relevancia licopeno, zeaxanteno luteína y astaxanteno. La investigación en estos componentes está evolucionando a través del estudio de las acciones de los metabolitos oxidados. Esta línea tiene su origen cuando se descubrió que la actividad de la enzima 15,15'- $\beta$ -caroteno dioxigenasa produce roturas en otros puntos de la cadena, apareciendo metabolitos oxidados que tienen acciones biológicas diversas y que puso de manifiesto el desconocimiento que se tiene sobre el metabolismo de carotenoides. Para luteína y zeaxanteno, su presencia en el pigmento macular es un factor que disminuye la degeneración macular relacionada con la edad, la causa líder de ceguera en los países occidentales. En otros casos como licopeno y astaxanteno estos metabolitos están implicados en el aumento de la comunicación intercelular y su presencia se ha empezado a detectar en plasma.

## Efectos fisiológicos: reducción del colesterol, disminución del azúcar en sangre, etc.

vocar daño biológico en otras moléculas de su entorno. Si se rompe el flujo se regenera el potencial oxidativo. De igual forma para otros antioxidantes como polifenoles, ácido ascórbico y vitamina E también se conoce la necesidad de complementación entre ellos para evitar los riesgos derivados de su acción.

pótesis sobre un antagonismo con la vitamina D. De hecho las recomendaciones actuales sobre la ingesta adecuada de vitamina A son ligeramente inferiores a las establecidas en 1989.

En un punto intermedio entre la valoración de ingredientes nutri-funcionales y estrictamente funcionales se encontrarían ciertos grupos de compuestos como

En cuanto a la evaluación de ingredientes estrictamente funcionales, originarios del concepto de alimento funcional en la década de los 80, no cabe duda que sigue siendo un terreno en ex-

pansión. Generalmente, su presencia en los alimentos es obviada cuando se evalúan datos epidemiológicos y estudios de intervención en los que los efectos beneficiosos del consumo de ciertos alimentos se atribuyen frecuentemente a otros componentes que los caracterizan. Particularmente, quisiera destacar a los glucosinolatos como ingredientes funcionales a los que en un futuro se debería prestar más atención, presentes en vegetales del género *brassica* muy consumidos en nuestra dieta. Estos componentes están reconocidos como anticancerígenos cuyo mecanismo de acción podría ser la inducción de apoptosis en células tumorales. Su determinación en vegetales, estabilidad y modificaciones estructurales durante el procesado, biodisponibilidad y mecanismo de acción biológica son aspectos en los que en estos componentes, todavía queda bastante trabajo de investigación. Por tanto, la lista de ingredientes estrictamente funcionales, es decir aquellos que específicamente producen un efecto saludable en el consumidor, podrá aumentar en un futuro. Los problemas particulares que presentan estos ingredientes son el desconocimiento de las dosis a añadir en

los alimentos que producen el efecto fisiológico deseado, y el reducido rango de concentración entre la ingesta segura y los niveles máximos tolerables (en la mayoría de los casos también desconocidos), por lo que el riesgo de efectos adversos puede ser elevado. La toxicología tiene un campo enorme de trabajo, que debería afrontar con urgencia. La industria agroalimentaria europea maneja 650 billones de € y emplea a más de 3 millones de personas. La enorme presión para el desarrollo de nuevos productos y su corto ciclo en el mercado se contraponen a los estudios epidemiológicos y toxicológicos que resultan caros y prolongados. Es habitual que en algunos productos funcionales todavía no esté claro cuál es su efecto, qué ingrediente lo ejerce y a qué grupo de población debe ir dirigido.

Puesto que se ha establecido una distinción entre ingredientes nutri-funcionales y estrictamente funcionales también se están comenzando a fijar las distinciones entre los diversos tipos de alimentos, con características beneficiosas para la salud, que existen en el mercado. Sólo el uso de una terminología adecuada que tenga en cuenta las diferencias y

similitudes entre unos tipos de alimentos y otros, puede aclarar y orientar la investigación a realizar en esta área teniendo en cuenta factores como el carácter de la sustancia, el efecto fisiológico que realiza, presencia en el alimento, grupo de población al que va dirigido y procesado. El objetivo será siempre el mismo: demostrar los efectos beneficiosos que para la salud tiene el consumo de ciertos ingredientes.

En paralelo a esta distinción entre ingredientes se establece también una distinción entre los efectos beneficiosos que producen: tipo A y tipo B. Ambos están basados en observaciones biológicas, datos epidemiológicos y estudios de intervención. Los efectos tipo A son aquellos basados en ingredientes o alimentos que proporcionan efectos específicos en la salud sin incluir funciones nutricionales. Teniendo en cuenta las dificultades sobre estos ingredientes, como el desconocimiento de niveles de ingesta adecuados máximos tolerables y toxicidad, la estrategia de investigación utilizada en esta línea de trabajo es emplear el alimento como base para realizar el estudio. Los efectos tipo B están basados en ingredientes o alimentos incluidos en la dieta habitual y que reducen el riesgo de desarrollar una enfermedad específica, más allá de sus propiedades nutricionales. El conocimiento que ya se tiene sobre estos ingredientes permite que se pueda trabajar directamente con ellos. En estos casos es donde se puede establecer una más directa correlación entre la estructura del ingrediente y su función. ■



**CENTRO DEL CSIC:** Instituto de la Grasa. Avda. Padre García Tejero, 4. 41012 Sevilla. Web: [www.ig.csic.es](http://www.ig.csic.es)

**Departamento:** Biotecnología de Alimentos. **Nombre Investigador:** María Isabel Minguez Mosquera (Profesor de Investigación). E-mail: [minguez@cica.es](mailto:minguez@cica.es)

**Tendencias de Investigación:**

1. Biosíntesis y catabolismo de pigmentos clorofílicos y carotenoides durante el desarrollo y maduración de los frutos.
2. Transformaciones de pigmentos durante el procesado y almacenamiento de alimentos de origen vegetal.
3. Influencia de la estructura y entorno bioquímico y físico-químico de clorofilas y carotenoides en sus propiedades antioxidantes y nutricionales.

## Referencias

Baba S, Furuta T, Fujioka M, Goromaru T. *Studies on drug metabolism by use of isotopes*. XXVII. Urinary metabolites of rutin in rats and role of intestinal microflora in the metabolism of rutin. *J. Pharm. Sci.* 1983 72 1155-1158.

Bokkenheuser BD, Shackleton CHL, Wintler J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochemistry* 248 1987 953-956.

Bornscheuer UT, Adamczak M and Soumanou MM. Lipase-catalysed synthesis of modified lipids. In *Lipids for functional foods and nutraceuticals*. Gunstone FD ed. The Oily Press Brigdwater, England 2003. Chapter 6 149-182.

Bosscher D, Caillie-Bertrand M, Cauwenbergh R, Deelstra H. Availabilities of calcium, iron, and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. *Nutrition* 19 2003 641-645.

Diederich A and Edmadfa I. Über die physiologische bedeutung der phytosterine. *Ernährungs-Umschau* 36 1989 436-441.

European Commission. A request for the safety assessment of the use of phytosterol esters in yellow fat spreads. 6 April 2000.

Ling WH and Jones PJ. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences* 57 1995 195-206.

McGuigan S. Total health care expenditure in the UK, in OHE compendium of health statistics. London; Office of Health Economics; 1997, 14.

Milner JA. Functional foods: the US perspective. *American Journal of Clinical Nutrition* 71 2000 1654-1659.

Ottley C. Nutritional effects of new processing technologies. *Trends in Food Science and Technology* 11 2000 422-425.

Roberfroid MB, Delzene N. Dietary fructans. *Annu Rev Nutr* 18 1998 117-143.

Roberfroid MB. Fructo-oligosaccharide malabsorption: benefit for gastrointestinal functions. *Curr Opin Gastroenterol* 16 2000 173-177.

Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ. *Handbook of vitamins*. 3rd edition Marcel Dekker New York 2001.

Slavin J. Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrient databases. *Journal of Food Composition and Analysis* 16 2003 287-291.

United Nations. 2002. Population Ageing [www.un.org/esa/population](http://www.un.org/esa/population).

Verrips T, Warmoeskerken MMCG and Post JA. General introduction to the importance of genomics in food biotechnology and nutrition. *Current Opinion in Biotechnology* 12 2001 483-487.

# Nuevos aceites de girasol: el futuro para una industria alimentaria más saludable

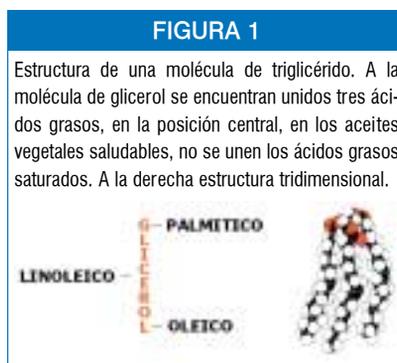
*Las grasas y aceites usados en alimentación, se destinan tanto a consumo directo, como en la preparación de alimentos en casa, en restaurantes, etc. Y a uso en la industria alimentaria, en la preparación de margarinas, conservas, precocinados, bollería, pastelería, etc.*

---

ENRIQUE MARTÍNEZ FORCE Y RAFAEL GARCÉS MANCHEÑO. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.  
INSTITUTO DE LA GRASA (SEVILLA).



Los aceites están constituidos casi exclusivamente por triglicéridos, conteniendo además cantidades pequeñas de diglicéridos, lípidos polares, insaponificables, ácidos grasos libres, etc. Los triglicéridos (para más información ver figura 1) suponen más del 95% del total del aceite, estando formados por una molécula de glicerol a la que están unidos tres ácidos grasos, uno de ellos en la posición central de la molécula de glicerol y los otros dos en los extremos. Los ácidos grasos más habituales que se encuentran formando estos triglicéridos son: palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico (ver tabla 1), a estos hay que añadir otros que se encuentran sólo en algunos aceites como el palmitoleico (aceite de oliva) y ácidos grasos de longitud de cadena media de 12 y 14 carbonos en su molécula que se suelen encontrar en grasas animales y coco (ver tabla 2). El destino final de cada tipo de aceite está definido por sus propiedades físicas y químicas, que dependen de la composición de ácidos grasos. La diferencia entre aceites y grasas se debe a la propiedad de ser líquido o sólido a temperatura ambiente. Así, cuando contengan valores altos de ácidos palmítico o esteárico (ácidos grasos saturados) en los triglicéridos serán sólidas a temperatura ambiente y en el caso contrario cuando estén constituidas mayoritariamente por los ácidos oleico, linoleico o linolénico y con contenido bajo de ácidos grasos saturados serán líquidos. Un factor muy importante para identificar el origen de un aceite es la posición en que se encuentran los ácidos grasos saturados en la molécula de triglicérido, así los aceites o grasas de origen animal tienen la mayoría de los ácidos grasos saturados situados en la posi-



ción central del triglicérido, aunque algunos aceites vegetales de origen tropical como la palma tienen alrededor de un 15% de saturados en esa posición, los aceites normales vegetales no llegan nunca al 4% (ver tabla 3).

En el caso de la industria de margarinas, pastelería o bollería el aceite que necesitan debe tener una plasticidad adecuada a cada uso y, por tanto, valores altos de palmítico y/o esteárico, además de no tener ácido linolénico para evitar los problemas de falta de estabilidad oxidativa (ver tabla 2). En el pasado la industria empleaba grasas animales como grasas plásticas para fabricar estos productos, pero debido al efecto negativo de estas grasas sobre los niveles de colesterol, se fueron sustituyendo por aceites vegetales que al ser líquidos a temperatura ambiente tienen que ser hidrogenados, siendo esta la única opción que existía en ese momento al no haber una fuente natural vegetal de grasas plásticas para la industria. La hidrogenación es un proceso químico que mediante el uso de un catalizador, normalmente un metal pesado, e hidrógeno convierte los ácidos grasos insaturados en saturados. Esta transforma-



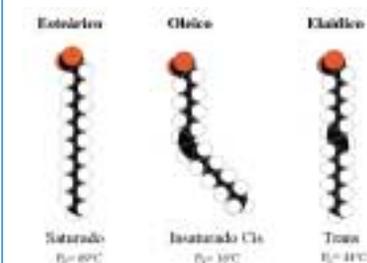
**TABLA 1: ÁCIDOS GRASOS ENCONTRADOS NORMALMENTE EN ACEITES USADOS EN ALIMENTACIÓN**

Ácido Graso	Estado	Dobles Enlaces	Abreviatura*
Mirístico	Sólido	0	14:0
Palmitico	Sólido	0	16:0
Palmitoleico	Líquido	1	16:1
Esteárico	Sólido	0	18:0
Oleico	Líquido	1	18:1
Linoleico	Líquido	2	18:2
Linolénico	Líquido	3	18:3

\* Se presenta como, Nº de carbonos : Nº de dobles enlaces.

**FIGURA 2**

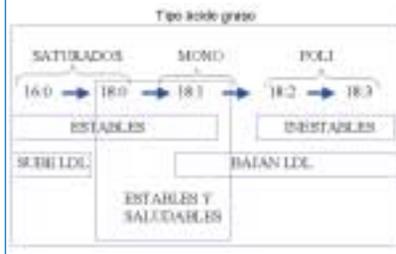
Estructura de los ácidos grasos. El eláidico, que es el isómero trans del oleico, se parece más a un saturado que al oleico.





**FIGURA 3**

Los ácidos grasos saturados y el oleico son estables frente a la oxidación, mientras que el linoleico y linolénico no lo son. Con respecto a su efecto sobre los niveles de colesterol el palmítico sube el colesterol "malo" LDL, el esteárico no lo modifica y los insaturados lo bajan. En resumen son estables y saludables el esteárico y el oleico.



ción al mismo tiempo que eleva el contenido de ácidos grasos saturados cambia de posición dentro de la molécula los dobles enlaces en los ácidos grasos insaturados y los gira para producir sus isómeros *trans* correspondientes. Al menos 20 isómeros *trans* distintos se producen por la hidrogenación. Estos isómeros son ácidos grasos que no se encuentran en animales o plantas y que por su estructura suelen ser sólidos a temperatura ambiente, así el ácido elaidico, isómero *trans* del ácido oleico, es sólido a temperatura ambiente y no funde hasta los 44°C, en cambio el ácido oleico sólo lo es hasta los 16°C (ver figura 2). La hidrogenación al ser un proceso químico inespecífico que convierte en saturados todos los ácidos grasos de la molécula de triglicérido, y como en los aceites vegetales el mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados están en la posición central del triglicérido, es ahí donde actúa mayoritariamente, incrementando, específicamente en esa

posición la cantidad de saturados y de isómeros *trans*. Desde ese momento estos aceites vegetales hidrogenados se parecen más a grasas de origen animal que a los aceites vegetales originales, al tener un porcentaje superior de saturados en posición central del triglicérido que los aceites vegetales. Desde el punto de vista epidemiológico existe una buena correlación entre los incrementos en el consumo de aceites vegetales parcialmente hidrogenados y el aumento de problemas cardiovasculares y de infartos en los países donde ha sido estudiado. Estudios epidemiológicos en los E.E.U.U. estiman que al menos ocurren 30.000 muertes por infartos al año debidas al consumo de aceites vegetales parcialmente hidrogenados. Además hasta hora en el etiquetado estos ácidos grasos *trans* se incluyen dentro del contenido total de insaturados, de manera que el consumidor esta doblemente confundido, piensa que consume insaturados, para evitar los saturados, pero lo que de verdad esta consumiendo son isómeros *trans* más perjudiciales que los propios saturados. Esta situación esta cambiando y a partir de enero de 2006 en EE.UU. se debe indicar el contenido de *trans* según una nueva norma de la FDA.

El efecto sobre los niveles de colesterol de los distintos ácidos grasos depende del ácido graso y de la posición que ocupe en la molécula de triglicérido. Así, podemos decir que, igual que no todo el colesterol es "malo", sino que existen unos con efectos positivos sobre la salud, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y otros con efectos negativos, lipoproteínas de baja densidad (LDL), también existen ácidos grasos saturados que por no afectar a los niveles de estas lipoproteínas son

**TABLA 2: COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS ACEITES O GRASAS MÁS IMPORTANTES**

Aceite	Medios	Palmítico	Palmitoleico	Esteárico	Oleico	Linoleico	Linolénico
Oliva		14	1	3	71	10	
Soja		11		3	21	55	8
Girasol		7		5	25	65	
Palma	1	45		5	39	9	
Cacao		26		34	35	3	
Cerdo	2	25	3	12	45	10	
Mantequilla	17	28	2	12	30	2	1

neutros para los niveles de colesterol, podemos citar como ejemplo el ácido esteárico. Este ácido graso siempre ha sido considerado neutro con respecto a los niveles de colesterol por varias razones, entre ellas podemos resaltar que: 1) no aumenta la concentración del colesterol “malo”, colesterol LDL, 2) se *transforma* muy rápidamente en el hígado a ácido oleico y 3) posee una incorporación preferencial en lípidos polares en lugar de en colesterol o triglicéridos. En cuanto a los ácidos grasos *trans* producidos durante la hidrogenación, el efecto sobre los niveles de colesterol es el peor que se puede encontrar, aumentan el colesterol malo (LDL) y disminuyen el bueno (HDL). Un resumen de las propiedades químicas y nutricionales de los ácidos grasos se muestra en la figura 3.

Otro factor muy importante en cuanto al efecto de los ácidos grasos saturados sobre los niveles de colesterol en sangre es la capacidad del cuerpo para asimilarlos. Los triglicéridos, componentes mayoritarios de los aceites, se degradan durante la digestión por la acción de las lipasas, enzimas secretadas mayoritariamente por el páncreas, liberando los ácidos grasos situados en las posiciones extremas de la molécula de triglicérido, dejando el ácido graso central unido a la molécula de glicerol, esta molécula denominada monoglicérido se absorbe fácilmente a través de la pared intestinal, no ocurre lo mismo con los ácidos grasos liberados. Si estos son saturados de cadena larga suelen formar sales cálcicas o magnésicas que los hacen insolubles y se excretan en las heces, pero si son insaturados sí se incorporan bien al fluido sanguíneo. En este punto es muy importante recordar que los ácidos grasos saturados de los aceites de girasol, cacao, oliva, etc.



están siempre colocados en las posiciones externas de la molécula de triglicérido, en cambio en el caso de la manteca de cerdo, la gran mayoría está en la posición central y en palma alrededor del 13% se encuentra en esta posición (ver tabla 3). Esto hace que los ácidos grasos saturados de cadena larga no sean adecuadamente asimilados y se excreten, disminuyendo su posible efecto sobre los niveles de colesterol, siempre que se encuentren en aceites vegetales del tipo girasol u oliva. En cambio, en las grasas animales después de la acción de las lipasas los ácidos grasos saturados quedan unidos a la molécula de glicerol formando un monoglicérido, que es perfecta-

mente transportado al torrente sanguíneo. Con respecto a los efectos nutricionales de una grasa y su contenido de saturados, el caso que podemos llamar extremo es el de la manteca de cacao. Todos los investigadores que la han estudiado están de acuerdo en que tiene un efecto neutro sobre los niveles de colesterol, y aquí viene la paradoja, tiene un 60% de ácidos grasos saturados (25% de ácido palmítico y 35% de ácido esteárico) siendo el resto mayoritariamente ácido oleico (35%) y ácido linoleico (3%). Podemos concluir que no sólo es importante, con respecto al efecto sobre los niveles de los distintos tipos de colesterol (HDL y LDL), la composición de ácidos grasos de

FIGURA 4

Tratamiento mutagénico de semillas de girasol y selección de mutantes con modificaciones en los ácidos grasos de su aceite.

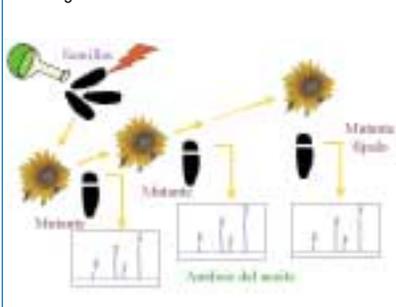


TABLA 3: PORCENTAJE DE SATURADOS EN EL CENTRO DEL TRIGLICÉRIDO (TAG %)

Aceites	Mirístico	Palmítico	Esteárico	Total
Oliva		1,4	0,5	1,9
Girasol Normal		0,4	0,4	0,8
Girasol Esteárico		0,4	1,4	1,8
Girasol Palmítico		1,3	0,4	1,7
Cacao		1,5	2,0	3,5
Palma		11	2	13
Manteca de Cerdo	4	72	4	80



una grasa o aceite natural, sino que se debe considerar también la posición que ocupen cada uno de ellos en la molécula de triglicérido, siendo en este caso mucho más saludable el aceite o grasa vegetal.

Para resolver el problema del uso de grasas vegetales hidrogenadas o de origen animal, se ha desarrollado un proyecto de investigación con el fin de obtener aceites naturales de girasol que pudieran ser usados directamente por la industria alimentaria para la fabricación de margarina y productos afines sin necesidad de manipulación química. Las nuevas líneas han sido seleccionadas por métodos clásicos, sin la aplicación de técnicas de ingeniería genética, igual que el

mutante alto oleico de girasol cuyo aceite esta en el mercado español desde el año 1992. En este proyecto ha participado personal investigador del Instituto de Agricultura Sostenible de Córdoba, Instituto de la Grasa de Sevilla, ambos pertenecientes al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y de la empresa Advanta Ibérica (Marchena). El proyecto comenzó con el desarrollo y puesta a punto de métodos de análisis rápidos y fiables de la composición de ácidos grasos de semillas, métodos mutagénicos eficientes en semilla, cultivo adecuado de semillas mutantes en campo, recogida individual de capítulos, etc. Por todo esto hizo falta poner en marcha el equipo in-

vestigador multidisciplinar de biólogos, bioquímicos e ingenieros agrónomos.

Se hicieron tratamientos mutagénicos en unas 20 líneas de girasol de distintos orígenes genéticos. Como agentes mutagénicos se han usado azida sódica, metano sulfonato de etilo y rayos X. Las semillas tratadas se sembraron en el campo y sus capítulos fueron cosechados individualmente. Las semillas cosechadas se analizaron utilizando la técnica de la media semilla, método que consiste en cortar y analizar un trozo de la parte final de la semilla, guardando el otro trozo que contiene el embrión. Si el análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases mostraba algo interesante el trozo guardado se germinaba y cultivaba. Para confirmar que esa semilla tenía la composición apropiada y heredable este proceso se repitió durante cuatro generaciones, un esquema del proceso de mutagénesis y selección se muestra en la figura 4. Un total de 30.000 medias semillas fueron analizadas y, de entre ellas, 100 seleccionadas como posibles mutantes. Al final del proceso sólo se terminaron confirmando seis, cuatro cuyo aceite tenía un mayor contenido de ácido esteárico y dos con mayor contenido de ácido palmítico.

Sólo en dos de los fondos genéticos utilizados se encontraron líneas mutantes con la particularidad de que todos los mutantes del tipo alto esteárico se seleccionaron en uno de estos fondos genéticos y los alto palmítico en el otro. De los dos mutantes alto palmítico obtenidos, uno de ellos es también alto oleico debido a que la línea originalmente mutagenizada era alto oleico. Tras recombinación de los nuevos caracteres y selección se obtuvieron una serie de nuevas líneas de girasol. En la tabla 4 se muestran las principales líneas obtenidas en comparación con el

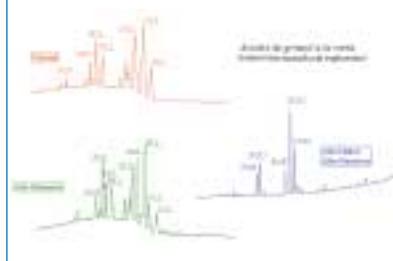
**TABLA 4: COMPOSICIÓN ÁCIDOS GRASOS ACEITES DE GIRASOL ACTUALES Y NUEVOS (%)**

Tipo de Girasol	Palmítico	Palmitoleico	Esteárico	Oleico	Linoleico
Normal (Linoleico)	7		5	30	58
Alto oleico	5		4	88	3
Alto Linoleico y Palmítico	33	2	10	7	48
Alto Oleico y Palmítico	30	2	7	51	10
Alto Esteárico I	5		27	15	53
Alto Esteárico II	7		35	8	50
Medio Esteárico	5		14	19	62
Alto Oleico y Esteárico	6		24	62	8

\* Aceites actualmente en el mercado.

