

Jornada Focus Pyme y Emprendimiento:

**OPORTUNIDADES AGROALIMENTARIAS: EL PAPEL DE LA
BIOTECNOLOGÍA**

**Papel de la biotecnología en la obtención,
estabilización y validación de ingredientes
funcionales**

Begoña Ruiz

Paterna, 19 de junio de 2018

Ingredientes Bioactivos: Tendencias

Biotecnología industrial: la herramienta para la obtención de ingredientes bioactivos

Estudios preclínicos con modelos in vitro: herramientas para la identificación y evaluación del efecto bioactivo



Ingredientes Bioactivos: Tendencias

> Tendencias de mercado: Ingredientes bioactivos

Tendencias del consumidor

- Preocupación por el uso de químicos
- La demanda de productos "orgánicos"
- Concienciación y consumo ético

Tendencia ingredientes:

- Sustitución químicos
- Trazabilidad
- Uso de ingredientes alimentarios
- Nuevos ingredientes
- Ingredientes comercio justo
- Producción local

**INGREDIENTES
BIOACTIVOS**

Tendencias en el sector

- Declaraciones "Producto libre de..."
- Incremento en la segmentación

> Tendencias de mercado e ingredientes bioactivos: EL PAPEL DE LA BIOTECNOLOGÍA

- ✓ Con la **Biología Industrial** es posible obtener ingredientes bioactivos de base biológica, basados en **metabolitos o moléculas** sintetizados por **microorganismos y microalgas**, o en algunos casos, los propios microorganismos.
- ✓ Los procesos de **microencapsulación** permiten proteger los estos ingredientes, obtenidos por técnicas **biotecnológicas** y hacerlos más **eficaces**.
- ✓ Los efectos biológicos de los ingredientes bioactivos necesitan evidencias científicas. Empleando **modelos *in vitro*** es posible **evaluar la bioactividad de los ingredientes** en su fase de desarrollo, ayudando en su diseño y formulación. Estas técnicas son complementarias y previas a los ensayos clínicos.

**Biotecnología Industrial:
La herramienta para obtener ingredientes bioactivos**

> Biotecnología Industrial - ¿QUÉ ES?

La **Biotecnología Industrial** integra un conjunto de técnicas que emplean **enzimas** y **microorganismos** para obtener productos en los sectores químico, agrícola, alimentación humana, alimentación animal y cosmética.

Desde el Departamento de Bioensayos de AINIA, la I+D+i que se realiza en el área se centra en el **diseño, optimización e implementación** de procesos de base biológica, aunando el **Know How** existente en las áreas de **microbiología, biotecnología, ingeniería de procesos y diseño de equipos** y siempre orientando los procesos desde el inicio a buscar la mayor **viabilidad industrial**.

- **Bioproducción:** Producción de microorganismos con distintas funcionalidades, *starters* industriales y probióticos.
- **Biosíntesis:** Síntesis de compuestos de alto valor añadido a partir de microorganismos seleccionados.
- **Biocatálisis:** Transformaciones biológicas de productos mediante el empleo de enzimas y de microorganismos seleccionados.

> Biotecnología Industrial – ¿PARA QUÉ SIRVE?

BIOPRODUCCIÓN

- ✓ **Levaduras** vínicas, cerveceras, panaderas.
- ✓ Bacterias ácido-lácticas: **probióticos**.
- ✓ **Cultivos iniciadores** para alimentos cárnico-curados, encurtidos, industria láctea: **Starters**.
- ✓ **Microorganismos de aplicación en agricultura:** biocontrol, bioestimulantes del crecimiento, antagonistas.

BIOSINTESIS

- ✓ **Aminoácidos potenciadores del sabor** (glutámico, aspártico) y **antioxidantes** (triptófano, histidina).
- ✓ **Antibióticos y péptidos antimicrobianos** (bacteriocinas).
- ✓ **Ácidos grasos poliinsaturados** (EPA, Omega-3, DHA, etc.)
- ✓ **Pigmentos naturales** (β -caroteno, Astaxantina)

BIOCATÁLISIS

- ✓ **Producción de enzimas** (Proteasas, amilasas, quitinasas endolisinas)
- ✓ Producción de **hidrolizados de proteínas** ricos en aminoácidos libres y **péptidos bioactivos**.
- ✓ **Hidrolisis de hidratos de carbono no solubles** (Celulosas y hemicelulosas) para obtención de azúcares fermentables (**azúcares de segunda generación**).
- ✓ **Síntesis** enzimática de oligosacáridos.

> Biotecnología Industrial – EJEMPLOS

BIOPRODUCCIÓN

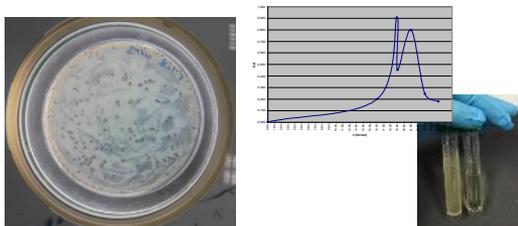
Starters y probióticos



Bioestimulantes y Biocontrol



Bacteriófagos



BIOSINTESIS

Pigmentos



PUFAs

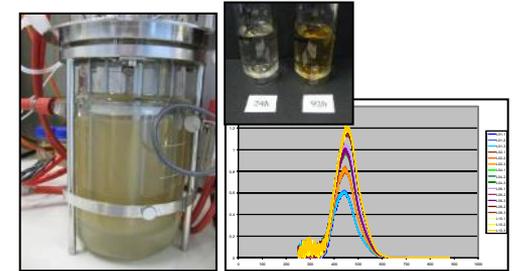


Bioplásticos



BIOCATÁLISIS