**FIGURA 5**

Cromatograma de triglicéridos de los aceites de girasol normal, alto esteárico y alto oleico alto esteárico.





**FIGURA 6**

Fotografía de aceite de girasol normal (líquido) y uno de los nuevos tipos alto saturado (sólido).



girasol normal y el alto oleico. Los estudios genéticos efectuados sobre los mutantes han demostrado que, en todos los casos, al menos dos genes son necesarios para controlar la nueva característica. Cruces de semillas mutantes con semillas de las líneas de las que se han obtenido los mutantes han mostrado sólo diferencia en un gen, por lo tanto los otros genes necesarios para la expresión del carácter mutante estaban ya presentes en la línea original antes de ser mutada, demostrando la importancia de la elección del tipo de semilla inicial a la hora de poder obtener un mutante determinado. Entre las líneas obtenidas son de destacar las líneas alto palmítico, una de ellas es también alto oleico y la otra normal, o sea con ácido linoleico como mayoritario, y las líneas con alto contenido en ácido esteárico. Para tener todas las opciones posibles era necesario obtener también una línea como esta última pero además alto oleico. Para ello se cruzó la línea mutante alto esteárico y una alto oleico, y como resultado se ha obtenido una línea doble mutante alto esteárico y alto oleico, similar a la línea alto palmítico y alto oleico existente.

Posteriormente estos mutantes han sido estudiados comprobando que el carácter alto saturado sólo se expresa en la semilla, siendo el resto de la planta normal y por tanto utilizable para su cultivo agronómico. Se han identificado los pasos en la ruta de síntesis de los ácidos grasos modificado y se han caracterizado los lípidos que forman el aceite de estas nuevas líneas de girasol, es importante destacar que aun teniendo un elevado

contenido de saturados estos no se encuentran en la posición central del triglicérido (ver tabla 3), igual que ocurre con el girasol normal, la oliva o el cacao, lo contrario a lo que ocurre en la palma o las grasas vegetales, tal y como indicamos anteriormente.

Estos nuevos aceites tienen una composición de triglicéridos distintas a los del girasol normal, lo que los hace adecuados para las necesidades de la industria (ver figuras 5 y 6). La línea alto oleico alto palmítico contiene sobre todo triglicéridos formados con los ácidos oleico y palmítico lo que lo hace un aceite muy resistente a la oxidación, aproximadamente el doble que el aceite alto oleico de girasol o un aceite refinado de oliva, que a su vez son bastante mas resistentes a la termo oxidación que el aceite normal de girasol. Siendo este un aceite con propiedades magnificas para la fritura y todos los procesos industriales donde el alimento sea calentado y después almacenado, pudiendo reducir los costos de envasado y aumentando la vida media del producto en el mercado. Las líneas alto esteárico contienen un porcentaje considerable de triglicéridos con dos moléculas de ácido esteárico, en unos casos con ácido linoleico en el centro del triglicérido y en otros con ácido oleico, lo que los hace adecuados para la fabricación de margarinas. Con grasas constituidas por estos tipos de triglicéridos y teniendo en cuenta el efecto sobre los niveles de colesterol de estos ácidos grasos y que además no contienen ácidos saturados en la posición central del triglicérido, podemos decir que se

puede fabricar por primera vez una margarina realmente vegetal y saludable.

Concluyendo podemos decir que estos nuevos aceites de girasol, unidos a los dos actuales (normal y alto oleico), y que hemos desarrollado en respuesta al deseo de la industria alimentaria de usar cada día productos mas saludable, pueden cubrir los requerimientos de la industria alimentaria sin necesidad de manipulación química, con la aspiración de aumentar la calidad de vida de los consumidores. ■

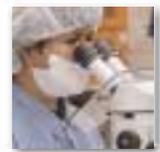
**AgroCSIC**

**CENTRO DEL CSIC:** Instituto de la Grasa.  
**Departamento:** Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales.  
**Nombre Investigador:** Rafael Garcés Mancheño.  
**E-mail:** rgarcés@cica.es  
**Tendencias de Investigación:**

La actividad del grupo se orienta al estudio y selección de material vegetal de girasol con modificaciones en la composición en ácidos grasos y en triglicéridos de su aceite, principalmente en lo que respecta a recombinación de caracteres mutantes obtenidos en un programa de mutagénesis realizado en proyectos anteriores y al estudio de los mecanismos bioquímicos y de control genético de la biosíntesis de lípidos en la semilla de girasol. Los nuevos aceites obtenidos tienen una composición de ácidos grasos adecuada para los diversos usos de las industrias alimentaria (margarinas, etc.) y petroquímica (biolubricantes). La información necesaria para la consecución de estos objetivos se obtiene a partir de los estudios, en la semilla de girasol, de los mecanismos bioquímicos y moleculares que controlan la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos.



# Instituto *de* Fermentaciones industriales



Complementos alimenticios  
antioxidantes:  
beneficios y precauciones



# Complementos alimenticios antioxidantes: beneficios y precauciones

BEGOÑA BARTOLOMÉ SUALDEA. INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES, CSIC. JUAN DE LA CIERVA, 3. 28006 MADRID.



*Actualmente, los complementos alimenticios con “propiedades antioxidantes” constituyen un mercado en alza. A sus ingredientes activos (principalmente, vitaminas E y C, carotenoides y polifenoles) se les atribuyen efectos fisiológicos beneficiosos que disminuyen el riesgo de padecer enfermedades crónicas, aunque aún no se han establecido exactamente ni las cantidades a ingerir ni las combinaciones de antioxidantes más efectivas. El marco legal de comercialización de estos productos está poco definido, no obstante desde la Comisión Europea se está trabajando en este sentido. En la actualidad se investigan nuevas fuentes de alimentos/subproductos de origen vegetal a emplear como ingredientes antioxidantes, así como procedimientos de estandarización y evaluación de sus propiedades.*

## ¿Qué son los complementos alimenticios?

Se entiende por complementos alimenticios “los productos alimenticios cuyo fin sea complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados de forma que permitan una dosificación determinada del producto y que deban tomarse en pequeñas cantidades unitarias” (Real Decreto 1275/2003).

## ¿Porqué complementar nuestra dieta con antioxidantes?

El estrés oxidativo o sobrecarga oxidativa aparece implicada en el desarrollo de multitud de enfermedades degenerativas, como el cáncer, la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer, y en el proceso mismo de envejecimiento; no obstante, los mecanismos etiopatogénicos no se conocen completamente. La ingesta de antioxidantes, es decir, de compuestos que retrasan o inhiben la oxidación de los substratos oxidables a nivel fisiológico (lípidos, proteínas y ADN), aumentaría las defensas del organismo frente al estrés oxidativo, y por tanto, frente a las enfermedades crónicas. De hecho, se sabe que las poblaciones que siguen dietas ricas en frutas y verduras tienen menos

riesgo de padecer estas enfermedades, lo que se atribuye a la presencia en estos alimentos de compuestos con determinadas “acciones biológicas”, como la actividad antioxidante.

Entre los antioxidantes más importantes presentes en los alimentos citamos las vitaminas C y E, los carotenoides, y los polifenoles. Se ha demostrado que estos compuestos son efectivos frente a la oxidación de lípidos, proteínas y ADN en diversos sistemas *in vitro*. También se ha encontrado una relación inversa entre los niveles de antioxidantes en la ingesta y/o concentraciones de antioxidantes en plasma con la incidencia de enfermedades crónicas. En humanos, algunos estudios de intervención /suplementación con antioxidantes confirman la relación causa-efecto entre el antioxidante y la enfermedad, pero otros no indican ningún efecto. A modo de ejemplo, citamos el caso de la vitamina E y las enfermedades cardiovasculares. Numerosos estudios han confirmado una relación inversa entre la concentración de vitamina E en plasma y la incidencia de estas enfermedades. La vitamina E y otros antioxidantes podrían inhibir la oxidación de las LDL, hecho que parece clave en la iniciación y en la progresión de la aterosclerosis. Aunque existe alguna controversia sobre el posible

efecto beneficioso de los suplementos de vitamina E, estudios recientes muestran, sin embargo, una disminución de la incidencia de eventos cardiovasculares con la administración conjunta de vitaminas E y C, lo que pone de manifiesto los efectos sinérgicos entre antioxidantes. Actualmente se están llevando a cabo numerosas investigaciones en este tema, para establecer las dosis y combinaciones de antioxidantes más efectivas, así como los mecanismos de actuación.

En algunos estudios se han visto también las precauciones a tener en cuenta a la hora de complementar nuestra dieta con antioxidantes. Por ejemplo, algunos antioxidantes, en elevada concentración,



pueden generar un efecto pro-oxidante. Así, la administración de  $\beta$ -caroteno a fumadores aumenta la incidencia de cáncer de pulmón. De la misma forma, la administración de vitamina E disminuye la respuesta aguda de los neutrófilos durante el ejercicio físico en población anciana. Aunque el exceso de vitamina C se elimina por la orina, una dosis alta de esta vitamina puede producir diarrea y otros desórdenes intestinales en personas predispuestas a ello. De todo esto se deduce que la administración de antioxidantes puede ser efectiva a largo plazo en la prevención de enfermedades crónicas, aunque debe realizarse atendiendo a las peculiaridades de cada persona.

***¿Cuál es la formulación de los complementos alimenticios antioxidantes?***

En la formulación de estos preparados se incluyen compuestos sintéticos (especialmente vitaminas) y extractos de plantas, junto con distintos excipientes. Entre los extractos de plantas utilizados en la fabricación de estos suplementos, cabe citar los obtenidos de plantas aromáticas (especialmente romero), pepitas de uva, granos de trigo, tomate, cítricos, propóleos, aceituna, etc. A modo de ejemplo, la tabla 1 recoge la composición de algunos complementos alimenticios antioxidantes.

***¿Qué legislación se aplica en la formulación de los complementos?***

Con el fin de regular la comercialización de los complementos alimenticios, el Parlamento Europeo y el Consejo adoptaron la Directiva 2002/46/CE. Esta directiva establece normas específicas para las vitaminas y minerales utilizados como ingredientes de complementos alimenticios. Queda pendiente, según se recoge en dicha directiva, la adopción de normas específicas relativas a los nutrientes (que no sean vitaminas o minerales), y a otras sustancias con un efecto nutricional o fisiológico (extractos de plantas, subproductos agroalimentarios, etc.). Esta directiva europea está incorporada en nuestro ordenamiento jurídico mediante el Real Decreto 1275/2003.

Otro aspecto exento de legislación es la publicidad y promoción de los complementos alimenticios. Actualmente, la Comisión Europea ha elaborado una propuesta para regular los “reclamos publicitarios relativos a la salud” de los alimentos/complementos, con la idea de que se puedan utilizar sólo los que están probados científicamente. En España, en espera de estas nuevas normas, los complementos alimenticios antioxidantes deben ajustarse, de forma general, a las normas sobre publicidad y promoción (Real Decreto 1907/1996), y sobre etiquetado y presentación de los productos alimentarios (Real Decreto 1334/1999), que, entre otras, establece que “el etiquetado y las modalidades de realizarlo no deberán ser de naturaleza que induzcan a error al comprador, especialmente...d) atribuyendo a un producto alimenticio propiedades preventivas, terapéuticas o curativas de una enfermedad humana, ni mencionando dichas propiedades” (art. 4.1).

**¿Cómo se mide la “actividad antioxidante” de los complementos?**

Existen numerosos métodos de medida de la actividad antioxidante aplicados a compuestos puros y extractos/fracciones de plantas y alimentos de origen vegetal. Sin



merciales estudiados, aunque se observa cierta variabilidad entre complementos (de 20 a 200 según el método) y entre métodos (lo cual es lógico si tenemos en cuenta que cada método se refiere a distinto sustrato oxidable). Habitualmente, la calidad de los complementos antioxidantes se establece en función de la concentración de los componentes antioxidantes mayoritarios, aun sabiendo que en las propiedades antioxidantes del producto total pueden influir otros compuestos minoritarios actuando en sinergismo o no, con los anteriores. En nuestra opinión, la medida de la capacidad antioxidante de los in-

gredientes y de los complementos alimentarios antioxidantes permitiría estandarizar éstos y fijar las dosis recomendables con mayor precisión.

embargo, pocos de ellos se han utilizado en la evaluación de la actividad antioxidante de complementos alimenticios. En nuestro laboratorio, estamos llevando a cabo un estudio sobre la aplicación de distintos métodos de medida de actividad antioxidante a estos complementos: neutralización del radical DPPH, neutralización de radicales peroxilo (método ORAC), inhibición de la autooxidación de lípidos (método del linoleato de metilo), e inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Se ha comprobado que todos estos métodos son aplicables a los complementos antioxidantes. Los resultados también indican una buena actividad antioxidante *in vitro* de los complementos antioxidantes co-

**¿Cuáles son las tendencias futuras de los ingredientes/complementos antioxidantes?**

Los complementos dietéticos antioxidantes son una buena alternativa para aquellas personas con poca disposición al consumo de frutas y verduras, o para aquellas con “deficiencia antioxidante” probada. Cabe esperar, por tanto, que el mercado de estos productos se mantenga en alza.

En la actualidad se están llevando a cabo numerosas investigaciones sobre la obtención de antioxidantes



a partir de nuevas fuentes vegetales, especialmente de bajo coste económico (subproductos agroalimentarios, excedentes, etc.). En nuestro laboratorio, también estamos llevando a cabo un proyecto de investigación para la utilización de extractos de almendra en la formulación de complementos alimenticios antioxidantes (AGL 2003-01088). Pensamos que

la fracción fenólica de las almendras, tanto de la almendra (semilla), como de la piel, hueso (almendro), y drupa, podría presentar buenas propiedades antioxidantes con posibilidades de ser utilizadas en la formulación de estos productos. En el caso de la piel, el almendro y la drupa, este nuevo aprovechamiento revalorizaría estos subproductos.

Otros temas objeto de desarrollo futuro son los complementos multifuncionales, bien por combinación de ingredientes con distinta funcionalidad o bien por incluir compuestos que presentan diversas “acciones biológicas” que pueden dar lugar a distintos efectos fisiológicos beneficiosos para el organismo humano. ■

**TABLA 1: COMPOSICIÓN DE ALGUNOS COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS ANTIOXIDANTES**

#	Ingredientes
1	Concentrado de uva; Romero; Celulosa vegetal.
2	Vitamina C; Concentrado antioxidante de hierbas; Concentrado antioxidante de vegetales; L-Cisteína; Extracto de pepita de uva; Vitamina E; Zn; Vitamina A; Se.
3	Levadura rica en Se y Zn, Concentrado de granos de trigo germinados; Gelatina vegetal; Carotenos naturales; Glutacion; Vitamina C; Vitamina E natural, Antiaglomerantes (óxido de silicio y estearato de magnesio); Vitamina A.
4	Hidrolizado aromático de gelatina; Fructosa; ac. Cítrico; Extracto concentrado de tomate; Aroma de Piña; Sorbato potásico; Vitaminas grupo B; Vitamina E; Acesulfame.
5	Vitamina C; Flavonoides cítricos; Otras vitaminas; Minerales.
6	Extracto de uva roja tintorera; Aceite de germen de trigo; Emulgente (lecitina); Espesante (cera de abejas); Cubierta (gelatina y glicerina); Colorantes (β-caroteno).
7	Vitamina C; β-Caroteno; Flavonoides cítricos; L-Cisteína; Extracto de Ginkgo Biloba; Gluconato de Manganeso; Extracto de pepita de uva; Levadura rica en Se, Vitamina E; Óxido de zinc, Gluconato de cobre, Coenzima Q10.
8	Flavonoides cítricos (40% Hesperidina); Rusco; Ginkgo biloba; Cola de caballo; Hamamelis; Vitamina C; Vitamina B <sub>1</sub> .
9	Vitaminas A, D, E, C, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , K; Ácido fólico; Fe; Acido pantoténico; Mg; Zn; Mg; Cu; B; Cr; Se; Flavonoides cítricos; Flavonoides de propoleo; Carotenoides naturales; Extracto de Ginkgo Biloba.
10	Hojas <i>Vitis vinifera</i> ; Extracto seco de semillas <i>Vitis vinifera</i> (95% polifenoles).
11	Hidroxitiroso; Otros compuestos fenólicos de la aceituna.
12	Extracto concentrado de tomate (2% Licopeno); Extracto de pepita de uva; Levadura de selenio (2% Se, β-Caroteno); Vitamina C; Vitamina E.
13	Concentrado de uva negra enriquecida en <i>t</i> -resveratrol; Vitamina C; Aroma de uva; Estearato de magnesio.



## AgroCSIC

Se pretende desarrollar y evaluar ingredientes/complementos alimenticios con propiedades antioxidantes que produzcan efectos “saludables” en el organismo humano.

**CENTRO DEL CSIC:** Instituto de Fermentaciones Industriales, Juan de la Cierva, 3. 28006 Madrid.

**Web:** [www.csic.es/ifi](http://www.csic.es/ifi)

**Departamento:** Tecnologías Sectoriales. Alimentos de origen vegetal.

**Nombre Investigador:** Begoña Bartolomé Sualdea.

**E-mail:** [bartolome@ifi.csic.es](mailto:bartolome@ifi.csic.es)

**Tendencias de Investigación:**

- Calidad de alimentos de origen vegetal.
- Seguimiento y mejora de procesos de elaboración de vinos tintos.
- Obtención y evaluación de antioxidantes naturales.
- Propiedades químicas y sensoriales y beneficios fisiológicos de polifenoles.

# trazabilidad alimentaria

## seguimiento integral de sus productos y procesos

Gestione la trazabilidad de sus productos en todas sus vertientes.

Combine la información de los registros de campo con los datos de producción y de gestión, dando lugar a una trazabilidad tanto hacia adelante como hacia atrás desde cualquier punto de su proceso, con total flexibilidad y seguridad.

Utilice los estándares de identificación de producto para entregar la información a sus clientes tal y como la requieren.

Gestione, cree y modifique a su necesidad los registros de calidad, APPCC, EurepGAP, BRC, ... que desee llevar.

Conozca en tiempo real sus datos de proceso. Entradas a almacén, salidas, productos en proceso.

Obtenga los informes que necesite para su mejor gestión.

Comunique a sus clientes los datos que le soliciten de forma ágil.

Adaptese a la normativa de trazabilidad sin cambios en sus programas informáticos actuales.

Todo ello, de una forma fácil y cómoda, maximizando la toma de datos automática para evitar errores y minimizando los trabajos manuales.



# Centro *de* Edafología y Biología Aplicada *del* Segura



Constituyentes  
Anticancerígenos de la Dieta  
Mediterránea



Nuevas Tendencias  
de Procesado y Conservación  
de Alimentos Vegetales de IV  
Gama



Agro csic

# Constituyentes Anticancerígenos de la Dieta Mediterránea

JUAN CARLOS ESPÍN. GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN CALIDAD, SEGURIDAD Y BIOACTIVIDAD DE ALIMENTOS VEGETALES. DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS. CEBAS-CSIC.

*Al referirnos a “dieta mediterránea” hablamos de un largo proceso de confluencia entre clima, productos y necesidades de las civilizaciones de los pueblos que han vivido en la cuenca mediterránea. En sentido estricto, deberíamos hablar de dietas mediterráneas, ya que las seguida por poblaciones como Creta, Túnez, Italia, España, etc. no es siempre la misma. Sin embargo, estos países sí comparten características comunes; consumo elevado: de frutas, hortalizas, legumbres, pasta, cereales, aceite de oliva; moderado: de pescado, cárnico y de productos lácteos, así como de vino y frutos secos. Además de esto, el tipo de cocinado se basa en fritura en baño de aceite de oliva y hervido de alimentos. Actualmente la dieta mediterránea consiste básicamente en mantener una dieta variada/equilibrada y restricciones en el aporte calórico.*

## “Dieta Mediterránea”

Todo el mundo tiene una idea más o menos clara del concepto de “dieta mediterránea” así como del beneficio para la salud que reporta a la persona que sigue sus pautas. Sin embargo, no es fácil encontrar una respuesta simple y única para la definición de este término. De hecho, al referirnos a “dieta mediterránea” hablamos de un largo proceso de confluencia entre el clima, los productos de la tierra y las necesidades de las civilizaciones que han vivido en la cuenca mediterránea. Por tanto, es ya un modelo teórico, que en su día existió realmente y que actualmente es posible que aún exista como tal en algunas zonas. En sentido estricto, no deberíamos hablar de “dieta mediterránea” sino de “dietas mediterráneas”, ya que la dieta seguida por poblaciones de Creta, Túnez, Italia, España, etc. no es precisamente la misma. Sin embargo, estos países sí que compartían características importantes: consumo elevado de frutas, hortalizas, legumbres,

pasta y cereales; uso del aceite de oliva como principal fuente de grasa; consumo regular de pescado; moderado a bajo aporte cárnico y preferentemente de aves; consumo moderado a bajo de productos lácteos; ingesta moderada de miel, aceitunas y frutos secos; consumo moderado pero regular de vino tinto (excepto en países de religión musulmana) y uso de hierbas aromáticas y especias como alternativa a la sal. Además de esto, el aporte calórico era moderado (frugalidad en las comidas), el tipo de cocinado se basaba en fritura en baño de aceite de oliva y hervido de alimentos en agua, la gente realizaba una actividad física relativamente intensa y por supuesto había una ausencia casi total en la dieta de azúcares refinados y bollería industrial. Actualmente, la dieta mediterránea, tal y como la entienden las autoridades sanitarias, básicamente consiste en mantener una dieta variada-equilibrada y restringir el aporte calórico; o más detalladamente una dieta basada en comer menos carne,

menos huevos, menos productos lácteos de los que se consumen actualmente, comer más pescado, legumbres, frutos secos, cereales, frutas, verduras frescas, aceite de oliva y adecuar el aporte calórico a la actividad física desempeñada. La Organización Mundial de la Salud y la FAO, entre otras instituciones, han diseñado una “pirámide” que resume estas pautas dietéticas como modelo saludable a seguir por la población (**Figura 1**).

En los años sesenta, financiado por la Fundación Reina Guillermina de Los Países Bajos y dirigida por el profesor Ancel Keys, se llevó a cabo el llamado “Estudio de los Siete Países” (E.E.U.U., Japón, Finlandia, Holanda, Grecia, Italia y la antigua Yugoslavia). El estudio se realizó para intentar relacionar la alimentación con la aparición de enfermedades cardiovasculares. La conclusión fundamental de este estudio fue la menor tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en países mediterráneos (sobre todo en Creta), en comparación con las muertes re-





gistradas en Estados Unidos o Finlandia por esta causa. Así, el concepto de “dieta mediterránea” fue desarrollado por Ancel Keys y el profesor Francisco Grande Covián, eminentes expertos en nutrición, para referirse a los hábitos alimentarios altamente saludables observados en países de este entorno geográfico. Posteriormente, mediante numerosos estudios epidemiológicos, se ha evidenciado que la dieta mediterránea también tiene contrastados efectos beneficiosos frente a distintos tipos de cáncer<sup>1,2</sup> e incluso podrían contribuir a una mejora de las expectativas de vida.<sup>1,3</sup> Sin embargo, es preciso hacer hincapié en el hecho de que una dieta variada y equilibrada como la mediterránea, no es un seguro de vida si no se ve acompañada por unos “hábitos” también saludables como son la ausencia de tabaco, ejercicio regular, protección adecuada frente a rayos solares, etc.

España, por su situación geográfica, ha sido encuadrada dentro de las naciones donde la población sigue las pautas

de la dieta mediterránea. Ahora bien, la pregunta inmediata que surge es: ¿la población española sigue aún el prototipo de “dieta mediterránea”? La respuesta está llena de matices. En comparación con otros países de los llamados “desarrollados”, nuestras costumbres gastronómicas son envidiables, aparte de la palatabilidad de sus platos, con un relativamente alto consumo de frutas, verduras, legumbres, pescado, aceite de oliva y un menor consumo de carne roja y grasas saturadas en general. Ahora bien, sí es manifiesto un continuo empeoramiento de estas costumbres registrándose un cambio de ciertos patrones tales como sustituir la fruta como postre por los productos lácteos, menor consumo de fruta y verdura sobre todo entre la población infantil y un mayor aumento del consumo de la llamada “comida basura”, liderada por las frituras, hamburguesas, etc. El análisis de estos cambios es muy complejo y viene asociado en gran medida a la dinámica de vida actual por el trabajo que nos lleva al se-

dentarismo, a permanecer menos tiempo en la cocina, a comer más rápido, y por ello recurrir cada vez más a platos preparados, especialmente en la población de las ciudades. Aunque la situación no es alarmante, sí empieza a preocupar a las autoridades sanitarias, y no debemos bajar la guardia dejándonos llevar por el tópico según el cual por el mero hecho de vivir en España estamos “protegidos” por nuestra dieta.

### Cáncer

Resulta innecesario recordar el impacto que tiene el cáncer como causa de muerte en nuestra sociedad. Se trata casi de una palabra tabú para mucha gente donde su nombre casi se asocia a una sentencia de muerte que, afortunadamente, cada vez con mayor frecuencia, no es el resultado final de este proceso.

Las células normales de nuestro cuerpo crecen, se dividen y mueren a través de un proceso altamente controlado y definido. Cuando somos niños, las células

se dividen más rápidamente hasta que llegamos a adultos, momento en el que las células de la mayoría del cuerpo se dividen sólo para reemplazar a las muertas o para reparar tejidos dañados. Sin embargo, cuando tiene lugar un crecimiento celular “descontrolado” nos encontramos ante un proceso canceroso que lleva a la formación de un “tumor”. Cuando esas células tumorales “viajan” y colonizan otros órganos del cuerpo, hablamos de “metástasis”, proceso que dramáticamente empeora las expectativas de vida del paciente (**Figura 2**).

Existen varios tipos de cáncer y distintos sub-tipos dentro de éstos: carcinomas (pulmón, mama, colon, etc.), sarcomas (hueso, músculo, etc.), linfomas (ganglios linfáticos y tejidos del sistema inmune) y leucemias (linfoide, mieloide, etc.). Aunque, en general, el disfrutar de buena salud es en gran medida una cuestión de genes, distintos factores externos (polución, tabaco, radiaciones, etc.) pueden influir en nuestra salud de manera crítica. Entre estos factores externos, la dieta ocupa un lugar relevante. El binomio dieta-salud es incuestionable y son varios los tipos de cáncer (próstata, mama, pulmón, colon...), que pueden verse influenciados por la dieta<sup>4,5</sup> si bien, son los cánceres del aparato gastrointestinal (esófago, estómago, colon...) los más estrechamente relacionados con nuestra alimentación<sup>6</sup> (**Figura 2**).

### Constituyentes de la Dieta Mediterránea y cáncer

El efecto de la dieta en la salud no tiene lugar mediante la acción de un nutriente aislado sino a través de la combinación de distintos constituyentes de uno o varios alimentos que permiten una acción sinérgica. Sin embargo, la interacción entre constituyentes de alimentos puede favorecer o empeorar la potencial acción frente algún proceso patológico como puede ser el cáncer. En este sentido, el procesado industrial de alimentos (tratamientos térmicos, adición de ingredientes, etc.) puede estar muy relacionado con el mayor o menor efecto final de una alimento en la salud.

Hemos mencionado anteriormente los alimentos de la dieta mediterránea más representativos promotores de la salud: frutas, verduras, pescado, frutos secos, aceite de oliva, vino tino, etc. También se ha dicho que la dieta mediterránea se caracterizaba por un aporte calórico moderado y en consonancia con la actividad fi-



sica desempeñada por la gente. Además, queda contrastado el papel beneficioso en la salud de los nutrientes propiamente dichos de la dieta mediterránea, como el tipo de grasas (ácido oleico del aceite de oliva, ácidos grasos ω-3 de nueces y pescado azul, etc.), los carbohidratos complejos aportados por las patatas, cereales, legumbres, etc., las proteínas de origen marino y vegetal, etc. Además intervienen otros componentes de estos ali-

mentos como son la fibra (frutas, verduras, cereales, etc.), los minerales (selenio, calcio, zinc, etc.) y las vitaminas. Pero, ¿qué constituyentes de estos alimentos son los mayores responsables en la potencial acción anticancerígena?. No se pueden mencionar con detalle todos los que conocemos pero sí algunos de los más representativos.

Existe un grupo de moléculas ampliamente distribuido en el Reino Vegetal y

FIGURA 2. EVOLUCIÓN Y ETAPAS DEL CÁNCER DE COLON

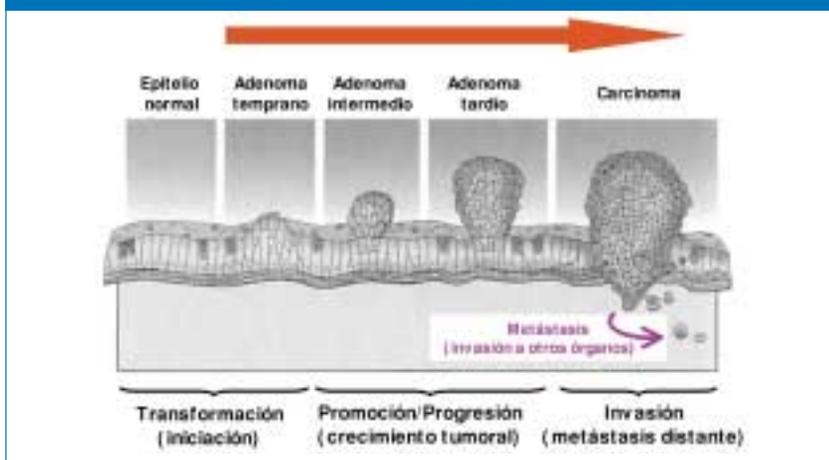
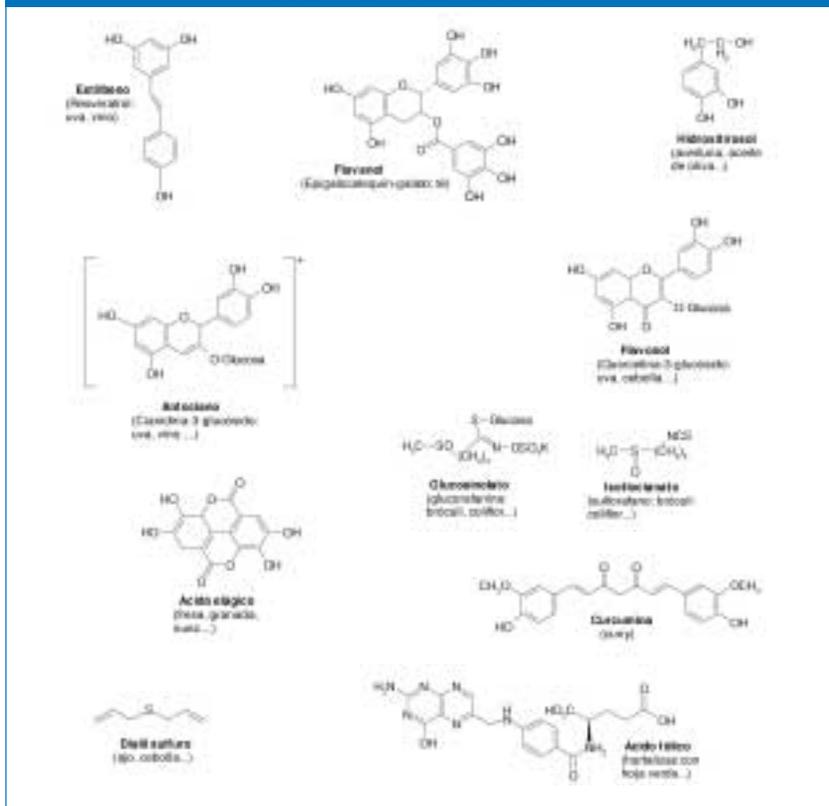


FIGURA 3. ALGUNOS CONSTITUYENTES BIOACTIVOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA



que forman parte de la dieta a través de la ingesta de fruta y hortalizas y derivados como zumos, vino y té. Hablamos de los **polifenoles**, metabolitos secundarios de las plantas implicados en la defensa de éstas frente a situaciones de estrés tales como ataques de patógenos. Además, los polifenoles son determinantes de la calidad de las frutas y hortalizas, contribuyendo al sabor, aroma y color de éstas.<sup>7</sup>

Los polifenoles se dividen en dos grupos fundamentales de acuerdo a su estructura: los flavonoides y los no-flavonoides. Dentro de los flavonoides, que son los polifenoles más abundantes (más de 5.000 descritos), destacan los antocianos (responsables del color rojo o púrpura de las frutas como uva tinta, ciruela, fresa, etc.), y de algunas hortalizas como lechuga pigmentada), las catequinas o flavanoles (abundantes en uva, cereza y

sobre todo en té y vino), los flavonoles (presentes en la mayoría de las frutas y muy abundantes en alimentos como la cebolla), las flavanonas (representativas de los cítricos), las flavonas (en perejil, apio y pimienta), y las isoflavonas, aunque éstas no son representativas de la dieta mediterránea pues su principal fuente en la dieta es la soja. Dentro de los polifenoles no-flavonoides, encontramos los estilbenos (representativos de uva y vino, destacando el **resveratrol** sobre todos), los ácidos hidroxicinámicos (como los derivados de los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sináptico, abundantes, según el compuesto del que hablemos, en alcachofa, uva, brócoli, etc.), y finalmente, los derivados hidroxibenzóicos (como los derivados del ácido elágico y gálico (como los derivados de los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sináptico, abundantes, según el compuesto del que hablemos, en alcachofa, uva, brócoli, etc.), y finalmente, los derivados hidroxibenzóicos (como los derivados del ácido elágico y gálico (como los derivados de los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sináptico, abundantes, según el compuesto del que hablemos, en alcachofa, uva, brócoli, etc.).

Una de las principales acciones biológicas de los polifenoles es la de captar radicales libres (actividad antioxidantes), especies altamente reactivas que se producen en nuestro organismo como consecuencia de multitud de procesos (metabolismo, ejercicio intenso, etc.). Los polifenoles combaten la acción de estos radicales libres que están implicados en la degradación de estructuras celulares interviniendo en el envejecimiento así como en enfermedades cardiovasculares y cáncer. Se han publicado numerosos trabajos científicos que avalan las distintas actividades promotoras de la salud de los polifenoles: antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatoria, antibacteriana, antiviral, hipocolesterolemia, antitrombótica, etc. Si nos centramos en la actividad anticancerígena, ésta se ha descrito para la mayoría de los polifenoles, representativos o no de la dieta. Sin embargo, los numerosos estudios existentes destacan a una serie de polifenoles por su enorme potencial en la lucha frente al cáncer, ya sea por su contundencia en el efecto o por la vía por la que actúan (**Figura 3**): **epigallocatequina-galato (EGCG)** (en té), **resveratrol** (en vino, uva y cacahuetes), **hidroxitirosol** (en aceite de oliva), **ácido elágico** (en fresa, frambuesa, granada, etc.), **quercetina** (en uva, cebolla...) y **curcumina** (en curry).

Otros constituyentes con importante actividad anticancerígena son los **glucosinolatos** y sobretodo sus productos derivados, los **isotiocianatos** (**Figura 3**). Este tipo de organosulfurados son representativos de especies del género *Brassica*, destacando por su importancia en nuestra dieta el brócoli, col, coliflor y col

de Bruselas. Mención especial requieren otros compuestos organosulfurados presentes en la familia *Alliaceae* (cebolla, ajo, puerro, etc.), sobre todo el **dialil sulfuro**, muy abundante en ajo (**Figura 3**).

Según estudios clínicos realizados se ha sugerido una reducción del cáncer de colon con la ingesta de **ácido fólico** (abundante en hojas de hortalizas, frutas, hígado, cereales....) si bien aún se encuentran en evaluación importantes ensayos clínicos para realmente validar esta hipótesis.

No se abordarán otros muchos constituyentes potencialmente beneficiosos para la salud pero que o bien no son especialmente relevantes en su efecto contra el cáncer o los resultados obtenidos en diferentes estudios muestran contradicciones. Por ejemplo, los **carotenoides** ( $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína, criptoxantina, etc.), responsables del color amarillo-naranja-rojo de hortalizas como el pimiento, zanahoria, tomate, etc. Su principal actividad es captadora de radicales libres. Los carotenoides también han sido investigados en su posible actividad anticancerígena, e incluso el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos recomien-



da la ingesta de 5 a 6 mg de carotenoides diarios. Sin embargo, hasta la fecha se han obtenido resultados contradictorios, hasta el punto de que varios estudios epidemiológicos han correlacionado la ingesta de carotenos con un aumento en la incidencia de algunos tipos de cáncer.

También son importantes los **fitosteroles**, análogos estructurales del colesterol animal, que se encuentra fundamentalmente en las semillas de oleaginosas como girasol y sésamo entre otros. El efecto hipocolesterolémico (ayudan a bajar los niveles de colesterol en el organis-

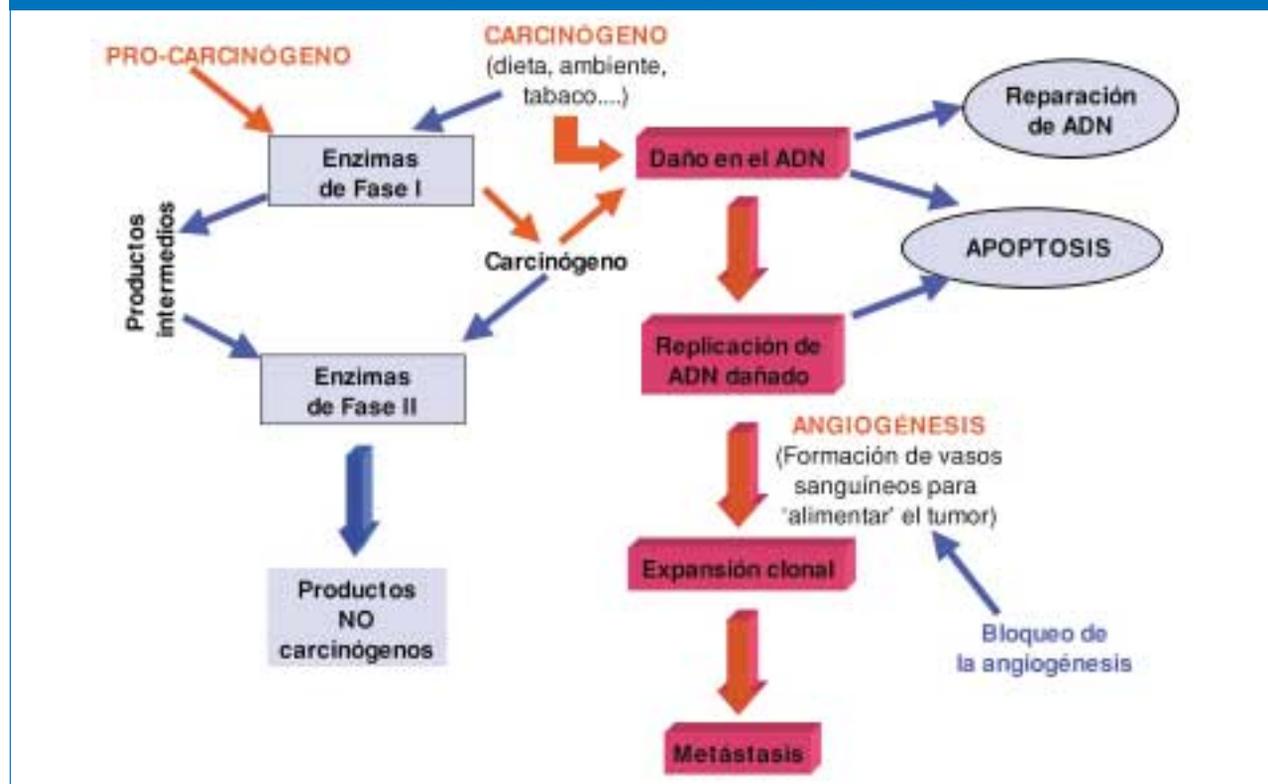
mo) de los fitosteroles ha sido contrastado mediante abundantes estudios científicos pudiendo contribuir a una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares.

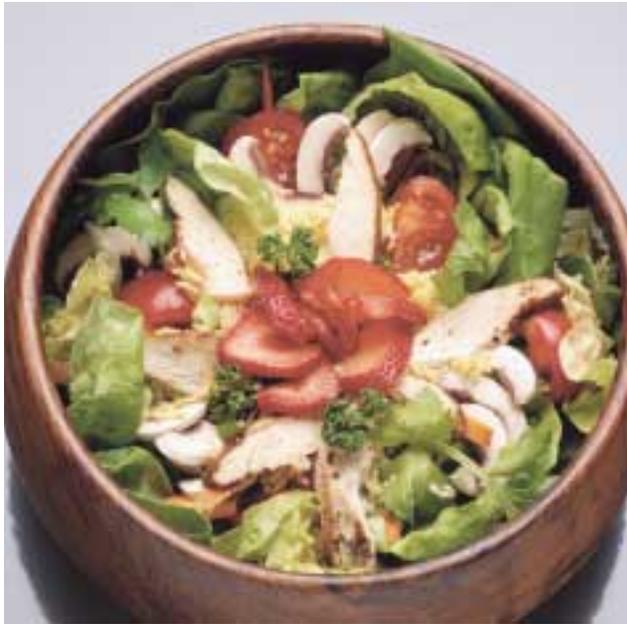
El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos junto a otras organizaciones institucionales han recomendado la ingesta de al menos 5 piezas de frutas y/o hortalizas y 20 a 30 gramos de **fibra** al día. La fibra puede prevenir el desarrollo de cáncer de colon aunque su posible mecanismo de actuación es difuso e incluso muchos estudios realizados sobre fibra y cáncer arrojan sólo resultados parciales.

### Modo de actuación de los constituyentes anticancerígenos

Estos compuestos bioactivos, que por su potencial papel frente al cáncer se conocen en inglés como "cancer chemopreventive compounds" (en español se traduciría como "compuestos quimiopreventivos del cáncer"), pueden tener varios puntos de actuación en las etapas del desarrollo del cáncer (**Figura 4**). Un mismo constituyente puede ser muy selectivo en su acción, interviniendo en una ruta o etapa muy concreta, o bien, puede actuar sobre diversas etapas, siendo poco

**FIGURA 4. PRINCIPALES ETAPAS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER (RUTA MARCADA EN ROJO) Y POTENCIALES INTERACCIONES DE LOS CONSTITUYENTES DERIVADOS DE LA DIETA (EN AZUL) PARA BLOQUEAR O DIFICULTAR EL DESARROLLO DEL CÁNCER**





específico en su acción anticancerígena. Cada etapa en el desarrollo del cáncer, puede estar compuesta o caracterizada a su vez, por varias rutas lo que confiere al proceso multitud de variables. No es posible abordarlas todas por lo que resaltaremos las más representativas donde intervienen los constituyentes anticancerígenos de la dieta.

La **“apoptosis”** o comúnmente llamada “muerte celular programada” es un proceso por el cual las células normales del organismo mueren ante alguna señal de alarma que se produce en la célula (incorrecta secuencia en el ciclo celular, presencia de sustancias extrañas que pueden mutar el ADN, contacto entre otras células para delimitar el tamaño de tejidos, etc.). Sin embargo, las células cancerosas han sufrido algún cambio o mutación por lo cual no sufren apoptosis, y a pesar de que la célula ya no es

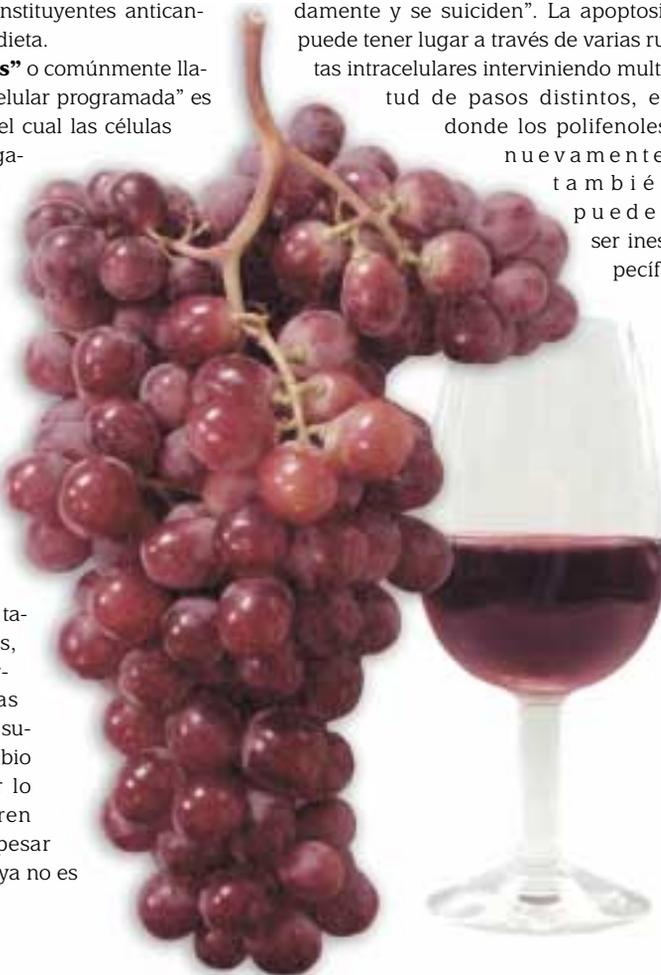
“normal” siguen dividiéndose descontroladamente (**Figura 4**). Existen constituyentes de la dieta muy específicos en su acción anticancerígena en virtud de la cual inducen apoptosis de células cancerosas, es decir, “hacen que las células cancerosas ya no se dividan descontroladamente y se suiciden”. La apoptosis puede tener lugar a través de varias rutas intracelulares interviniendo multi-

tud de pasos distintos, en donde los polifenoles, nuevamente, también pueden ser inespecí-

cos afectando varios pasos de estas rutas, o bien ser muy específicos interfiriendo un paso muy determinando de unas de las posibles rutas concretas. Entre los compuestos que inducen apoptosis en células cancerosas encontramos a la mayoría de los polifenoles (**Figura 3**), destacando al resveratrol, a los flavonoides en general (sobre todo derivados de la quercetina y catequina), y al ácido elálgico y sus derivados. Cabe destacar que la inducción selectiva de la apoptosis de células cancerígenas es una de las estrategias más prometedoras en la lucha contra el cáncer.<sup>8</sup>

Los compuestos organosulfurados como dialilsulfuros, glucosinolatos e isotiocianatos (**Figura 3**) ejercen su acción contra el cáncer fundamentalmente manteniendo un adecuado balance en unas rutas metabólicas de nuestro organismo que están concebidas para la eliminación de sustancias “extrañas” (potencialmente cancerígenas) que normalmente entran en nuestro cuerpo a través de los alimentos o el ambiente. En estas rutas intervienen las llamadas “enzimas de fase I y fase II” (**Figura 4**) que son las reguladas por estos compuestos organosulfurados jugando un papel crítico en procesos de eliminación de los potenciales carcinógenos medioambientales o de la dieta.

Existen otros mecanismos de acción de los constituyentes de la dieta mediterránea frente al cáncer, más o menos específicos. Por ejemplo, mediante el bloqueo o inhibición de moléculas que se ha visto son representativas de células can-





cerosas, como la enzima ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), la cual interviene en la proliferación de las células tumorales. Muchos polifenoles son especialmente activos en el bloqueo de la actividad de esta enzima, implicando una menor proliferación de las células cancerosas. Al igual que en el caso de la COX-2, existen otros muchos marcadores tumorales que se ven afectados por los distintos constituyentes de la dieta mediterránea.

Cabría destacar otro mecanismo más mediante el cual la célula cancerosa puede ver dificultado su crecimiento gracias a la acción de estos constituyentes. Se trata del bloqueo de una enzima muy específica e importante en el crecimiento celular. Su nombre: **telomerasa**. Cuando la célula se divide progresivamente, se produce un acortamiento en los llamados “telómeros”, una parte concreta, distal, de los cromosomas. Se podrían interpretar como un “reloj biológico con cuenta atrás” en virtud del cual cada vez que la célula se divide, los telómeros se acortan, implicando esto que ya quedan menos divisiones celulares futuras. En los procesos cancerosos, una vía por la cual la célula puede crecer descontroladamente es que estos telómeros no se acorten, es decir, la célula no tiene ese “reloj” programado con un número concreto de divisiones, sino que éstas

pueden ser infinitas, encontrándonos ante una célula “inmortal”. Esta línea de investigación mediante la cual se “desactiva” este “reloj biológico” que constituyen los telómeros ha sido una estrategia pretendida hacia la búsqueda de la eterna juventud, o al menos, con el objeto de hacer al ser humano más longevo. Sin embargo, se ha visto que desactivar el mecanismo por el cual los telómeros se acortan equivale a producir células tumorales. La enzima encargada de evitar que los telómeros se acorten (“fabricando” la porción de los telómeros que se van “desgastando”) es la enzima telomerasa, la cual, cuando se encuentra mutada es la responsable de “desajustar” ese “reloj biológico”. Recientes investigaciones<sup>9</sup> han demostrado que polifenoles de la dieta, especialmente la epigallocate-

quin-galato del té (**Figura 3**) pueden “bloquear” a la telomerasa de las células tumorales (que las hacía inmortales), volviéndolas a células normales (mortales) evitando la regeneración de los telómeros después de cada división.

### Investigación actual: ¿dónde estamos y a dónde vamos?

Desde la “declaración oficial de guerra al cáncer” hace más de tres décadas, los avances en la investigación sobre la carcinogénesis han sido espectaculares. Dentro de toda la estrategia para hacer frente al cáncer, tiene su hueco el papel de la alimentación y su repercusión en la salud.

En el año 2000, el Instituto Americano de Investigación sobre el Cáncer y más recientemente otras instituciones han marcado el inicio de agresivas campañas para fomentar hábitos sanos en la alimentación y a su vez han fomentado la investigación sobre las bases científicas del papel protector de los constituyentes de la dieta en el cáncer. En este sentido ha habido alguna caída de mitos. Se ha constatado que la ingente cantidad de estudios realizados “in vitro” en los que se achacaban propiedades beneficiosas de los constituyentes de los alimentos, tal y como se encuentran en ellos, son, en su gran mayoría de dudosa extrapolación a las





condiciones reales “in vivo”. En este sentido, las investigaciones actuales sobre la relación alimento-cáncer, hacen más hincapié en los metabolitos que resultan tras la digestión en el organismo. Es decir, ¿cómo y cuánto se absorben los constituyentes de los alimentos?, ¿en qué (metabolitos) se transforman?, ¿a qué tejidos llegan?, ¿qué actividad tienen estos metabolitos que pasan a la sangre?, ¿qué papel tienen las bacterias

del intestino (flora del colon) en la transformación de los constituyentes que ingerimos?, puesto que la flora del colon es muy variable en función de cada individuo, ¿puede tener un mismo alimento distinto efecto en la salud en distintos individuos?.

Actualmente, merece mención especial la “Nutrigenómica”. El desarrollo de esta ciencia que empieza a asentarse en los mejores laboratorios mundiales, arro-

jará valiosa información acerca del papel protector de la salud de los constituyentes de alimentos, incluidos los de la dieta mediterránea. La Nutrigenómica nos permitirá evaluar qué genes se ven afectados como consecuencia de la ingesta de determinados constituyentes de estos alimentos. De esta manera sabremos el potencial papel de estos constituyentes en la prevención de determinadas patologías, incluida el cáncer. ■

## NOTAS:

1. De Lorgeril, M.; Salen, P.; Martín, J.L.; Monjaud, I.; Boucher, P.; Marmelle, N. (1998). Mediterranean dietary pattern in a randomized trial. Prolonged survival and possible reduced cancer rate. *Archives of Internal Medicine*, **158**, 1181-1187.
2. Mathew, A.; Peters, U.; Chatterjee, N.; Kulldorff, M.; Sinha, R. (2004). Fat, fiber, fruits, vegetables and risk of colorectal adenomas. *International Journal of Cancer*, **108**, 287-292.
3. Trichopoulou, A.; Costacou, T.; Bamia, C.; Trichopoulos, D. (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New England Journal of Medicine*, **348**, 2599-2608.
4. Go, V.L.W.; Wong, D.A.; Butrum, R. (2001). Diet, nutrition and cancer prevention: Where are we going from here? *Journal of Nutrition*, **131**, 3121S-3126S.
5. Miller, A.B.; Altenburg, H.P.; Bueno-de-Mesquita, B.; Boshuizen, H.C. y otros. (2004). Fruits and vegetables and lung cancer: findings from the European prospective investigation into cancer and nutrition. *International Journal of Cancer*, **108**, 269-276.
6. Courtney, E.D.J.; Melville, D.M.; Leicester, R.J. (2004). Chemoprevention of colorectal cancer. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **19**, 1-24.
7. Tomás-Barberán, F.; Espín, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 853-876.
8. Sun, S.Y.; Hail, N.; Lotan, R. (2004). Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute*, **96**, 662-672.
9. Naasani, I.; Oh-hashii, F.; Oh-hara, T.; Feng, W.Y.; Johnson, J.; Kenneth, C.; Tsuruo, T. (2003). Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Research*. **63**, 824-830.

## AgroCSIC

*El papel de la alimentación en la salud es objeto de intensas investigaciones a escala mundial. La colaboración entre científicos y personal clínico de hospitales se hace esencial para potenciar estas líneas de investigación. En este contexto, nuestro grupo de investigación está desarrollando estudios pioneros tanto en España como en el mundo en cuanto al papel protector en la salud de constituyentes de alimentos vegetales por lo que recientemente ha sido galardonado con el Premio Frial de Investigación en Alimentación y Salud, dotado con 18.000€, en un jurado presidido por el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza y en el que también figuraba la Dra. Margarita Salas (discípula de Severo Ochoa) entre otras eminentes personalidades.*

**CENTRO DEL CSIC:** Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS). 30100 Campus de Espinardo. Murcia.

**Departamento:** Ciencia y Tecnología de Alimentos; (Grupo de Investigación en Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales).  
**Nombre Investigador:** Dr. Juan Carlos Espín de Gea. Científico Titular del CSIC.

**E-mail:** jcespin@cebas.csic.es

**Tendencias de Investigación:**

- Alimentación y Salud.
- Absorción y metabolismo de moléculas de la dieta en células, animales y humanos.
- Actividad biológica de constituyentes de la dieta en animales, humanos sanos y afectados de distintas patologías.
- Efecto anticancerígeno de moléculas de la dieta en células cancerosas y normales: identificación molecular de la ruta de acción.

# Nuevas Tendencias de Procesado y Conservación de Alimentos Vegetales de IV Gama

María Isabel Gil, Ana Allende, David Beltrán y Victoria Selma. Grupo de Investigación en calidad, seguridad y bioactividad de alimentos vegetales. Departamento de ciencia y tecnología de alimentos. CEBAS-CSIC



*Los productos de IV gama están teniendo cada vez más importancia en nuestro país, debido al aumento del consumo de frutas y hortalizas que son*

*claves en la dieta mediterránea, así como también debido a que son alimentos preparados y listos para su consumo o cocinado.*

## “Productos IV gama”

Los requisitos relativos a las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y Buenas Prácticas de Distribución (BPD) tienen como objetivo minimizar el riesgo de contaminación de estos productos de IV gama. La implantación de estos programas de higienización resulta necesaria para garantizar la seguridad de las frutas y hortalizas de IV gama. A pesar de los avances que se están produciendo en el sector de la IV gama para reducir los riesgos de contaminación, estos productos hortofrutícolas se han visto involucrados en algunos problemas relativos a la salud pública. En particular, los microorganismos psicrótrofos alteradores y patógenos son el principal motivo de preocupación, ya que son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración, necesarias en la conservación de productos de IV gama. En realidad, la alteración de la calidad organoléptica de un alimento está generalmente asociada a un excesivo crecimiento microbiano. Las guías sobre calidad y seguridad de frutas y hortalizas en IV gama (1), especifican la necesidad de una etapa de lavado o higienización que sea capaz de eliminar la suciedad, los residuos de plaguicidas así como los microorganismos causantes de la pérdida de calidad y podredumbre. No debe olvidarse que, en las etapas de elaboración de los productos vegetales en IV gama, no se emplean procedimientos que puedan garantizar la asepsia completa, como sería el caso de la utilización de los tratamientos térmicos. Por tanto, el control de la microflora sólo podrá conseguirse mediante una higienización muy

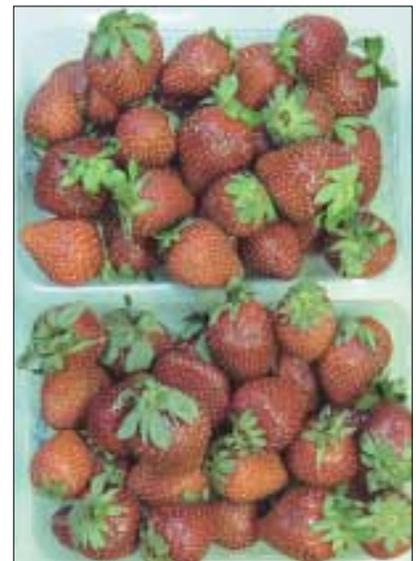


estricta durante las etapas de elaboración y una adecuada conservación en atmósfera modificada en condiciones de refrigeración.

Las técnicas de conservación más frecuentemente utilizadas hasta ahora para el mantenimiento de la calidad de productos vegetales de IV gama son las bajas temperaturas y el envasado en atmósfera modificada (AM). Sin embargo, la aplicación de nuevas tecnologías capaces de mantener la calidad organoléptica y de inhibir el crecimiento de la flora microbiana en todos y cada uno de los pasos de la cadena de producción, procesado y distribución resulta imprescindible. La principal razón es la adaptación que están experimentando los microorganismos a condiciones desfavorables, provocando que los métodos de control convencionales dejen de ser efectivos para inhibir la carga microbiana. La industria de las frutas y hortalizas en IV gama ha visto la necesidad de iniciar programas complejos de desinfección que aseguren

la calidad microbiológica de sus productos, debido a la capacidad de algunos microorganismos patógenos para sobrevivir e incluso desarrollarse en AM. Por esta razón, se está trabajando en la búsqueda de nuevas tecnologías que puedan proporcionar alimentos frescos y seguros.

En la actualidad este grupo del CE-BAS-CSIC está desarrollando el proyecto titulado “Control de microorganismos alteradores y patógenos bacterianos en productos vegetales de IV gama” (AGL2004-03060) financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. El objetivo principal del proyecto es evitar la contaminación de las frutas y hortalizas en IV gama por bacterias patógenas, garantizando su seguridad microbiológica mediante el control de la contaminación bacteriana en el campo de cultivo y en la planta de procesado. Para ello se están evaluando diferentes residuos orgánicos y aguas de riego de distintos orígenes y calidades (aguas de pozos, aguas residuales depuradas, aguas del trasvase etc.). Se está trabajando especialmente en el control de la contaminación de las hortalizas frescas por microorganismos potencialmente patógenos durante el cultivo así como la proliferación tras la recolección mediante la higienización en campo. En la planta de procesado se está realizando la higienización del producto entero y tras el procesado en IV gama. La higienización se está llevando a cabo durante el lavado del producto cortado con la aplicación de distintos agentes químicos como por ejemplo, ozono en disolución, combinación ozono – ultravioleta, lavados con calor moderado (45-55 °C),



clorito de sodio (Sanova®), dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno y lactoperoxidasa. Por último se están ensayando distintas atmósferas de envasado como tratamiento preventivo durante la conservación, mediante el empleo de atmósferas con niveles elevados de oxígeno (>60%), gases nobles (argón y helio), ozono y óxido nítrico.

En este trabajo se recogen los princi-

pales métodos de higienización así como algunas tecnologías de conservación disponibles para la industria de alimentos de IV gama y que pueden representar una alternativa a las técnicas convencionales.

### Métodos de Higienización

La estrategia más efectiva para asegurar que un alimento en IV gama sea be-

neficioso y seguro para su consumo, es la prevención de la contaminación microbiana en todas las etapas, desde la producción al consumo. Por tanto, el mejor método para eliminar microorganismos patógenos es, en primer lugar, prevenir su contaminación. Sin embargo, esto no es siempre posible y el lavado e higienización del producto resulta de vital importancia para prevenir brotes de toxiin-

## PROCESADO, HIGIENIZACIÓN Y ENVASADO DE LECHUGA ICEBERG:



Fig 1. Lechuga Iceberg procesada



Fig 2. Lavado de lechuga procesada

Lechuga Iceberg

Cortado manual

Lavado (4°C)

Higienizantes químicos:

- Hipoclorito sódico
- Ác. Peroxiacético

Agua ozonizada

Agua (control)

Combinada con Ultrasonidos

Activada con UV-C

Envasado (100 g/barqueta)



Fig 4. Barquetas de lechuga



Fig 3. Equipo de ozono

Conservación  
13 días a 4°C



fecciones alimentarias.

Los métodos convencionales utilizados para la higienización de alimentos vegetales enteros y de IV gama agrupan tratamientos físicos y químicos que se aplican al producto, a los equipos, e incluso a las superficies de trabajo. Se debe tener en cuenta que en general, cualquier método de desinfección tiene ventajas y desventajas, dependiendo de una serie de factores, como son las características de la superficie del producto o equipo, la fisiología de los microorganismos diana, el tiempo de exposición, la concentración del agente desinfectante a utilizar, el pH y la temperatura de lavado. Independientemente del tratamiento seleccionado, el lavado y/o higienización de frutas y hortalizas antes de la preparación del producto para su consumo está totalmente recomendada, a pesar de que esto no garantiza la total inocuidad del producto.

En la búsqueda de los tratamientos de higienización más efectivos para el lava-

do de frutas y hortalizas, la industria tiene que operar en áreas de incertidumbre, ya que la legislación vigente es en muchos casos escasa e incompleta. Para la aplicación de cualquier tratamiento químico o físico a productos vegetales, los manipuladores y procesadores deben asumir que dichos tratamientos han sido previamente probados y autorizados (Generally Regarded as Safe, GRAS). En la Tabla 1 se describen algunos ejemplos de higienizantes utilizados en la industria de vegetales de IV gama incluyendo el nombre comercial, el alimento vegetal, la dosis aplicada, la temperatura de lavado y la reducción de la microflora que ocasiona.

Entre estas nuevas tecnologías, los tratamientos de choque con agua caliente tienen un gran potencial para inhibir la actividad enzimática de los productos vegetales. Sin embargo, este tratamiento es incompatible con algunos alimentos frescos cortados como es el caso de las frutas ya que acelera su deterioro. No obstante,

los tratamientos cortos de agua caliente ofrecen una buena alternativa para el control de microorganismos patógenos además de inhibir las oxidaciones de algunos vegetales. Así se ha observado que los lavados con agua a 45-55 °C prolonga la vida útil manteniendo la calidad visual en lechuga IV gama (9). Por otro lado, también se ha observado en lechuga que estos tratamientos térmicos moderados cuando se combinan con agua clorada (100 ml L-1 a 47 °C durante 3 min) reducen hasta 2 unidades logarítmicas la carga microbiana inicial, frente al producto lavado a 4 °C. Además, con dichas combinaciones se consigue una reducción del pardeamiento en los cortes (10).

Desde que el uso del ozono fue aprobado por la legislación estadounidense en el año 2001, han sido muchas las expectativas de su empleo como agente antimicrobiano para el tratamiento de frutas y hortalizas enteras y en IV gama, tanto en su forma gaseosa como acuosa. El ozono tiene un gran poder oxidante

**TABLA 1: HIGIENIZANTES UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA DE PRODUCTOS EN IV GAMA**

Higienizante	Nombre comercial	Producto IV gama	Dosis=Concentración x tiempo	Tª lavado	Reducción microflora	Cita
Ácido láctico	Purac	Endibia	2% x 1.5 min	22 °C	RT: 1.6 log	2
Hipoclorito de sodio		Lechuga	100 mg/L - 30s, 2 y 5 min.	4° C	E. coli 0157:H7: 2.2-2.4 log	3
Hipoclorito de sodio		Brócoli	50 mg/L x 30s, 2 y 5 min.	4° C	E. coli 0157:H7: 1.9-2.6 log	3
Clorito de sodio	Sanova	Col china	500 mg/L x 15 min.	25° C	E. coli 0157:H7:c 0.9 log	4
Dióxido de cloro estabilizado	Oxine	Lechuga	5 min/	22° C Tres lavados consecutivos	E. coli 0157:H7 (Lavados 1,2 y 3): 1.2, 1.7 y 1.84	5
Ácido peroxiacético	Tsunami	Zanahoria	80 mg/L x 2 min.	25° C	E. coli 0157:H7: 1.65 log RT: 1.3 log. Hongos filamentosos: 0.35-0.92 log.	6
Peróxido de hidrógeno		Cantaloupe	5% x 2 min.	25° C	Salmonella: 1.8 log	7
Ozono en agua		Patata bastones	4 ppm x 3 - 7 min.	8° C Segundo lavado: 300 mg/L Tsunami	RT: 0 log (día 0); 1.14 (día 5); 0.75 (día 14) Psicrotrofos: 0.6 log (día 0); 1.14 (día 5) Bacterias anaerobias: 0 (día 0); 1.2 (día 14) Bacterias ácido lácticas: 0 (día 0); 3.29 (día 14) Coliformes: 0 (day 0); 3 (day 14)	8
UV-C		Lechuga	30 W x 15 min.	A 50 cm. por ambos lados	E. coli 0157:H7: 1-1.5 log.	5

RT: Recuento total de aerobios mesófilos



reaccionando rápidamente con moléculas orgánicas autodegradándose rápidamente hasta oxígeno, sin formar productos de reacción que deban ser eliminados. Una de las desventajas del ozono es que la materia orgánica interfiere en la deseada acción antimicrobiana. Por este motivo, el uso de mecanismos de filtración se considera esencial para aumentar la efectividad del ozono en sistemas de re-circulación de agua.

En trabajos llevados a cabo por el grupo de investigación del CEBAS-CSIC en el desarrollo del proyecto "Tratamientos con ozono de hortalizas mínimamente procesadas" (AGL 2001-1269), los lavados con agua ozonizada y agua ozonizada activada con luz UV han sido considerados como una alternativa prometedora al uso del cloro para la higienización de frutas y hortalizas. El ozono en disolución se aplicó en forma de baño activado por exposición a luz UV-C (Procesos de Oxidación Avanzada) garantizando la seguridad microbiológica de las muestras de lechuga "iceberg" en IV gama de forma semejante al lavado con hipoclorito. Además, el lavado con agua ozonizada y agua ozonizada activada con luz UV-C mantuvo la calidad sensorial y controló el pardeamiento de la lechuga sin causar una reducción en los constituyentes antioxidantes (11).

Recientemente en este grupo se han comparado diversos métodos de higienización en bastones de patata fresca donde se puso de manifiesto el efecto sinérgico del ozono con el ácido peroxiacético (8). Esto se debió a que los microorganismos supervivientes al tratamiento con estos agentes oxidantes fueron más sensibles durante la conservación.

El ozono gas se está utilizando actualmente en la industria a concentraciones muy bajas (0.2-1 ppm) durante tiempos de exposición muy prolongados, con el fin de inhibir el crecimiento fúngico durante la conservación a bajas temperaturas. En el CEBAS-CSIC, el ozono se está aplicando junto con la radiación UV-C para inducir la síntesis de compuestos beneficiosos para la salud, como es el ca-

so del resveratrol en uvas (12). En estudios recientes se ha observado el efecto beneficioso del choque de concentraciones elevadas de ozono para la eliminación de residuos de plaguicidas. Por tanto, el incluir un paso intermedio de tratamiento con ozono gas puede ser una buena alternativa para incrementar la seguridad de los productos vegetales en IV gama. La posible utilización de ozono gas como un tratamiento en el procesado de productos vegetales, debe ir acompañada de un estudio detallado que permita determinar las concentraciones máximas sin que la calidad del producto se vea perjudicada.

### Tecnologías de conservación

Se ha observado que la exposición de un producto a concentraciones muy elevadas de O<sub>2</sub> reduce el crecimiento microbiano en algunas frutas y hortalizas de IV gama, pero los resultados obtenidos varían mucho dependiendo del grupo microbiano diana y del producto en estudio. Las atmósferas sobreoxigenadas afectan al metabolismo y a las diferentes propiedades de los productos vegetales, tales como la respiración, el color, la tex-

tura y la carga microbiana (13). Se ha observado que cuando altas concentraciones de O<sub>2</sub> (> 70 kPa) se combinan con concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> (ª 15 kPa), se produce una clara inhibición del crecimiento microbiano y de las reacciones anaerobias de fermentación, así como de las reacciones de oxidación enzimáticas (14). Estas atmósferas sobreoxigenadas se están empleando con gran éxito a nivel experimental en fresa donde se ha observado que se mantiene la calidad de las mismas durante la conservación. Las atmósferas sobreoxigenadas pueden ser consideradas como una buena alternativa a las AM convencionales. Sin embargo, el envasado perfecto en AM con alto oxígeno, aún no ha sido desarrollado con éxito y por este motivo, nuevas tecnologías que permitan aplicar estos tratamientos son todavía demandadas por productores y distribuidores.

Es de esperar que el uso de combinaciones de tratamientos higienizantes y de otros métodos de conservación pueda tener efectos aditivos o sinérgicos. Actualmente, la industria del procesado en IV gama tiende al uso de métodos de conservación combinados menos agresivos para reducir al máximo la pérdida de las características del producto fresco, sin perjudicar con ello la seguridad del producto.

### Bibliografía

1. Gil, M.I. y Gorny, J.R. 2003. "Guía de seguridad alimentaria para la industria de productos vegetales frescos cortados". Editorial: Asociación Internacional de Productores de Vegetales Frescos Cortados (IFPA). 251 páginas. ISBN 800.452.6552.
2. PURAC. <http://www.purac.es/>
3. Behrsing, J., Winkler, S., Franz, P. y Premier, R. 2000. Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* on vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 187-192.
4. Inatsu, Y., Bari, M.L., Kawasaki, S., Ishihiki, K. y Kawamoto, S. 2005. Efficacy of acidified sodium chlorite treatments in reducing *Escherichia coli* O157:H7



- on chinese cabbage. *J Food Prot.*, 68: 251–255.
5. Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K. y Stroshine, R.L. 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, 35: 720–729.
  6. Gonzalez, R.J., Luo, Y., Ruiz-Cruz, S. y Mcevoy, J.L. 2004. Efficacy of sanitizers to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut carrot shredded under simulated process water conditions. *J Food Prot.*, 67: 2375–2380.
  7. Mendonca, A. Enhancing the microbial safety of fresh and fresh-cut melons. Presentation.
  8. Beltrán, D., Selma, M.V., Tudela, J.A. y Gil, M.I. 2005. Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 37–46.
  9. Loaiza-Velarde, J.G., Tomás-Barberán, F.A. y Saltveit, M.E., 1997. Effect of intensity and duration heat-shock treatments on wound-induced phenolic metabolism in iceberg lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122: 873–877.
  10. Delaquis, P.J., Stewart, S., Cliff, M., Toivonen, P.M. y Moyls, A.L., 2000. Sensory quality of ready-to-eat lettuce washed in warm, chlorinated water. *J Food Qual.*, 23: 553–563.
  11. Beltrán, D., Selma, M.V., Marín, A. y Gil, M.I., 2005. Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5654–5663.
  12. Gonzalez-Barrio, R., Beltrán, D., Cantos, E., Gil, M.I., Espin, J.C., Tomás-Barberán, F.A. Comparison of ozone and UV-C treatments on the postharvest resveratrol and viniferins induction in 'Superior' white table grapes. *J. Agric. Food Chem. Enviado.*
  13. Jacxsens, L., Devlieghere, F. y Debevere, J., 2001. Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. *Int. J. Food Microbiol.*, 71: 197–210.
  14. Allende, A., Jacxsens, L., Devlieghere, F., Debevere, J. Y y Artés, F., 2002. Effect of super atmospheric oxygen packaging on sensorial quality, spoilage, and *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas caviae* growth in fresh processed mixed salads. *J. Food Protect.*, 65: 1565–1573.

**AgroCSIC**

**CENTRO DEL CSIC:** Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS). Apartado de Correos 164, Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia  
**Departamento:** Ciencia y Tecnología de Alimentos; Grupo de Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales.  
**Nombre Investigador:** Dra. M.<sup>a</sup> Isabel Gil Muñoz. Investigador Científico del CSIC.  
**E-mail:** migil@cebas.csic.es  
**Líneas de Investigación:**

- Seguridad y calidad de frutas y hortalizas.
- Desarrollo científico-tecnológico de alimentos vegetales en IV y V gama.
- Control de los riesgos de contaminación microbiológica durante la producción, procesado y conservación de alimentos vegetales.

**El CTC**  
**en su calidad**  
**de ECA**  
**empresa**  
**colaboradora**  
**con la**  
**administración**  
**en materia**  
**ambiental,**  
**realiza**  
**las siguientes**  
**actividades:**

- Toma de muestras y análisis de aguas residuales y residuos sólidos.
- Realización de certificados ECA en materia ambiental.
- Realización de informes ambientales.
- Auditorías y diagnósticos ambientales.
- Asesoría en Legislación.
- Desarrollo de estudios y planes de adecuación ambiental.
- Declaraciones anuales de medioambiente.
- Certificaciones ambientales trianuales.

**CTC**  
**Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación**

**ECA**



**TALLERES MAXIMILIANO**



- **FABRICACIÓN DE APARATOS A PRESIÓN**
- **FABRICACIÓN SILOS PARA ÁRIDOS**
- **INSTALACIONES INDUSTRIALES Y AISLAMIENTO**
- **MAQUINARIA INDUSTRIAL**
- **MANTENIMIENTO**
- **DEPÓSITOS PARA ALMACENAMIENTOS PRODUCTOS PETROLÍFEROS Y QUÍMICOS**



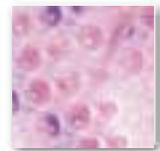
Polígono Industrial "Los Torraos" - Avda. España MI-2  
Teléfono: 968 690 332 - Fax: 968 690 266  
30562 CEUTÍ (Murcia)



# Instituto *de* Investigaciones Marinas



Identificación de especies  
pesqueras mediante ADN



Agrocsic

# Identificación de especies pesqueras mediante ADN

*Alrededor de 1990 comenzó un importante desarrollo y accesibilidad a diferentes técnicas de análisis de ADN, lo cual nos permitió plantearnos la posibilidad de investigar la adecuación y el desarrollo de métodos de identificación basados en este método.*

RICARDO I. PÉREZ MARTÍN, CARMEN GONZÁLEZ SOTELO. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MARINAS (CSIC).



Hace algunas décadas, la mayoría de los países Europeos consumían productos pesqueros capturados, de forma prácticamente exclusiva, por su propia flota y en casi todos los casos las capturas provenían de sus aguas territoriales. Ello restringía el consumo de pescado a un número muy limitado de especies, que eran generalmente bien conocidas por todos los agentes implicados en la cadena de captura, procesamiento y venta de los productos pesqueros. Habitualmente los pescados descartados eran especímenes enteros, incluso sin eviscerar, de uno o pocas especies que eran fácilmente clasificadas puesto que poseían todos sus caracteres morfológicos.

La situación ha cambiado considerablemente a lo largo de los últimos años, debido a toda una serie de factores. Uno de ellos ha sido el desarrollo espectacular de la tecnología de los buques de pesca en alta mar, capaces de navegar por todo el mundo, y otro, indudablemente, la mejora de los métodos de elaboración y conservación tanto a bordo como en tierra. Asimismo, el incremento y mejora del transporte aéreo, marítimo y terrestre y la globalización de los mercados han permitido que un número cada vez mayor de especies, tanto frescas como procesadas, aparezcan en nuestros mercados. Además, el alto grado de explotación de los recursos en las pesquerías clásicas, junto con el importante aumento de su consumo a nivel mundial, ha llevado a la

búsqueda y captura de especies alternativas, incrementando la diversidad de especies disponibles para el consumidor.

Paralelamente, las normativas relacionadas con la rotulación y etiquetado de los alimentos en general, y de los productos derivados de la pesca en particular, han ido apareciendo y desarrollándose de forma cada vez más exigente. Tanto a nivel nacional (Real Decreto 331/1999 para productos frescos y cocidos, modificado recientemente, y RD 1380/2002 para productos congelados) como a nivel Europeo, (Reglamento CE 104/2000 y 2065/2001) se exige la declaración de las especies empleadas como materia prima para la elaboración de alimentos. Además, para enero de 2005, está prevista la entrada en vigor de la necesidad de implementar los oportunos sistemas para garantizar la trazabilidad de los elementos que formen parte de los mismos, es decir, desde el mar a la mesa (Reglamento CE 178/2002). En un paso más a la hora de normalizar el etiquetado de los productos para el consumo humano, la Unión Europea ha dictaminado la implantación de una normativa de declaración de ingredientes (QUID: Quantitative ingredient declaration, Directiva de la UE CE 13/2000) por la cual se hace ne-



cesario no sólo identificar las especies que se han utilizado para la elaboración del alimento, sino también en qué cantidad esta presente cada una de ellas.

De entre los muy diversos grupos de especies pesqueras que se capturan y comercializan en todo el mundo destacan,

tanto por su valor comercial como por su alto consumo, una serie de ellos como los gádidos (bacalao, lirio, bacaladilla), los túnidos (albacora, listado, melva), los merlúcidos (merluza europea, chilena, austral), los salmónidos (salmón, trucha, reo), etc., apareciendo cada vez más frecuen-

FIGURA 1

Extracto de ADN de músculo de atún fresco y de músculo de conserva de atún. De izquierda a derecha 1: patrón de peso molecular, 2 y 3: ADN de músculo de atún fresco, 4: patrón de peso molecular, 5 y 6: ADN de músculo de atún en conserva.

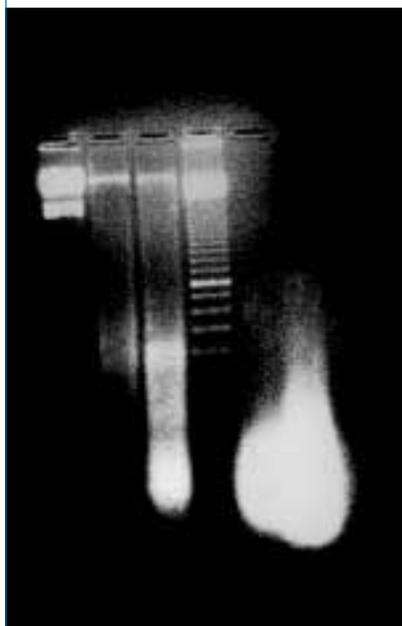
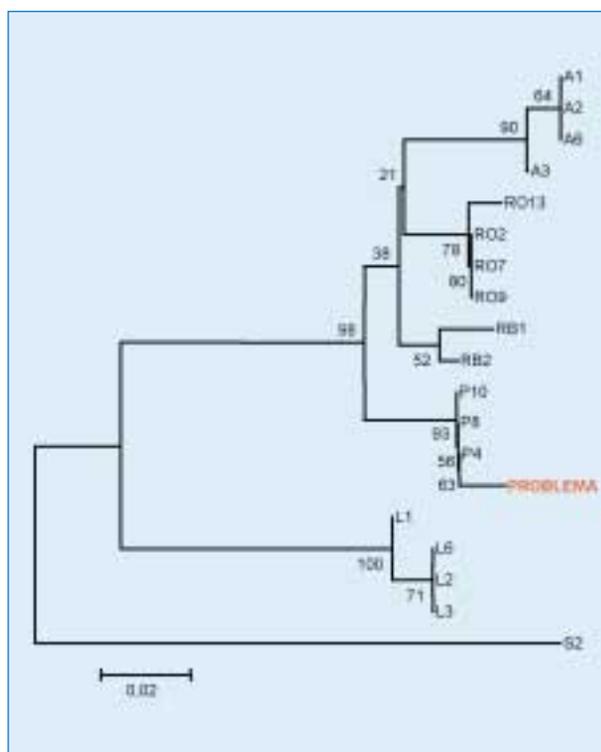


FIGURA 2

Identificación de especies mediante secuenciación de un fragmento del gen del citocromo b (FINS). En negro aparecen las especies de referencia de túnidos y en rojo la secuencia de la muestra problema. Claves de especies A: Albacora (*Thunnus alalunga*), RO: Rojo (*Thunnus thynnus*), RB: Rabil (*Thunnus albacares*), P: Patudo (*Thunnus obesus*), L: Listado (*Katsuwonus pelamos*), S: Sarda (*Sarda sarda*). La secuencia de la muestra problema es similar a las secuencias de Patudo (*Thunnus obesus*) y por lo tanto este es el resultado de la identificación.





temente en los mercados como presentaciones que suponen un cierto grado de elaboración y/o transformación previo de la materia prima que hace muy difícil, por no decir imposible, la correcta identificación de la especie o especies empleadas en su preparación. Dentro de cada

uno de estos grupos hay una o varias especies que son más valoradas que el resto por los consumidores. Debe decirse aquí que esta valoración relativa no siempre coincide de un país a otro, e incluso de una zona geográfica a otra. En cualquier caso, parece evidente que es

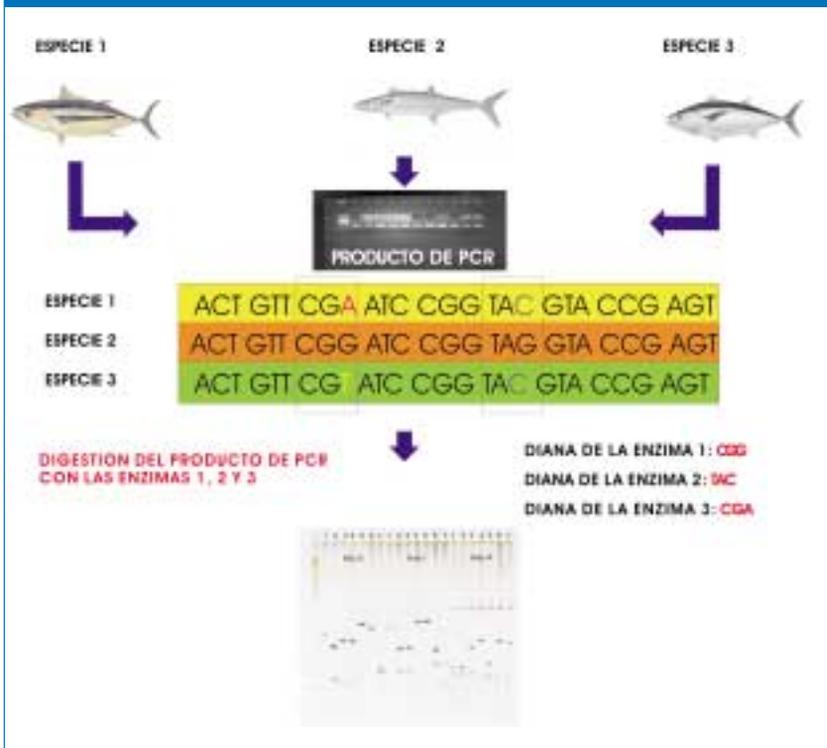
necesario disponer de herramientas que nos permitan una verificación fiable de las etiquetas que deben de acompañar a los productos que se comercializan, tanto al consumidor final como a cualquiera de los agentes que intervienen a lo largo de toda la cadena. En este artículo trataremos brevemente la identificación de las especies pesqueras presentes en cualquier alimento o producto.

### Identificación de especies pesqueras

La identificación de las especies biológicas se lleva a cabo utilizando los caracteres taxonómicos, definidos según Ayala (1983) como “cualquier atributo de un espécimen perteneciente a un taxón por el cual difiere o puede diferir de especímenes de un taxón diferente”. Los caracteres taxonómicos diagnóstico son únicos y definen específicamente un taxón particular (especie, género, familia, orden, etc...). Determinadas proteínas o la secuencia contenida en determinados fragmentos de ADN pueden utilizarse como caracteres diagnóstico de especie, género o familia (Sotelo y Pérez-Martín, 2003), estos se denominan caracteres taxonómicos bioquímicos. Así pues, el desarrollo de métodos que tengan utilidad a la hora de autentificar las especies presentes en un determinado producto pesquero, pasa por la disponibilidad de técnicas de análisis que revelen de una manera total o parcial, las diferencias en la secuencia de aminoácidos de algunas de las proteínas integrantes del producto o la secuencia nucleotídica de su ADN.

En el año 1987 se nos planteó, por parte de la industria conservera, la necesidad de identificar especies en conservas de túnidos. En aquel momento existía una normativa de ámbito nacional en la que se especificaba la materia prima a ser utilizada en las diversas denominaciones comerciales de conservas de atún; sin embargo no era posible, con los métodos analíticos disponibles en aquel momento, identificar dicha materia prima una vez elaborada la conserva. Mediante una colaboración con el prestigioso centro escocés *Torry Research Station*, se comenzó un proyecto de investigación cuyo objetivo era desarrollar una metodología de identificación de especies de túnidos mediante el análisis de las proteínas del músculo presente en las conservas. Los resultados de esta investigación evidenciaron que, si bien el análisis de proteínas mediante electroforesis permitía la diferenciación

**FIGURA 3: FUNDAMENTO DE LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE PCR-RFLP**



de especies en productos frescos y congelados, esto no era posible cuando se trataba de productos sometidos a un tratamiento térmico importante, como es el caso del proceso de esterilización de conservas.

Alrededor de 1990 comenzó un importante desarrollo y accesibilidad a diferentes técnicas de análisis de ADN, lo cual nos permitió plantearnos la posibilidad de investigar la adecuación del desarrollo de métodos de identificación basados en el análisis del ADN. Se planteó así un nuevo proyecto de investigación financiado por la Unión Europea en el que participaron, además de nuestro grupo, el grupo de Torry Research Station dirigido por el Dr. Ian Mackie, un grupo alemán del Instituto de Bioquímica y Tecnología de Hamburgo dirigido por el Dr. Harmut Rhebein y un grupo de la Universidad de Santiago de Compostela dirigido por el Dr. Manuel Rey.

El principal objetivo de este proyecto era determinar si el ADN del músculo de atún era estable a los tratamientos térmicos que sufre durante el proceso de elaboración de las conservas (cocción y esterilización) y si el ADN extraído de las conservas era adecuado para su análisis.

La extracción de ADN de las conservas de atún nos demostró que éste sufre un proceso de degradación importante, y si el tamaño medio del ADN extraído de muestras frescas o congeladas estaba alrededor de 20000 pares de bases, en las conservas este tamaño medio se reducía hasta un rango de entre 100 y 200 pares de bases (Figura 1).

Una de las técnicas de análisis de ADN más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Saiki et al., 1988). La PCR permite la copia de fragmentos de ADN específicos en poco tiempo y, a partir de un escaso número de moléculas molde, permiten el análisis de la secuencia contenida en dicho fragmento utilizando diversas técnicas. La PCR nos permitió la amplificación de fragmentos de hasta 200 pares de bases del ADN extraído de las conservas de atún (Quinteiro et al., 1998).

La secuenciación de fragmentos de citocromo b de las especies de túnidos



comerciales, permitió el diseño de cebadores (cadenas de ADN cortas, de 20 a 25 nucleótidos, que se utilizan para dirigir la amplificación del ADN a una zona determinada) que garantizaban la amplificación de ADN extraído de conservas de atún.

Entre los métodos de identificación más utilizados se encuentra el análisis de secuencias o FINS ("Secuenciación de nucleótidos con información forense"), en el cual se compara la secuencia de un determinado fragmento de ADN de la muestra problema con las secuencias disponibles para ese mismo fragmento de un grupo de especies de referencia. La muestra problema se agrupa con las secuencias pertenecientes a los individuos de la especie correspondiente permitiendo su identificación (Figura 2).

Uno de los requerimientos habituales de las técnicas de análisis de alimentos es que exista una elevada relación fiabilidad/coste y que además el tiempo de análisis sea lo más reducido posible. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue intentar buscar metodologías que no requirieran la utilización de secuenciación, una técnica que supone la utilización de un equipo de secuenciación de ADN no siempre disponible en los laboratorios de

análisis de alimentos, y que acortaran sensiblemente el tiempo de respuesta.

Una de estas técnicas es el análisis de los patrones de restricción de los productos de PCR (PCR-RFLP). Esta técnica consiste en una amplificación previa de un fragmento de ADN, y una digestión con enzimas que cortan el ADN en puntos en los que reconocen una secuencia determinada de entre 4 y 6 nucleótidos. Esta digestión genera fragmentos de ADN de pesos moleculares diferentes dependiendo de la especie (Figura 3) que se visualizan tras una electroforesis y una tinción con nitrato de plata.

Otro desarrollo interesante, y que ha sido también objeto de estudio en nuestro grupo de investigación, es la utilización de sondas específicas de ADN. Esta metodología está basada en la hibridación específica de una sonda diseñada para una determinada especie

y el ADN de las muestras a analizar. Solamente el ADN complementario a la sonda específica se hibridará con ella. Esta hibridación se visualiza con una reacción colorimétrica equivalente a la que se utilizan en los ensayos ELISA (Figura 4). En este proyecto se están desarrollando sondas para albacora (*Thunnus alalunga*), rabil (*Thunnus albacares*) y atún (*Thunnus spp.*). En el caso de lograr este objetivo se dispondría de un kit de autenticación de conservas de atún blanco (*T. alalunga*), atún claro (*T. albacares*) y de atún (*Thunnus spp.*) que solamente requeriría un termociclador para llevar a cabo una PCR para identificar estas especies de túnidos.

Por último, el desarrollo de técnicas de PCR acopladas a hibridación ha dado a esta técnica de múltiples posibilidades, una de ellas es la identificación de especies. La PCR a tiempo real consiste en la hibridación de una sonda de ADN, marcada con dos fluorocromos, en un fragmento de ADN situado entre los sitios de fusión de dos cebadores para un ensayo PCR. La emisión de fluorescencia es proporcional, durante los ciclos iniciales de la PCR, a la cantidad inicial de moléculas de ADN portadoras de la secuencia adecuada homóloga para que la sonda hibride con ellas. El ensayo se de-

nomina Taqman y, aunque en este momento existen diversas variantes, la base del mismo es similar en todas ellas. Si existen mezclas de diversos ingredientes, existirá una mezcla de los diversos ADN, y sólo aquél para el que se haya diseñado la sonda será detectado y cuantificado. Por lo tanto, hay una detección específica y además una capacidad para la cuantificación del ADN de una determinada especie.

Además del desarrollo de métodos de identificación para conservas de tónidos, nuestro grupo de identificación ha abordado proyectos de identificación y cuantificación de otras especies de pescado de importancia comercial tales como los gádidos (bacalao y especies afines), salmones, cefalópodos, sardinas, anchoas, peces planos, merluzas, esturiones (Rehbein et al., 1995, Quinteiro et al., 1998; Sotelo et al., 2001; Calo et al., 2003; Russell et al., 2000; Hold et al., 2001; Quinteiro et al., 2001; Chapela et al., 2002; página web <http://www.iim.csic.es/fsi>).

### Bibliografía reseñada

Ayala F.J. 1983. Enzymes as taxonomic characters. Systematics association special volume N°. 24. Protein polymorphism: adaptive and taxonomic significance, Oxford G.S., Rollinson D. (Editores). Academic Press, Londrés y Nueva York.

Calo-Mata P., Sotelo C.G., Pérez-Martín R.I., Rehbein H., Hold G.L., Russell V.J., Pryde S., Quinteiro J., Rey-Méndez M., Rosa C., Santos A.T. 2003. Identification of gadoids species using DNA based techniques. Eur. Food Res. Technol. 217:259-264.

Chapela M.J., Sotelo C.G., Calo-Mata P., Pérez-Martín R.I., Rehbein H., Hold G.L., Russell V., Pryde S., Quinteiro J., M., Rey-Méndez M., Rosa C. Santos A.T. 2002. Identification of cephalopod species (Ommastrephidae and Loliginidae) in seafood products by FINS (Forensically informative nucleotide sequencing). J. Food Sci. 67(5): 1672-1676.

Hold G.L., Russell V.J., Pryde S.E., Rehbein H., Quinteiro J., Rey-Méndez M., Sotelo C.G., Pérez-Martín R.I., Santos A.T., Rosa C. 2001. Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. Eur. J. Food Res. Tech. 212: 385-389.

Quinteiro J., Sotelo C.G., Rehbein H., Pryde S.E., Medina I., Pérez-Martín R.I., Rey-Méndez M., and Mackie I.M. 1998. Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in species Identification of Canned Tuna. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46:1662-1669.

Quinteiro J., R. Vidal, M. Izquierdo, C.G. Sotelo, R.I. Perez-Martin, H. Rehbein, G.L. Hold, V.J. Russell, S.E. Pryde, C. Rosa, A.T. Santos & M. Rey-Méndez. 2001. Identification of hake species

(merluccius genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. J. Agric. Food Chem. 49(11): 5108-5114.

Rehbein H., Mackie I.M., Pryde S., Gonzalez-Sotelo C., Pérez-Martín R.I., Quinteiro J., Rey-Méndez M. 1995. Fish species identification in canned tuna by DNA analysis (PCR-SSCP). Inf. Fisch. Wirtsch. 42(4): 209-212.

Russell V.J., Hold G.L., Pryde S.E., Rehbein H., Quinteiro J., Rey-Mendez M., Sotelo C.G., Pérez-Martín R.I., Santos A.T., Rosa C. 2000. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between Salmon species. J. Agric. Food Chem. 48: 2184-2188.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-490.

Sotelo C.G., Calo-Mata P., Chapela M.J., Pérez-Martín R.I., Rehbein H., Hold G.L., Russell V., Pryde S., Quinteiro J., Izquierdo M., Rey-Méndez M., Rosa C. Santos A.T. 2001. Identification of flatfish species using DNA based techniques. J. Agric. Food Chem. 49: 4562-4569.

Sotelo C.G., Pérez-Martín R.I. 2003. Species identification in processed seafoods. En Food authenticity and traceability. Lees M. (Ed.). Woodhead Publishing, London (UK). 2003. ISBN 1855735261. ■

dez M., Rosa C., Santos A.T. 2003. Identification of gadoids species using DNA based techniques. Eur. Food Res. Technol. 217:259-264.

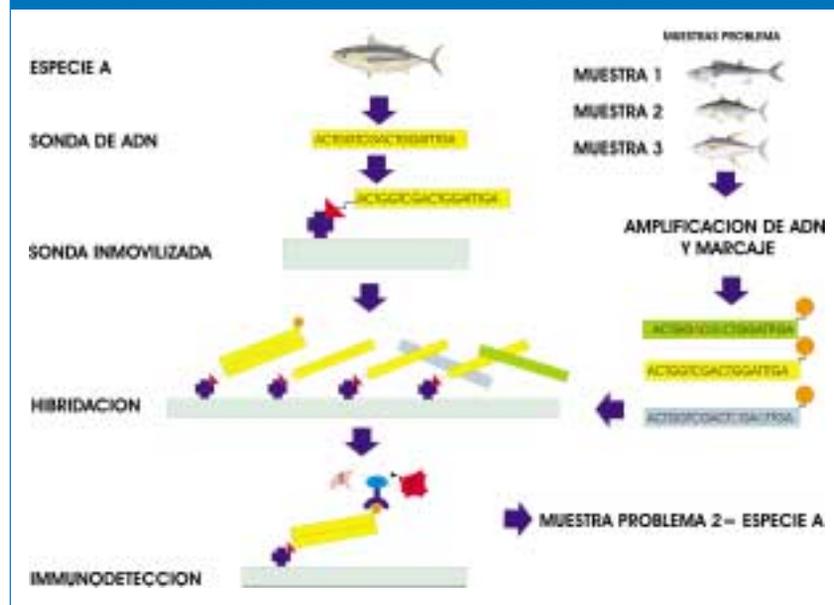
Chapela M.J., Sotelo C.G., Calo-Mata P., Pérez-Martín R.I., Rehbein H., Hold G.L., Russell V., Pryde S., Quinteiro J., M., Rey-Méndez M., Rosa C. Santos A.T. 2002. Identification of cephalopod species (Ommastrephidae and Loliginidae) in seafood products by FINS (Forensically informative nucleotide sequencing). J. Food Sci. 67(5): 1672-1676.

Hold G.L., Russell V.J., Pryde S.E., Rehbein H., Quinteiro J., Rey-Méndez M., Sotelo C.G., Pérez-Martín R.I., Santos A.T., Rosa C. 2001. Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. Eur. J. Food Res. Tech. 212: 385-389.

Quinteiro J., Sotelo C.G., Rehbein H., Pryde S.E., Medina I., Pérez-Martín R.I., Rey-Méndez M., and Mackie I.M. 1998. Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in species Identification of Canned Tuna. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46:1662-1669.

Quinteiro J., R. Vidal, M. Izquierdo, C.G. Sotelo, R.I. Perez-Martin, H. Rehbein, G.L. Hold, V.J. Russell, S.E. Pryde, C. Rosa, A.T. Santos & M. Rey-Méndez. 2001. Identification of hake species

FIGURA 4: FUNDAMENTO DE LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE PCR-ELISA



CENTRO DEL CSIC: Instituto de Investigaciones Marinas. Eduardo Cabello, 6. 36208 Vigo.

Web: [www.iim.csic.es](http://www.iim.csic.es)

Departamento: Tecnología de Alimentos. Nombre Investigador: Ricardo I. Pérez Martín y Carmen González Sotelo.

E-mail: [ricardo@iim.csic.es](mailto:ricardo@iim.csic.es) y [carmen@iim.csic.es](mailto:carmen@iim.csic.es)

Tendencias de Investigación:

- Autenticación de Alimentos: Desarrollo de métodos de identificación y cuantificación de especies presentes en alimentos mediante análisis de ADN.
- Trazabilidad de productos pesqueros: diseño e implantación de protocolos.
- Desarrollo de métodos de identificación y cuantificación de organismos unicelulares mediante el empleo de sondas de hibridación de ADN.
- Optimización de procesos de fabricación de productos pesqueros: evaluación integral de la calidad y de la rentabilidad.



crear

innovar



crecer

# PROGRAMA DE FINANCIACIÓN PARA PYMES. **ICO · INFO**

## HECHOS. **NO PALABRAS**

El Instituto de Crédito Oficial y el Instituto de Fomento han suscrito un Convenio con el objeto de **ayudar a las empresas de la Región de Murcia, especialmente a las PYMES y emprendedores.** Un programa donde proyectos de creación, ampliación e innovación no queden en simples palabras y se conviertan realmente en hechos.



Región de Murcia  
Consejería de Economía,  
Industria e Innovación



Instituto de Crédito Oficial



Unión Europea  
Fondo Europeo  
de Desarrollo Regional

Información:

Instituto de Fomento de la Región de Murcia  
968 36 28 39  
ifrm-murcia.es

Consejería de Economía, Industria e Innovación  
Oficina Sectorial de Atención al Ciudadano  
968 36 60 98  
carm.es/ctic

# La revista "CTC Alimentación" en formato "papel electrónico".

Desde hace varios meses se puede acceder a la revista "CTC Alimentación" en formato "papel electrónico" desde nuestro web <http://www.ctnc.es>.

Utilizando la solución "PAPEL a WEB" (<http://www.papelaweb.com>), ofrecida por la empresa The Useful Company S.L. (<http://www.u-company.com>), se ofrece una innovadora solución que permite disponer de forma on-line de la versión digital realista de nuestra revista. Esta tecnología digital permite incrementar el valor del original, añadiendo elementos interactivos como enlaces, videos o animaciones, enlazándolos con la web o el



sitio de comercio electrónico, creando así una verdadera herramienta de comunicación. Son muchas las ventajas de

este nuevo medio: desde realismo y usabilidad, que suavizan la curva de aprendizaje y aumentan el ratio de conver-

sión, hasta la reducción de costes de distribución, lo que facilita llegar a un público más amplio. Además, la experiencia se enriquece respecto a la publicación en papel, permitiendo nuevos medios de obtener rendimiento y conocer el uso que se hace de la misma.

El Centro Tecnológico Nacional de la Conserva se une así a importantes empresas de múltiples sectores de actividad que ya han confiado en "Papel a Web" como la solución ideal a sus necesidades de publicación de revistas o catálogos: La Tienda en Casa, Digital+, Esade, Infonomía, La Caixa, Tien21 o Endesa.

The advertisement features a dark orange background. At the top left is the 'Papel a web' logo with a mouse cursor icon and the URL <http://www.papelaweb.com>. At the top right, it says 'Es un producto de The Useful Company' with a logo. In the center, there is a stack of magazines, including one titled 'IF30'. Below this, there are three columns of text: 'Su organización invierte mucho tiempo y recursos en su imagen en papel (catálogo, revista, folleto, guía, memoria...)', 'Incremente la exposición de sus productos', and 'Amortice su inversión en imagen en papel'. Below these, it says 'Mejore su marketing multicanal'. At the bottom, it reads '...del papel, directo a Internet...' and '¡Oferta especial! para asociados'. Two laptops are shown at the bottom, one displaying a website with a paper graphic overlaid on the screen.



# Instituto *de* Química Orgánica General



Hacia el desarrollo de técnicas analíticas rápidas para la detección de tóxicos y contaminantes en alimentos



Agrocsic

# Hacia el desarrollo de técnicas analíticas rápidas para la detección de tóxicos y contaminantes en alimentos

*La creciente exigencia social en relación a la calidad y seguridad de los alimentos, esta impulsando una serie de cambios tanto en el sector industrial como en el científico.*

L. RAMOS, M.J. GONZÁLEZ. DPTO. ANÁLISIS INSTRUMENTAL Y QUÍMICA AMBIENTAL. IQOG, CSIC, JUAN DE LA CIERVA, 3. 28006 MADRID. EN COLABORACIÓN CON EL INSTITUTO DEL FRÍO. J. FONTECHA. DPTO. CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS PRODUCTOS LÁCTEOS, IF, CSIC, JOSÉ ANTONIO NOVAIS, 10. CIUDAD UNIVERSITARIA. 28040 MADRID.

La creciente exigencia social en relación con la calidad y seguridad de los alimentos está impulsando una serie de cambios tanto en el sector industrial, que tiende a desarrollar y a adoptar nuevos procesos más seguros, como en el ámbito científico, con el desarrollo de nuevas técnicas de evaluación analítica más sensibles, y a nivel institucional, a través de una legislación más estricta en el cumplimiento de las demandas. Estos cambios van encaminados a ofrecer al consumidor productos frescos y saludables en los que se preserven sus propiedades originales. Por motivos obvios, entre los aspectos que más atención reciben están los relacionados con el establecimiento de los límites máximos permitidos para determinadas sustancias consideradas tóxicas y/o alergénicas. Estos límites permiten garantizar la seguridad de los alimentos destinados al consumo humano y definir los controles necesarios sobre los mismos, para comprobar su cumplimiento y, en su caso, acceder a la detección rápida de eventuales episodios de contaminación.

En un intento de preservar la salud de los consumidores, la Unión Europea exige el control rutinario de un número cre-

ciente de tóxicos y alérgenos en una variedad cada vez mayor de matrices, a la vez que impone una mayor frecuencia para dichos análisis. Las sustancias sujetas a tales controles incluyen desde proteínas alergénicas a compuestos tóxicos generados bien como consecuencia del almacenamiento incorrecto de los alimentos o de sus materias primas. Estos últimos engloban a los formados por oxidación o hidrogenación durante las etapas de procesado industrial, o los asociados a procesos de contaminación, bien sea ésta consecuencia de prácticas industriales o agrícolas incorrectas que afectan al producto de partida, de contaminaciones accidentales en los propios tanques o instalaciones industriales, o de procesos de adulteración. La complejidad y laboriosidad de algunas de las determinaciones analíticas que hoy día deben ser realizadas de manera rutinaria y la reducción constante de los límites máximos permitidos de muchas de estas sustancias tóxicas ha originado, en algunos casos, un cierto "desajuste" entre las exigencias analíticas derivadas de las legislaciones que se pretenden aplicar y las posibilidades reales de los laboratorios implicados de llevar a cabo las determi-

naciones exigidas en el tiempo y forma estipulado. En relación con estas limitaciones, cabe también apuntar que, si bien los avances tecnológicos de las dos últimas décadas en el campo de la instrumentación analítica permiten disponer en la actualidad de detectores más sensibles y selectivos, muchos de los procedimientos de preparación de muestra habitualmente empleados han evolucionado poco. En general, el objetivo de estos procedimientos es la extracción de los analitos de la matriz estudiada y la purificación progresiva de los extractos obtenidos hasta llegar a conseguir una fracción concentrada, lo más pura posible, que contenga los compuestos de interés. Es relativamente frecuente que la etapa de análisis instrumental de ese extracto

La Unión Europea ar  
rutinario de un nume





concentrado y purificado implique el uso de equipos sofisticados capaces de dar una respuesta inequívoca en el intervalo de minutos u horas. Sin embargo, los tratamientos previos necesarios para obtener dicho extracto a partir de la matriz original se basan en el uso de técnicas tradicionales que, aunque eficaces y bien establecidas, se caracterizan por su elevado consumo de tiempo (e.g. los tiempos típicos implicados en una extracción líquido-líquido –LLE– o con Soxhlet oscilan entre 1-24 horas), de disolventes orgánicos y adsorbentes y falta de automatización. Existe por tanto una necesidad real y creciente de adaptar estas técnicas clásicas de preparación de muestra que, por sus características, ralentizan el proceso analítico global. Los esfuerzos reali-

zados en la última década en este campo de investigación han llevado a la adaptación de algunos de los métodos clásicos, pero también al desarrollo de nuevas técnicas. Una de las aproximaciones más afortunadas para conseguir este objetivo ha sido el desarrollo de sistemas acoplados en serie (“at-line” u “on-line”), con o sin automatización. En este campo, la miniaturización de los dispositivos se ha revelado como un factor clave para desarrollar sistemas analíticos integrados capaces de aumentar de manera significativa la capacidad de procesar muestras y la autonomía.

#### Adaptación de técnicas clásicas

A este grupo pertenecerían técnicas ya ampliamente aceptadas en los laborato-

rios implicados en el control rutinario de tóxicos y alérgenos en alimentos, como el Soxhlet, una versión semiautomática del Soxhlet en la que se consigue una reducción drástica del tiempo de extracción (de 6-24 h a 1-2 h) gracias a que la extracción se produce en caliente; o el más novedoso Soxhlet asistido por microondas focalizadas (Focused Microwave-assisted Soxhlet Extraction, FMSE) que ya se ha relevado como una interesante alternativa para aplicaciones tan dispares como la monitorización rápida de la calidad del aceite de alimentos prefritos o la determinación de niveles residuales de contaminantes en semillas oleaginosas. En esta técnica, la irradiación del cartucho de extracción con microondas favorece la eficacia de la extracción, lo que permite una reducción significativa del tiempo de extracción (menos de 1 h) sin que las recuperaciones o la reproducibilidad se vean afectados en relación con los valores obtenidos con el Soxhlet convencional.

mplia sus exigencias en el control  
pero creciente de tóxicos y alérgenos.

## Otra técnica que ha sido también ampliamente empleada es la FSE o extracción con fluidos supercríticos.

La FMSE también permite la reducción del consumo de disolvente (en general, menos de 30 ml), elimina la necesidad de ajustar el contenido en agua de las muestras antes de su análisis y, puesto que puede ser integrada en un sistema de inyección en flujo (Flow Injection Analysis, FIA), permite su acoplamiento con los subsiguientes procesos de purificación y análisis instrumental dando lugar a sistemas integrados semiautomáticos de análisis. Este hecho, a su vez, redonda en una reducción adicional de los tiempos de análisis por muestra ya que elimina la necesidad de la concentración de los extractos entre tratamientos sucesivos. Al tratarse de un sistema cerrado, se reduce también de manera importante el riesgo de degradación, contaminación y/o pérdida de los analitos, algo de especial relevancia en el caso de compuestos lábiles, traza o volátiles, así como la posible exposición del operario a disolventes y reactivos tóxicos.

Otra técnica que ha sido ampliamente empleada en el campo del análisis de alimentos desde los 80, y que comparte con la FMSE todas las ventajas propias de un sistema de extracción cerrado, es la extracción con fluidos supercríticos (Supercritical Fluid Extraction, SFE). El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en condiciones supercríticas es el agente extractor más habitualmente empleado en SFE porque no presenta el carácter corrosivo de otras sustancias, como el agua, tiene un precio razonable, no genera residuos, ya que se puede disipar en el aire tras su descompresión, y su polaridad puede ser modificada de forma relativamente sencilla. Por sus características, la SFE parecía desde su introducción una técnica adecuada para su acoplamiento con sistemas de separación-detección como la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) o de gases (GC). Sin embargo, a pesar de la aparente sencillez de estos acoplamientos por la facilidad de compatibilizar los fluidos y disolventes empleados en las diferentes etapas del proceso analítico, la automatización e integración de la SFE con sistemas cromatográficos sigue presentando serios problemas instrumentales por la dificultad para recuperar las altas presiones y temperaturas necesarias al comienzo de cada nueva extracción.

Uno de los principales atractivos de los sistemas integrados es que permiten una reducción en línea del tamaño de muestra de partida, de gran interés en los casos de disponibilidad limitada de ésta, sin pérdida apreciable de sensibilidad. Esto presenta indudables ventajas también desde el punto de vista analítico, ya que se promueve una disminución en línea de las cantidades de adsorbentes, disolventes y reactivos necesarios para su tratamiento, incluso en el caso de que se sigan empleando técnicas clásicas de preparación de muestra. Pero este ahorro en el gasto de fungible no es la única ventaja asociada a este escalado de los métodos de pretratamiento de muestra. Por un lado, hay que mencionar que muchos de los procesos de extracción se pueden ver favorecidos y algunas de las principales limitaciones de técnicas clásicas obviadas. A modo de ejemplo, cabe mencionar que en el caso de la LLE, la reducción del tamaño de las fases implicadas en la extracción suele favorecer la evolución de las emulsiones, tan comunes en estos procesos, con la consecuente reducción en el tiempo de análisis y mejora en la reproducibilidad de los resultados. Además, al reducirse el tamaño de la muestra, la proporción agente extractor/muestra puede ser fácilmente aumentada con la consecuente mejora en la eficacia de la transferencia de los analitos de la matriz a la fase extractora sin incremento final del gasto de disolvente. No obstante, probablemente una de las mayores ventajas asociadas a la reducción del tamaño de muestra es que permite el empleo de ciertas técnicas mo-

dernas de separación caracterizadas por su alta capacidad de resolución pero reducida capacidad de carga. A este grupo pertenecerían técnicas que ya han demostrado su eficacia para el análisis rápido de tóxicos y, sobre todo, alérgenos en diferentes alimentos como la electroforesis capilar (Capillary Electrophoresis, CE) o la aún no tan desarrollada cromatografía líquida capilar. La existencia de equipos automáticos en los que la CE se combina con sistemas on-line de preparación de muestra, en general basados en el uso de extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) miniaturizada con adsorbentes preferiblemente selectivos y/o diálisis, son una prueba del potencial de este tipo de sistemas en el campo alimentario.

En esta misma línea de adaptación de las metodologías clásicas, en la que la miniaturización de los sistemas para su integración en un sistema "on-line" susceptible de ser robotizado y/o automatizado aparece como la etapa clave, cabe finalmente destacar la reciente introducción de un sistema microondas de reducidas dimensiones acoplado, mediante su integración en un sistema FIA, con cromatografía de líquidos (LC) que sin duda abre un interesante abanico de posibilidades analíticas también para el análisis de alimentos.

### Desarrollo de nuevas técnicas

La segunda vía de investigación para intentar superar las principales limitaciones de los métodos clásicos de preparación de muestra ha sido el diseño y desarrollo de nuevas técnicas analíticas. Esta



línea de trabajo ha dado lugar en los últimos años a interesantes aproximaciones cuyas innegables ventajas han hecho que su uso se haya difundido de manera rápida en distintas áreas de investigación, incluida la de alimentos. La dispersión de la matriz en fase sólida (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD) y la extracción con líquidos presurizados (Pressurised Liquid Extraction, PLE) se encuentran entre las de uso más extendido.

La MSPD es una técnica patentada en 1989 por Barker y colaboradores. Consiste en la dispersión de la muestra sólida o semisólida estudiada en la superficie de un adsorbente apropiado. La mezcla homogeneizada se empaqueta en una columna y se extrae con el disolvente o serie de disolventes elegidos. En principio, una elección adecuada del adsorbente permite la retención selectiva de (ciertos) interferentes, con lo que la elución con un disolvente apropiado puede conducir a la extracción selectiva de los analitos de interés, o lo que es lo mismo, a la obtención de un extracto listo para ser analizado en la técnica de separación-detección elegida sin necesidad de purificación adicional. La simplificación del proceso de preparación de muestra, con la consecuente disminución de coste tanto en términos de tiempo como de fungible, han hecho que esta técnica resulte particularmente atractiva para su aplicación en análisis rutinarios de monitorización, incluido los desarrollados en el campo alimentario. El incontable número de aplicaciones y métodos publicados basados en MSPD durante los últimos años y la variedad de las mismas es la mejor prueba de ello. Las últimas tendencias en este campo se orientan hacia la miniaturización de las columnas, en las que se empaqueta la mezcla obtenida mediante MSPD, ya que ello permite su integración en un sistema de válvulas similar al empleado en los equipos automáticos y programables comerciales de SPE miniaturizada y para los que el acoplamiento con LC o GC es hoy algo inmediato. Las ventajas de estos métodos miniaturizados de MSPD han sido fehacientemente demostrados en diferentes estudios publicados en los últimos años, por ejemplo, para el análisis de pesticidas en frutas y vegetales de distinta naturaleza, en los que la



Nuevas técnicas: dispersión de la matriz en fase sólida MSPD y PLE extracción con líquidos presurizados.

# Las legislaciones cada vez más restrictivas, exigen un control exhaustivo de la presencia de sustancias nocivas.

preparación de la muestra puede ser completada en tan sólo 10 min. utilizando cantidades de muestra y adsorbente del orden de 25 mg y volúmenes de disolvente en torno a los 100 µl. Cantidades sólo algo mayores (unos 100 mg de muestra y varios ml de disolvente) son suficientes para la determinación de contaminantes traza, como los congéneres tóxicos individuales de bifenilos policlorados (PCBs), en alimentos grasos de origen animal cuando se utilizan métodos basados en esta técnica.

Aunque por sus características la MSPD parece particularmente adaptada para su aplicación a muestra semisólidas o sólidas, puede ser también empleada para la preparación de muestras líquidas previamente liofilizadas.

Algo similar sucede con la PLE, una técnica que desde su introducción en 1995 ha experimentado un crecimiento espectacular, hasta el punto de poder ser considerada en la actualidad como una alternativa valiosa, y en algunos casos superior, a métodos de extracción convencionales como el Soxhlet, el Soxtec o los ultrasonidos. Por sus características y flexibilidad (puede ser empleada con disolventes acuosos y orgánicos en un amplio intervalo de presiones y temperaturas), su eficacia se ve mucho menos afectada por las pequeñas variaciones en la composición de la matriz a investigar de lo que en ocasiones se ha observado para la SFE. Puesto que en general utiliza temperaturas y presiones inferiores a las

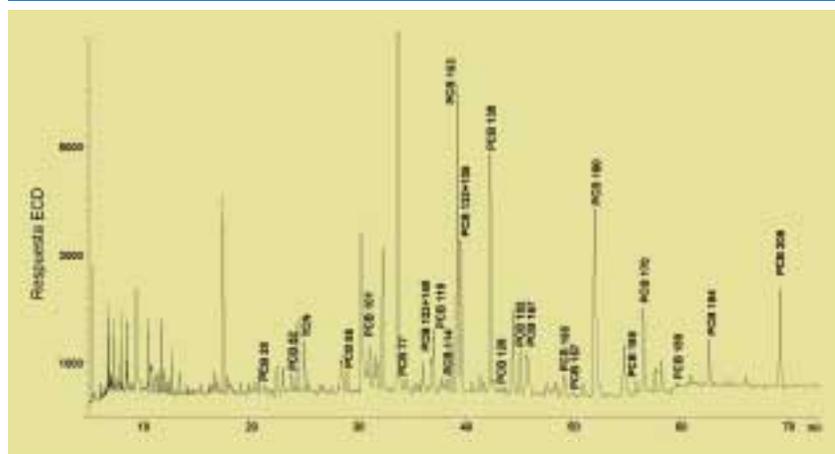
de la SFE, su instrumentación resulta menos costosa; mientras que la sencillez de su fundamento y el hecho de no necesitar la etapa posterior de filtración de los extractos, típica de la MAE, han hecho que hasta ahora haya sido, de algún modo, preferida a la hora de desarrollar sistemas integrados (o acoplados) de preparación de muestra.

En los últimos años se ha intentado el acoplamiento directo de esta técnica con sistemas automáticos o semiautomáticos de purificación y con las técnicas instrumentales elegidas para la determinación de los analitos durante el análisis de contaminantes traza, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, PCBs y policlorodibenzo-*p*-dioxinas y furanos, en distintas matrices, incluyendo los alimentos. Sin embargo, lo cierto es que los problemas asociados a la compatibilización de los flujos y disolventes empleados en las diferentes etapas del proceso analítico, han llevado a la configuración de sistemas demasiado sofisticados y caros como para poder ser empleados en laboratorios de rutina por parte de personal no especializado. De nuevo, la solución a muchos de estos problemas parece pasar por el desarrollo de sistemas de PLE miniaturizados en los que una cantidad de muestra del orden de mg sea extraída con un volumen de disolvente suficientemente pequeño (en el intervalo µl-ml) como para permitir su transferencia directa y completa al sistema de medida. En la bibliografía reciente se pueden encontrar

algunos ejemplos que demuestran las ventajas prácticas de este tipo de aproximación, así como su adecuación para la determinación rutinaria de contaminantes tóxicos, como PCBs, en alimentos, siendo su principal limitación el hecho de que aún no existen equipos comerciales de estas características.

Por todo ello y como consecuencia del desarrollo de legislaciones más restrictivas, que exigen un control más exhaustivo de la presencia de estas sustancias nocivas en alimentos, se requiere del desarrollo de nuevas técnicas analíticas más rápidas y sensibles para la detección de tóxicos y alérgenos en alimentos, así como de métodos de evaluación de la toxicidad de componentes, aditivos y contaminantes. Es necesario, por tanto, potenciar los estudios que permitan seguir profundizar en las condiciones de formación de compuestos eventualmente tóxicos que pueden aparecer en los alimentos durante su industrialización, almacenamiento y/o su tratamiento culinario. En este sentido, sería conveniente impulsar el desarrollo de procesos alternativos, u otros recursos, para controlar y evitar en lo posible la formación de dichos compuestos. Se pretende, en definitiva, poder prevenir y en su defecto abordar de forma rápida y eficaz posibles casos que se presenten con motivo de emergencias sanitarias o incluso casos de barreras que frenen o limiten la salida de los productos españoles a los mercados internacionales. ■

FIGURA 2





# Instituto *de* Investigaciones Químicas *y* Ambientales



Procesos para la obtención de aditivos alimentarios a partir de residuos de la industria agroalimentaria gallega



Agro **csic**

# Procesos para la obtención de aditivos alimentarios a partir de residuos de la industria agroalimentaria gallega

MEDINA, I., TORRES, J.L., NÚÑEZ, M.J. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MARINAS (CSIC, VIGO). DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA. UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y AMBIENTALES (CSIC, BARCELONA)



*La inmensa producción de residuos que supone la normal actividad del hombre es uno de los principales problemas con los que nos encontramos en la actualidad. Por ello se hace necesaria la búsqueda de procesos que permitan utilizar estos residuos para diversas aplicaciones, con lo cual se podrían obtener además importantes ingresos económicos, ya que esta posibilidad crea nuevas fuentes de riqueza que aportan una mayor rentabilidad al proceso industrial de partida.*



Los residuos agroindustriales, cuya eliminación suele suponer un problema de gestión para las empresas productoras, son fuentes especialmente atractivas por su contenido en compuestos de diferente naturaleza, como azúcares, pigmentos, fibra alimentaria, proteína, polifenoles, lignina,.... La extracción de estas distintas sustancias revalorizaría así una fracción de desecho, y originaría compuestos útiles en el campo alimentario, médico, ó en el sector químico. Entre los residuos agroalimentarios abundantes en Galicia destaca sobre todos el bagazo de uva, aunque también tiene cierta importancia el de manzana. Ambos han sido utilizados tradicionalmente como abono, ó enviados a plantas que realizan compostaje a partir de materias vegetales. Pero un análisis previo de los bagazos revela en ambos la presencia de compuestos fenólicos, que se podrían emplear como aditivos antioxidantes una vez fraccionados e identificados.

En la industria agroalimentaria gallega juega un papel primordial la industria

vitivinícola. A finales de los años 90 la producción de uva para vinificación se acercaba a 250.000 Tn, la gran mayoría en las provincias de Pontevedra y Orense, provincia esta última donde las empresas de este sector suponen más del 45% de las industrias agrarias. La producción de uva para vinificación origina unas 62.000 Tn anuales de bagazo crudo, cantidad que se reduce tras ser procesada en alcohola, siendo los bagazos de estas últimas industrias el principal subproducto a revalorizar. A menudo el proceso de destilación no altera en gran medida los polifenoles del bagazo, e incluso en ocasiones tras la destilación se detecta un aumento de la capacidad antioxidante.

En cuanto al bagazo de manzana residuo de la fabricación de sidra, proceso que en Galicia realizan al menos dos empresas (Galicia Manzanera y Sidrería Gallega), la cantidad anual se puede estimar en unas 10.000 Tn anuales, con tendencia al alza, ya que p.e en la provincia de Lugo las plantaciones se han cuadruplicado en los últimos años; esta evolución favorecerá presumiblemente el procesa-

do industrial hacia sidra, y por tanto la cantidad de bagazo generado.

Las técnicas de extracción de distintos compuestos son variadas, abarcando desde la tradicional extracción con disolventes hasta procesos de extracción supercrítica. Si el objetivo es aislar los compuestos polifenólicos potencialmente útiles como aditivos antioxidantes en alimentos, los disolventes más utilizados han sido agua, metanol y etanol, pudiendo en ocasiones el rendimiento en estas sustancias con ayuda de enzimas hidrolíticas.

La extracción con fluidos supercríticos (SFE), que se basa en las propiedades físico-químicas que adquieren algunas sustancias cuando se les somete a presiones y temperaturas cercanas a los valores críticos tiene gran importancia en el aislamiento de antioxidantes. Se ha demostrado en ocasiones que la actividad de los antioxidantes obtenidos por CO2 supercrítico es más alta que la de aquellos procedentes de técnicas tradicionales. En el caso de extracción de compuestos polares se puede añadir una baja proporción de un modificador como etanol.

En este artículo se pretende extraer compuestos antioxidantes de naturaleza polifenólica a partir de bagazos de uva y manzana. El primer objetivo es obtener un extracto optimizado en cuanto a su potencia antioxidante y relacionar estos resultados con el contenido en polifenoles. Por ello se ha empleado la extracción con disolventes, una técnica de fácil realización y de elección cuando se realiza a nivel de laboratorio en gran número de experimentos que permitan optimizar determinados parámetros.

### Bagazo de uva

El término bagazo es utilizado en Galicia para designar el orujo como residuo de vinificación (el reglamento vitivinícola de la CEE lo define como el residuo resultante del prensado de las uvas frescas, fermentado ó no fermentado). El bagazo está compuesto por raspón, hollejo, pepitas y residuos orgánicos y minerales procedentes de las uvas; se estima que de 100 Kg. de uvas se obtienen unos 20-25 Kg. de bagazo, cantidad que disminuye si lo que se emplea es "bagazo de alcohola", es decir, el residuo de la posterior destilación para obtener aguardiente, que queda empobrecido particularmente en hollejo. Las proporciones de los distintos componentes del bagazo varían considerablemente con el tipo de uva. Así, p.e. la variedad Mencía tiene una propor-

FIGURA 1: DESTILACIÓN DEL BAGAZO DE UVA

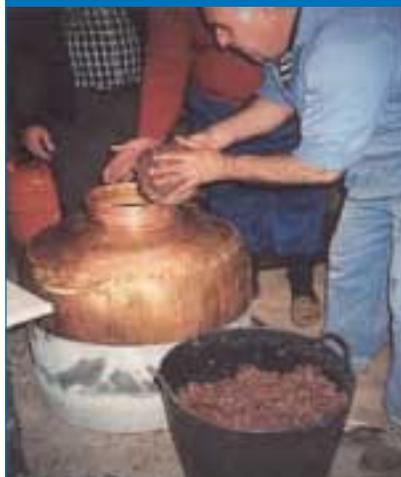
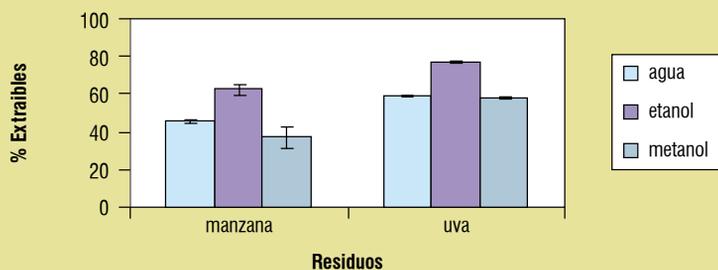


FIGURA 2: PENSADO DE LA MANZANA EN EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE SIDRA



FIGURA 3: EXTRAÍBLES EN LOS DISTINTOS RESIDUOS

Rendimiento máximo de extracción



ción de raspón 3 veces menor que la variedad Godello, siendo bastante más alta la proporción de hollejo y pepitas.

Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran preferentemente en la piel y en las pepitas; la piel contiene un 7.8% de las catequinas totales de la uva y un 17% de los taninos. En las pepitas el contenido es mucho mayor, pues contienen el 92% de las catequinas y el 80% de los taninos totales de la uva; se deduce que el contenido de estos compuestos en el hollejo es baja. La cantidad y calidad de polifenoles en la uva depende sobre todo de la variedad, clima, terreno y de las prácticas de cultivo.

### Bagazo de manzana

El bagazo de manzana proviene principalmente de la industria de sidra y zumos, aunque en este artículo se considerara solo el de sidra, dado que el resultante de la industria de zumos, por el proceso de obtención está muy empobrecido en compuestos antioxidantes. Los desechos de la sidra son ricos en polisacáridos, y se consideran una importante fuente de fibra dietaria; contienen también compuestos polifenólicos, entre otros ácido clorogénico y presentan una cierta proporción de taninos condensados.

Aunque el prensado para obtener el zumo se lleva a cabo en prensas similares a las empleadas con uva, en el caso de la manzana se suele previamente triturar para conseguir una pasta que macera durante cierto tiempo, en el que se oxida y ablanda. Este ablandamiento es debido a las sustancias pécticas de la manzana.

### Proceso de extracción

Los bagazos de uva fueron proporcionados por las empresas Vitivinícola del Ribeiro (Leiro, Orense) y Aguardientes de Galicia (Vedra, A Coruña), en tanto que el bagazo de manzana lo proporcionó CIBER (Porriño, Pontevedra). Estos materiales se caracterizaron en cuanto a humedad y contenido en extraíbles (en este caso en agua, metanol y etanol), mostrándose los resultados en la Tabla 1 y la Figura 3.

Como se puede comprobar, el etanol fue el mejor disolvente extractor, y el bagazo de uva el residuo que más extraíbles contiene, con un porcentaje que casi alcanza el 80%, siendo el 60% para manzana. De todas formas, más que los extraíbles interesa cuantificar los polife-

noles y su poder antioxidante, lo que se llevará a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) y la captación de radicales libres (% Inhibición, DPPH), (Brand-Williams et al, 1995).

Un aspecto importante y que a veces se olvida es la optimización del rendimiento de extracción. Lo llevamos a cabo mediante un diseño factorial de experimentos, variando tres parámetros, temperatura, tiempo de extracción y relación líquido/sólido. Sus rangos de variación fueron de 30-90 min, de 25-50°C y L/S entre 1 y 5. En cada experimento utilizamos 10g. de bagazo de manzana y 20 g. de bagazo de uva. En el caso de uva se ensayaron distintas variedades; como resumen se puede decir que en bagazos de prensado las uvas tintas ofrecieron mejores resultados, pero en cuanto a poder antioxidante, los bagazos de alcoholera procedentes de uva blanca se mostraron superiores. En todos los casos, los mejores resultados para actividad antioxidante se obtienen para las mayores temperaturas y las más bajas relaciones líquido-

sólido. En uva, el efecto del tiempo fue variable, en tanto que en bagazo de manzana los tiempos largos proporcionaron los mejores resultados. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en las condiciones óptimas para los dos alcoholes, disolventes que ofrecieron los mejores resultados. Los datos de bagazo de uva presentados corresponden a una mezcla de variedades tintas de bagazos de prensado, procedentes de la zona del Ribeiro. Destaca la alta actividad antioxidante del bagazo de uva, pero también que el % de extraíbles queda muy lejos del máximo obtenible.

En las condiciones óptimas encontradas se procedió a nuevas extracciones empleando una cantidad de materia prima de partida 4 veces mayor, a fin de obtener una cantidad suficiente de extracto para proceder a una primera purificación e identificación de componentes. Se obtiene tras la purificación un extracto acuoso y otro denominado **OW** en el que van las sustancias solubles en agua y acetato de etilo. Realizada una primera identificación por HPLC-Masas, se con-

FIGURA 4

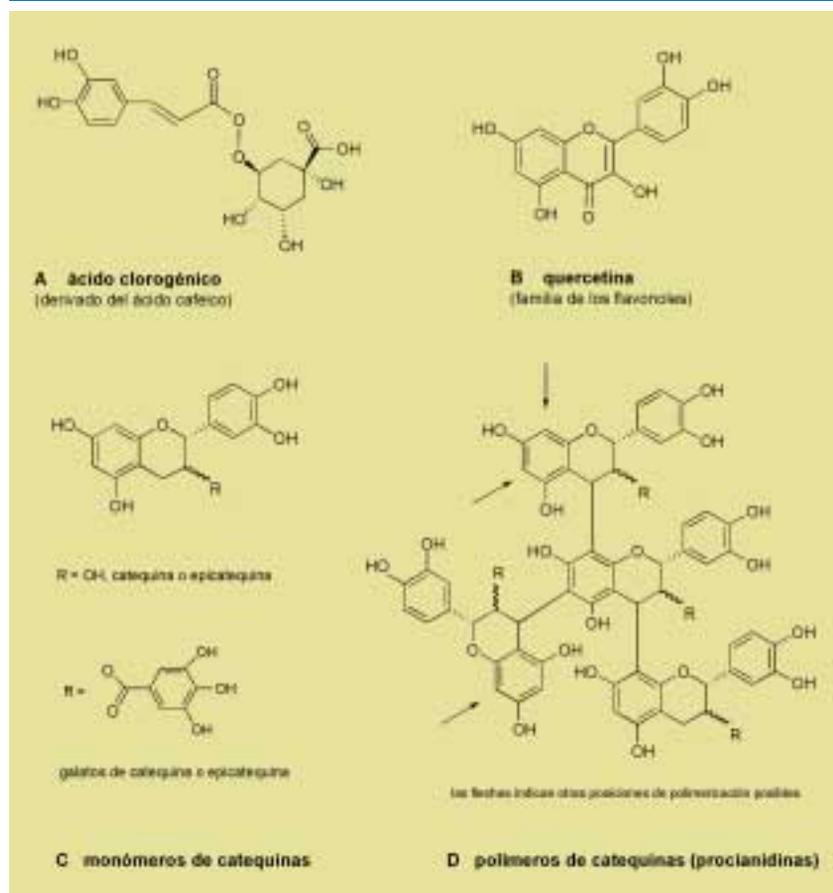
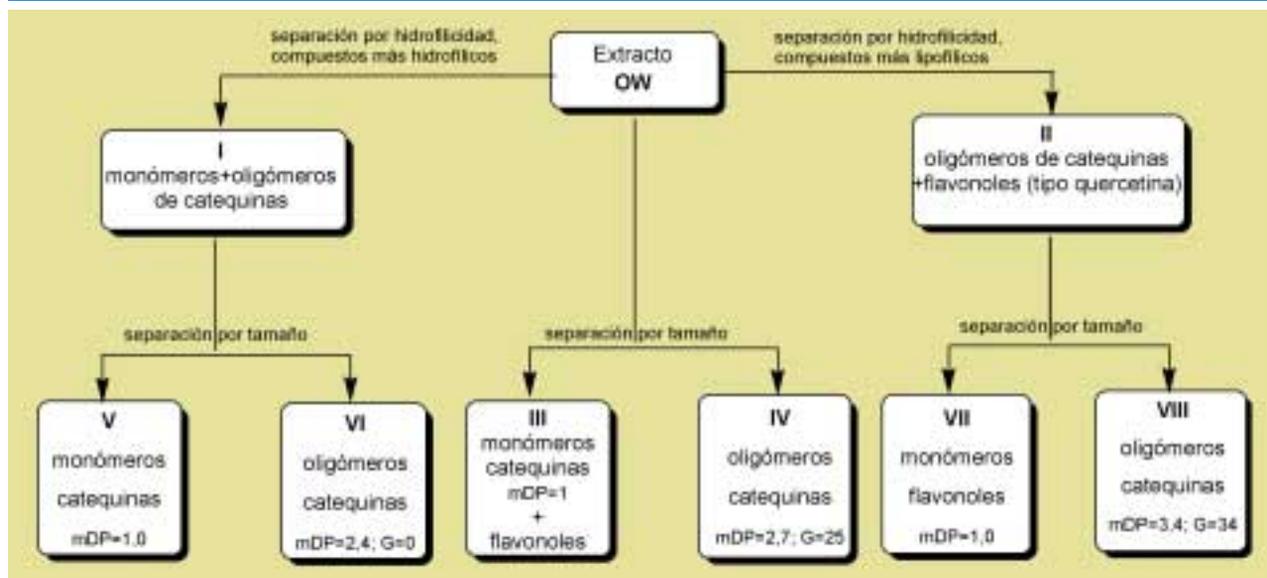


FIGURA 5: ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTO POLIFENÓLICO DE BAGAZO DE UVA



cluye que los polifenoles mayoritarios en los bagazos de uva y manzana son:

**Bagazo de Uva:** derivados de ácido gálico, quercetina, catequinas y resveratrol.

**Bagazo de manzana:** derivados de ácido clorogénico, p-cumárico, quercetina y luteolina.

Dado que todos estos compuestos pueden tener importantes y diversas aplicaciones, se impone el fraccionamiento a fin de identificar las distintas fracciones y proceder a su aplicación como aditivos alimentarios por separado, para seleccionar las más adecuadas.

### Fraccionamiento

Todos, o la gran mayoría de los componentes de los extractos polifenólicos son posibles antioxidantes porque son capaces de captar y desactivar los llamados radicales libres, que, como se ha comen-

tado, están en el origen del deterioro de la mayoría de alimentos. Sin embargo, no todos los componentes de los extractos son igualmente eficaces porque hay que tener en cuenta que para actuar como tales, los antioxidantes han de llegar al lugar del alimento donde se producen las oxidaciones o donde se acumulan los radicales. Dado que la mayoría de los alimentos son sistemas complicados, en los que el agua, los lípidos y las proteínas forman estructuras muy ordenadas, la eficacia de un antioxidante, además de su capacidad intrínseca de captar radicales, dependerá de su capacidad de distribuirse por el alimento y llegar a su lugar de acción. Un factor muy importante relacionado con la efectividad de un antioxidante es su tendencia a disolverse preferentemente en agua (hidrofiliidad), en aceite (lipofiliidad), o en ambos (amfiliidad).

El tamaño y la flexibilidad del antioxidante son características relacionadas con las anteriores. En la Figura 4 se muestra la estructura de algunos de los componentes mayoritarios de los extractos de manzana y uva. Por ejemplo, si nos fijamos en la Figura 4, apartados C y D, aunque las unidades constituyentes son las mismas (catequina o epicatequina), a efectos de eficacia antioxidante no es lo mismo que éstas estén en forma monomérica (C) u oligomérica (pequeños polímeros) (D), como se verá más adelante. Además, el hecho de que los monómeros o polímeros pueden contener unidades de galato (Figura 4) también tiene su importancia.

Existen técnicas cromatográficas, (separación por paso a través de una columna rellena con un polímero que discrimina unos componentes de otros) que nos han permitido obtener fracciones

FIGURA 6: APARATO PARA EL FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO POLIFENÓLICO



que contienen polifenoles con componentes de diferente tamaño e hidrofiliidad. Esto se consiguió mediante el empleo de dos rellenos distintos, uno que separa mayoritariamente por hidrofiliidad y otro que separa mayoritariamente por tamaño. En la Figura 5 se muestra el esquema utilizado para obtener, a partir del extracto **OW** de bagazo de uva, fracciones que posteriormente fueron evaluadas como antioxidantes alimentarios. Mediante un método puesto a punto en nuestros laboratorios (Torres and Selga 2003) se han calculado los tamaños medios (mDP) y los porcentajes de grupos galato (G) en las fracciones.

Mediante el esquema de fraccionamiento de la Figura 5 se obtuvo un colección de fracciones que contenían mayoritariamente catequinas, flavonoles (similares a la quercetina, Figura 4B) o mezclas de ambos tipos. A su vez, las catequinas se separaron según su tamaño medio, entre 1 (Figura 4C) y 4 (Figura 4D) unidades constituyentes aproximadamente.

### Los extractos naturales como aditivos alimentarios

Una de las principales alteraciones de los alimentos durante su tratamiento y conservación es la rancidez, que se manifiesta en la aparición de aromas y gustos desagradables, y conlleva a su rechazo por parte del consumidor. Estas alteraciones se relacionan con el deterioro oxidativo de las grasas o lípidos de los alimentos. Cuanto mayor sea el grado de insaturación de



los lípidos, es decir a mayor concentración de ácidos grasos insaturados, los alimentos serán más susceptibles a sufrir las reacciones de oxidación y por tanto a desarrollar con mayor velocidad la rancidez. El caso paradigmático son los aceites y grasas de los pescados. Los lípidos del pescado se caracterizan por su elevada concentración en ácidos grasos poliinsaturados (familia n-3). Estos componentes tienen asociado un papel beneficioso en la prevención de enfermedades coronarias o la arterioesclerosis y confieren al músculo de

pescado un elevado valor nutritivo como alimento, pero a su vez lo convierten en un sustrato muy susceptible a sufrir procesos deteriorativos.

La oxidación de grasas y aceites ha sido objeto de numerosos estudios y uno de los procedimientos más eficaces en la prevención de la oxidación de los alimentos grasos es la utilización de antioxidantes. Se trata de sustancias que son capaces de inhibir o retardar el desarrollo de la oxidación bien porque actúan impidiendo que ésta se inicie o bien impidiendo que ésta se propague.

Los antioxidantes más empleados han sido los sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), que poseen alta estabilidad, bajo coste y una buena eficacia antioxidante. Aunque el empleo de antioxidantes alimentarios sintéticos está permitido, las normativas internacionales tienden a restringir su empleo, y en concreto, la UE prohíbe su utilización en alimentos infantiles y

aceites envasados. Su uso está regulado y restringido en numerosos países, y su utilización en alimentos está decreciendo. Debido a la oposición al empleo de antioxidantes sintéticos en la alimentación, las investigaciones se han dirigido a encontrar productos de origen natural con actividad antioxidante.

Los bagazos de uva y manzana han resultado ser una fuente de obtención de compuestos con una elevada actividad antioxidante in-vitro. Es preciso comprobar si esa actividad in-vitro se mantiene

FIGURA 7: FORMACIÓN DE PRODUCTOS DE OXIDACIÓN EN ACEITES DE PESCADO TRATADOS CON EXTRACTO DE MANZANAS

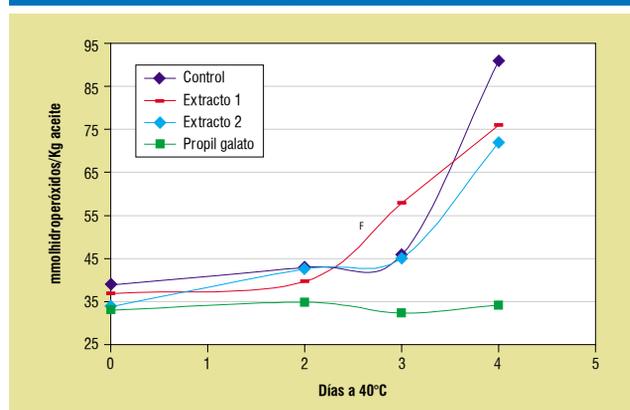
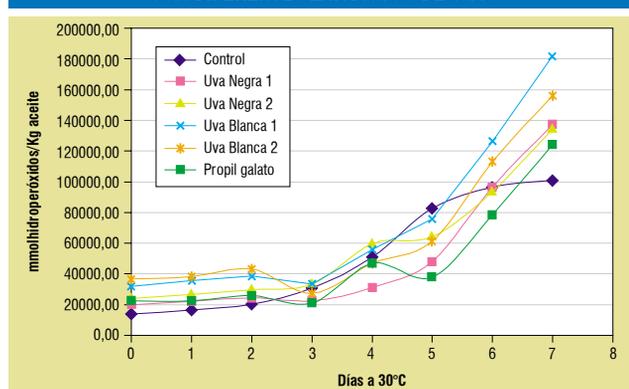


FIGURA 8: FORMACIÓN DE PRODUCTOS DE OXIDACIÓN EN EMULSIONES DE ACEITES DE PESCADO EN AGUA TRATADAS CON DIFERENTES EXTRACTOS DE UVAS





en los alimentos y por tanto, si los extractos y compuestos obtenidos son capaces de estabilizar la calidad de los alimentos al inhibir la oxidación de sus grasas. Como ejemplos representativos para ensayar la eficacia de los extractos y fracciones procedentes del bagazo se eligieron sistemas modelo basados en aceites de pescado y emulsiones de aceite de pescado en agua que simulan perfectamente a alimentos como sopas, mayonesas o salsas.

En las Figuras 7 y 8 se puede ver la efectividad de los extractos procedentes de bagazos de uvas y manzanas extraídos en metanol y descritos en la Tabla 2, para ralentizar la formación de los productos de oxidación en aceites de pescado y emulsiones de aceites de pescado en agua.

Los resultados indicaron que los extractos totales obtenidos mediante extrac-

ción sólido-líquido de bagazo de manzana fueron ligeramente eficaces en la inhibición de la oxidación de los aceites y muy eficaces en la inhibición de la oxidación de las emulsiones. Por el contrario, los extractos procedentes de bagazo de uvas no son eficaces en aceites y muy poco eficaces en emulsiones, incluso los extractos procedentes de uvas blancas han mostrado en ambos sistemas actividades pro-oxidantes.

Sin embargo, cuando los extractos totales son fraccionados según el esquema descrito en la Figura 5 y se emplean los compuestos aislados, la situación cambia totalmente. En la Tabla 3 puede verse el porcentaje de inhibición en la formación de productos de oxidación en aceites y emulsiones de aceites en agua tratados con los compuestos flavonoides aislados

a partir de las fracciones totales. Los resultados indicaron que mientras los extractos brutos procedentes del bagazo de uva, sin purificar y con una elevada concentración de compuestos glicosilados, no eran eficaces, las fracciones purificadas si fueron capaces de retardar la rancidez oxidativa en aceites y emulsiones. El grado de polimerización o el número de grupos galato no influyó en la eficacia encontrada en los aceites donde el papel primordial parece ser la concentración molar. Sin embargo, el grado de polimerización y de la galoización, así como la anfifilicidad fueron determinantes en la eficacia antioxidante encontrada en emulsiones.

En los estudios sobre eficacia de nuevos antioxidantes de origen natural, es recomendable comparar la efectividad

**TABLA 1:  
HUMEDAD DE LAS  
MATERIAS PRIMAS**

Residuo	% Humedad
Uva	64,00 ± 1,44
Manzana	85,00 ± 0,10

**TABLA 2: CARACTERÍSTICAS DE LOS EXTRACTOS  
DE BAGAZOS DE UVA Y MANZANA**

Residuo	% Extraíbles	% Polifenoles	Activ. antioxidante
Bagazo de Uva (Etanol)	33,6	0,20	79,4
Bagazo de Uva (Metanol)	33,4	0,35	93,0
B. Manzana (Etanol)	33,6	0,19	72,7
B. Manzana (Metanol)	20,2	0,22	70,0



obtenida con las nuevas moléculas frente a un antioxidante sintético. En este caso se eligió el propil galato por su similitud molecular a los compuestos obtenidos a partir de los bagazos. Tanto en los aceites de pescado como en las emulsiones de aceites de pescado en agua, se han identificado fracciones aisladas a partir de los extractos totales con eficacia comparable a la obtenida con el propil galato, incluso siendo empleadas a concentraciones molares inferiores a la del propil galato (Tabla 3).

Las fracciones que lograron los mejores resultados en la inhibición de la oxidación de las emulsiones se están empleando actualmente con éxito para ralentizar la rancidez de pescados grasos como jurel o caballa, almacenados congelados, en los que se está consiguiendo un aumento significativo del periodo de vida útil.

La conclusión o resultado más relevante de este trabajo es que es posible obtener y diseñar sistemas de INGREDIENTES basados en POLIFENOLES NATURALES para prevenir el desarrollo de la rancidez en productos alimenticios elaborados con aceites de pescado y músculo de pescado graso. Para que sean una realidad nuestros grupos de investigación están actualmente probando su eficacia (actividad, compatibilidad organoléptica), su seguridad (biomedicina, toxicología) y su viabilidad económica (tecnología de extracción y purificación).

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia y Tecnología (PPQ2000-0688-C05) y a la Xunta de Galicia (PGIDT00 AGR20901PR, incentivos al Proyecto PPQ 2000-0688-C05 y proyecto PGIDIT02AL 40201PR) la financiación concedida.

### Referencias

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Ber-set, C (1995) "Use of a free radical met-

hod to evaluate antioxidant activity" *Lebensm.-Wiss.technol.*, 28:5-30.

Singleton, V.L., Rossi, J.A (1965). "Colorimetry of total phenols with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents" *Am.J.Enol.Vitic.* 16:44-158.

Torres J. L. and A. Selga (2003). "Procyandin size and composition by thiolysis with cysteamine hydrochloride and chromatography." *Chromatographia* 57: 441-445. ■

**TABLA 3: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE COMPUESTOS DE OXIDACIÓN EN ACEITES DE PESCADO Y EMULSIONES DE ACEITES DE PESCADO EN AGUA MEDIANTE LA ADICIÓN DE FRACCIONES PURIFICADAS A PARTIR DE BAGAZO DE UVA (MEDIA ± SD)**

Antioxidantes Fenólicos	Hidroperóxidos Día 5 Aceites	Hidroperóxidos Día 7 Emulsiones
Control	0,0 ± 0,3	0,7 ± 0,5
Extracto OW	30,6 ± 0,2	70,7 ± 2,1
Fracción I	43,5 ± 5,6	53,9 ± 2,8
Fracción IV	20,2 ± 2,3	63,7 ± 1,6
Fracción V	61,6 ± 2,3	49,9 ± 3,4
Fracción VI	44,7 ± 3,9	12,9 ± 1,5
Fracción VII	43,2 ± 4,1	11,6 ± 4,9
Fracción VIII	15,3 ± 0,7	30,7 ± 9,7
Propil galato	69,3 ± 1,7	69,5 ± 5,5



Entra en [www.comercialgarcia.es](http://www.comercialgarcia.es)  
o solicita nuestro nuevo catálogo  
y descubre todo lo que tenemos  
en común con el CTC.

Ctra. de Madrid, Km.381. Pol.Ind. El Tapiado.  
Molina de Segura. Murcia (España).

Tel: 968 010 500 info@comercialgarcia.es

# Referencias legislativas

- **Orden SCO/3719/2005, de 21 de noviembre**, sobre sustancias para el tratamiento del agua destinada a la producción de agua de consumo humano. BOE 01/12/2005
- **Orden PRE/4097/2005, de 26 de diciembre**, por la que se establecen las bases reguladoras de las subvenciones para la realización de proyectos de investigación aplicada, dentro del programa nacional de medidas de ayuda a la apicultura. BOE 29/12/2005
- **Resolución de 19 de diciembre de 2005**, de la Secretaría de Estado de Universidades e Investigación, por la que se hace pública la convocatoria de ayudas para la realización de proyectos de estímulo a la transferencia de resultados de investigación, en el marco del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2004-2007. BOE 27/12/2005
- **Resolución de 13 de diciembre de 2005**, de la Secretaría de Estado de Universidades e Investigación, por la que se hace pública la convocatoria de las ayudas para la realización de las denominadas «Acciones Complementarias Internacionales», dentro del marco del Programa Nacional de Cooperación Internacional en Ciencia y Tecnología. BOE 28/12/2005
- **Resolución de 5 de diciembre 2005**, de la Secretaría de Estado de Universidades e Investigación, por la que se hace pública la convocatoria del Programa Torres Quevedo, para la contratación de personal de I+D (doctores y tecnólogos) en empresas, centros tecnológicos y asociaciones empresariales, en el marco del Programa Nacional de Potenciación de Recursos Humanos del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2004-2007. BOE 28/12/2005
- **Reglamento (CE) nº 1822/2005 de la Comisión, de 8 de noviembre de 2005**, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 en lo referente a los nitratos en determinados vegetales. DOUE 09/11/2005
- **Orden APA/4178/2005, de 22 de diciembre**, por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen Protegida Pimentón de la Vera y su Consejo Regulador. BOE 05/01/2006
- **Directiva 2005/79/CE de la Comisión, de 18 de noviembre de 2005**, por la que se modifica la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOUE 19/11/2005
- **Real Decreto 1513/2005, de 16 de diciembre, por el que se desarrolla la Ley 37/2003, de 17 de noviembre**, del Ruido, en lo referente a la evaluación y gestión del ruido ambiental. BOE 17/12/2005
- **Real Decreto 1614/2005, de 30 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 1852/1993, de 22 de octubre**, sobre producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. BOE 03/01/2006
- **Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005**, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DOUE 22/12/2005

## OFICINA DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN OTRI DEL CENTRO TECNOLÓGICO NACIONAL DE LA CONSERVA Y ALIMENTACIÓN

### Misión de la OTRI

- Identificar los resultados generados por los Grupos de Investigación de la y difundirlos entre las empresas promoviendo la innovación y competitividad del sector agroalimentario.
- Servir de apoyo a las empresas, especialmente a las PYMES en la redacción y solicitud de proyectos de investigación, innovación, asistencia técnica, etc., aportando información sobre las distintas posibilidades de financiación.
- Canalizar la oferta de investigación hacia las empresas, para facilitar la colaboración entre técnicos de empresas e investigadores de centros públicos o privados de investigación.
- Colaborar en la incorporación de tecnólogos y doctores en las empresas.

CTC | OTRI

# MED BIO DISTRI NET



COFINANCIADOR:



## CONTEXTO

### SECTOR PRODUCTOS ECO/BIO

- Con un desarrollo de crecimiento del 20% anual.
- Engloba a la mayoría de PYMES de las seis regiones participantes.
- Se enmarca dentro de el programa Interreg III B Medoc.

## LO QUE ESTÁ EN JUEGO

### MEJORAR LA COMPETITIVIDAD

### DE TODAS LAS EMPRESAS EN EL SECTOR DE PRODUCTOS ECOLÓGICOS/BIOLÓGICOS

- Focalizado en las empresas de transformación y distribución.
- Representación de todo el segmento ECO/BIO: Agroalimentario / Productos de la salud / Cosméticos

## OBJETIVOS

- Desarrollo e innovación de las empresas de transformación y de la distribución en las seis zonas colaboradoras.
- Crear una red y favorecer la cooperación entre regiones.
- Conseguir que éstos productos sean más atractivos para el conjunto de los consumidores.

## ACCIONES MED BIO DISTRI NET

- Estudio cuantitativo y cualitativo en las seis regiones colaboradoras. Durante estas fases se identificarán las mejores prácticas referidas a la distribución, promociones, envases, embalajes e innovación en los productos y procesos.
- Durante una acción piloto un grupo de compañías compartirán estas mejores prácticas para que se beneficie el sector en su conjunto.

RHONE-ALPES



PACA



LOMBARDIE



TOSCANA



CATALUÑA



MURCIA



## SOCIOS DEL PROYECTO MED BIO DISTRI NET

- **Chambre de Commerce et d'Industrie de la Drôme**  
CCI Drôme, Región Rhône-Alpes (Francia).
- **Chambre de Commerce et d'Industrie de Marseille Provence**  
CCI Marseille, Región Provence Alpes Côte d'Azur (Francia).
- **Euro Info Centre-Azienda Speciale della Camera di Commercio di Milano**  
EIC Milano, Región Lombardia (Italia).
- **Promofirenze-Azienda Speciale de la Camera di Commercio Industria Artigianato di Firenze**  
Región Toscana (Italia).
- **Centre de Desenvolupament Rural Integral de Catalunya**  
CEDRICAT, y **Centre Tecnologic Forestal de Catalunya** CCTFC, Región Cataluña (España)
- **Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación**  
CTC, Región Murcia (España).

# Empresas asociadas al Centro Tecnológico

- ACEITUNAS CAZORLA, S.L.
- AGARCAM, S.L.
- AGRICONSA
- AGROMARK 96, S.A.
- AGROSOL, S.A.
- AGRUCAPERS, S.A.
- AGRUMEXPORT, S.A.
- ALBALADEJO HERMANOS, S.A. (SALAZONES DIEGO)
- ALCAPARRAS ASENSIO SANCHEZ
- ALCURNIA ALIMENTACION, S.L.
- ALIMENTARIA BARRANDA, S.L.
- ALIMENTOS PREPARADOS NATURALES, S.A.
- ALIMENTOS VEGETALES, S.L.
- ALIMINTER, S.A.  
www.aliminter.com
- ANDALUZA DE TRATAMIENTOS INDUSTRIALES, S.L.
- ANTIPASTI, S.L.  
www.cesser.com/taparica
- ANTONIO HIGUERAS TALAVERA
- ANTONIO MUÑOZ Y CIA, S.A.
- ANTONIO RÓDENAS MESEGUER, S.A.
- ANUKKA FOODS, S.A.  
www.anukkafoods.com
- AUFERSA
- AUXILIAR CONSERVERA, S.A.  
www.auxiliarconservera.es
- BERNAL MANUFACTURADOS DEL METAL, S.A. (BEMASA)
- BRADOKC CORPORACION ALIMENTARIA, S.L.  
www.braddock.net
- C.R.D. E ESPARRAGOS DE HUERTOS-TAJAR
- CAMPILLO ALCOLEA HNOS., S.L.
- CARNICAS Y ELABORADOS EL MORENO, S.L.
- CASTILLO EXPORT, S.A.
- CENTRAMIRSA
- CHAMPIÑONES SORIANO, S.L.
- COAGUILAS
- COATO, SDAD.COOP LTDA.  
www.coato.com
- COFRUSA - www.cofrusa.com
- COFRUTOS, S.A.
- CONFITURAS LINARES, S.L.
- CONGELADOS ELITE, S.L.
- CONGELADOS PEDANEJO, S.A.  
www.pedanejo.es
- CONSERVAS ALGUAZAS, S.L.
- CONSERVAS ALHAMBRA
- CONSERVAS EL RAAL, S.C.L.
- CONSERVAS ESTEBAN, S.A.
- CONSERVAS FERNANDEZ, S.A.  
www.ladiosa.com
- CONSERVAS HERVAS
- CONSERVAS HOLA, S.L.
- CONSERVAS HUERTAS, S.A.  
www.camerdata.es/huertas
- CONSERVAS LA GRANADINA, S.L.
- CONSERVAS LA ZARZUELA
- CONSERVAS MARTINETE
- CONSERVAS MARTINEZ GARCIA, S.L. - www.cmgs.com
- CONSERVAS MARTINEZ, S.A.
- CONSERVAS MIRA  
www.serconet.com/conservas
- CONSERVAS MODESTO CARRODEAGUAS
- CONSERVAS MORATALLA, S.A.  
www.conservasmoratalla.com
- COOPERATIVA "CENTROSUR"
- COOPERATIVA "LA PLEGUERA"
- CREMOFRUIT, S. COOP
- DERIVADOS DE HOJALATA, S.A.  
www.dhsa.es
- DREAM FRUITS, S.A.  
www.dreamfruits.com
- EL QUIJERO, S.L.
- ENVASUR, S.L.
- ESTERILIZACION DE ESPECIAS Y CONDIMENTOS, S.L.
- ESTRELLA DE LEVANTE, FABRICA DE CERVEZA, S.A.
- EUROCAVIAR, S.A.  
www.euro-caviar.com
- EXPOLORQUI, S.L.
- E.J. SÁNCHEZ SUCESORES, S.A.
- FACONSA (INDUSTRIAS VIDECA, S.A.)
- FAROLIVA, S.L. - www.faroliva.com
- FILIBERTO MARTINEZ, S.A.
- FRANCISCO ALCANTARA ALARCON, S.L.
- FRANCISCO CABALLERO GARRO Y OTROS, C.B.
- FRANCISCO JOSE SANCHEZ FERNANDEZ, S.A.
- FRANCISCO MARTINEZ LOZANO, S.A.
- FRANMOSAN, S.L.  
www.franmosan.es
- FRIPOZO, S.A.
- FROZENFRUIT, S.L.
- FRUTAS ESTHER, S.A.
- FRUGARVA, S.A.
- FRUVECO, S.A.
- FRUYPER, S.A.
- GLOBAL ENDS, S.A.
- GLOBAL SALADS, LTD.
- GOLDEN FOODS, S.A.  
www.goldenfoods.es
- GOLOSINAS VIDAL, S.A.
- GOMEZ Y LORENTE, S.L.
- GONZALEZ GARCIA HNOS, S.L.  
www.sanful.com
- HALCON FOODS, S.A.  
www.halconfoods.com
- HELIFRUSA - www.helifrusa.com
- HERO ESPAÑA, S.A. - www.hero.es
- HRS ESPIRATUBE, S.L.
- HIJOS DE BIENVENIDO ALEGRIA, C.B.
- HIJOS DE ISIDORO CALZADO, S.L.  
www.conservas-calzado.es
- HIJOS DE JOSE PARRA GIL, S.A.
- HIJOS DE PABLO GIL GUILLEN, S.L.
- HISPANIA FOODS, S.L.
- HORTICOLA ALBACETE, S.A.
- HUERTA CAMPORICO, S.L.
- HUEVOS MARYPER, S.A.
- IBERCOCKTEL
- INCOVEGA, S.L.
- INDUSTRIAS AGRICOLAS DEL ALMANZORA, S.L.  
www.industriasagricolas.net
- J. GARCIA CARRION, S.A.  
www.donsimon.com
- JABONES LINA, S.A.
- JAKE, S.A.
- JOAQUIN FERNANDEZ E HIJOS, S.L.
- JOSE AGULLO DIAZ E HIJOS, S.L.  
www.conservasagullo.com
- JOSE ANTONIO CARRATALA PARDO
- JOSE MANUEL ABELLAN LUCAS
- JOSE MARIA FUSTER HERNANDEZ, S.A.
- JOSE SANCHEZ ARANDA, S.L.
- JOSE SANDOVAL GINER, S.L.
- JUAN GARCIA LAX, GMBH
- JUAN PEREZ MARIN, S.A.  
www.jupema.com
- JUVER ALIMENTACION, S.A.  
www.juver.com
- KERNEL EXPORT, S.L.  
www.kernelexport.es
- LANGMEAD ESPAÑA, S.L.
- LIGACAM, S.A. - www.ligacam.com
- MANDARINAS, S.A.
- MANUEL GARCIA CAMPOY, S.A.  
www.milafruit.com
- MANUEL LOPEZ FERNANDEZ
- MANUEL MATEO CANDEL  
www.mmmcandel.com
- MARFRARO, S.L.
- MARIN GIMENEZ HNOS, S.A.  
www.marimgimenez.com
- MARIN MONTEJANO, S.A.
- MARTINEZ ARRONIZ, S.L.
- MARTINEZ NIETO, S.A.  
www.marnys.com
- MATEO HIDALGO, S.A.
- MAXIMINO MORENO, S.A.
- MENSAJERO ALIMENTACION, S.A.  
www.mensajeroalimentacion.com
- MIVISA ENVASES, S.A.  
www.mivisa.com
- MULEÑA FOODS, S.A.
- NANTA, S.A.
- PEDRO GUILLEN GOMARIZ, S.L.  
www.soldearchena.com
- PENUMBRA, S.L.
- POLGRI, S.A.
- POSTRES Y DULCES REINA, S.L.
- PRODUCTOS BIONATURALES CALASPARRA, S.A.
- PRODUCTOS JAUJA, S.A.  
www.productosjauja.com
- PRODUCTOS QUIMICOS J. ARQUES
- PRODUCTOS MEDITERRÁNEO BELCHI SALAS, S.L.
- PRODUCTOS SUR, S.L.
- RAMON GUILLEN E HIJOS, S.L.
- RAMON JARA LOPEZ, S.A.
- ROSTOY, S.A.  
www.rostoy.es
- SAMAFRU, S.A.  
www.samafru.es
- SAT EL SALAR, Nº 7830  
www.variedad.com
- SAT 5209 COARA
- SAT LAS PRIMICIAS
- SOCIEDAD AGROALIMENTARIA PEDROÑERAS, S.A.
- SOGESOL, S.A.
- SUCESORES DE ARTURO CARBONELL, S.L.
- SUCESORES DE JUAN DIAZ RUIZ, S.L. - www.fruyso.es
- SUCESORES DE LORENZO ESTEPA AGUILAR, S.A.  
www.eti.co.uk/industry/food/san.lorenzo/san.lorenzo1.htm
- SURINVER, S.C.L.  
www.ediho.es/surinver
- TECNOLOGIAS E INNOVACIONES DEL PAN  
www.jomipsa.es/tecnopan
- TOMAS ALCAZAR, S.A.
- IBERIA, S.L.O. (Herberx)
- ULTRACONGELADOS AZARBE, S.A.
- VEGETALES CONGELADOS, S.A.
- VECOMAR ALIMENTACION, S.L.
- ZUKAN, S.L.



# Soluciones

a la medida de sus necesidades:  
Leasing-Renting

## Satisfaga las necesidades de su empresa con grandes ventajas fiscales

Cajamar le ofrece dos buenas alternativas para disfrutar de ciertos bienes y servicios como si fuesen propiedad de su empresa y desgravarlos como si fuesen un gasto. El **LEASING CAJAMAR** es un sistema de financiación a modo de alquiler que le ofrece la opción a compra al final del periodo. El **RENTING CAJAMAR** es un sistema de alquiler puro de vehículos y equipos informáticos con "todo incluido". Si quiere descubrir todas sus ventajas, venga a informarse a cualquier oficina de Cajamar.

# Equipamiento para INDUSTRIA DE LA ALIMENTACIÓN

## Medidores de humedad:

## XM 60 / 120

- ✓ Garantía: 3 años
- ✓ Capacidad: 124 g.
- ✓ Precisión: 0,001 g.
- ✓ 5 memorias de programa
- ✓ Temperatura: de 30°C a 120°C
- ✓ Tipo de radiador: infrarrojo

Medidores  
de humedad  
PRECISA



## Estufas de secado:

## Serie 7000

- ✓ Temperatura hasta 250 °C
- ✓ Disponibles varios volúmenes
- ✓ Equipo con regulador especial, con pasos de programas fijos memorizados
- ✓ Modelos con convección natural o circulación forzada de aire

Estufas de secado  
serie 7000  
Function Line



## Mobiliario técnico de laboratorio:

## Planet Laboratory

- ✓ Diseño de laboratorios de investigación, docentes, de plantas industriales, hospitales...
- ✓ Sistemas de ventilación centralizados
- ✓ Instalaciones de servicios: suministros de electricidad, agua, gases, voz y datos...
- ✓ Mobiliario: puestos de trabajo, armarios de seguridad, vitrinas de gases...
- ✓ Diseño y compartimentación modular de laboratorios

PLANET

Mobiliario a medida  
de sus necesidades



## Sistema de secado e incineración:

## prepASH

- ✓ Proceso totalmente automatizado de 29 muestras y una muestra de referencia, en un solo ciclo
- ✓ Reducción en los tiempos de trabajo hasta un 50%
- ✓ Permite la realización de ensayos de manera controlada en un amplio rango de temperaturas 50°C - 1.000°C

Sistema automático de  
secado e incineración



## Otros equipos relacionados



Liofilizadores



Balanzas  
precisión



Cabinas  
flujo laminar



Hornos de mufla



Centrifugas

CONTROLTECNICA instrumentación científica S.L.

C/ Artesanos 7 (Prado del Espino)

28660 Boadilla del Monte ( Madrid)

Tel. 91 728 08 10

Fax. 91 729 44 54

BARCELONA: 93 486 46 60

ANDALUCÍA: 679 21 02 33

VALENCIA: 679 20 85 37

MURCIA: 686 93 68 31

GALICIA: 616 42 70 94

www.controltecnica.com

SORVALL<sup>®</sup>  
Heraeus

CONTROLTECNICA  
Instruments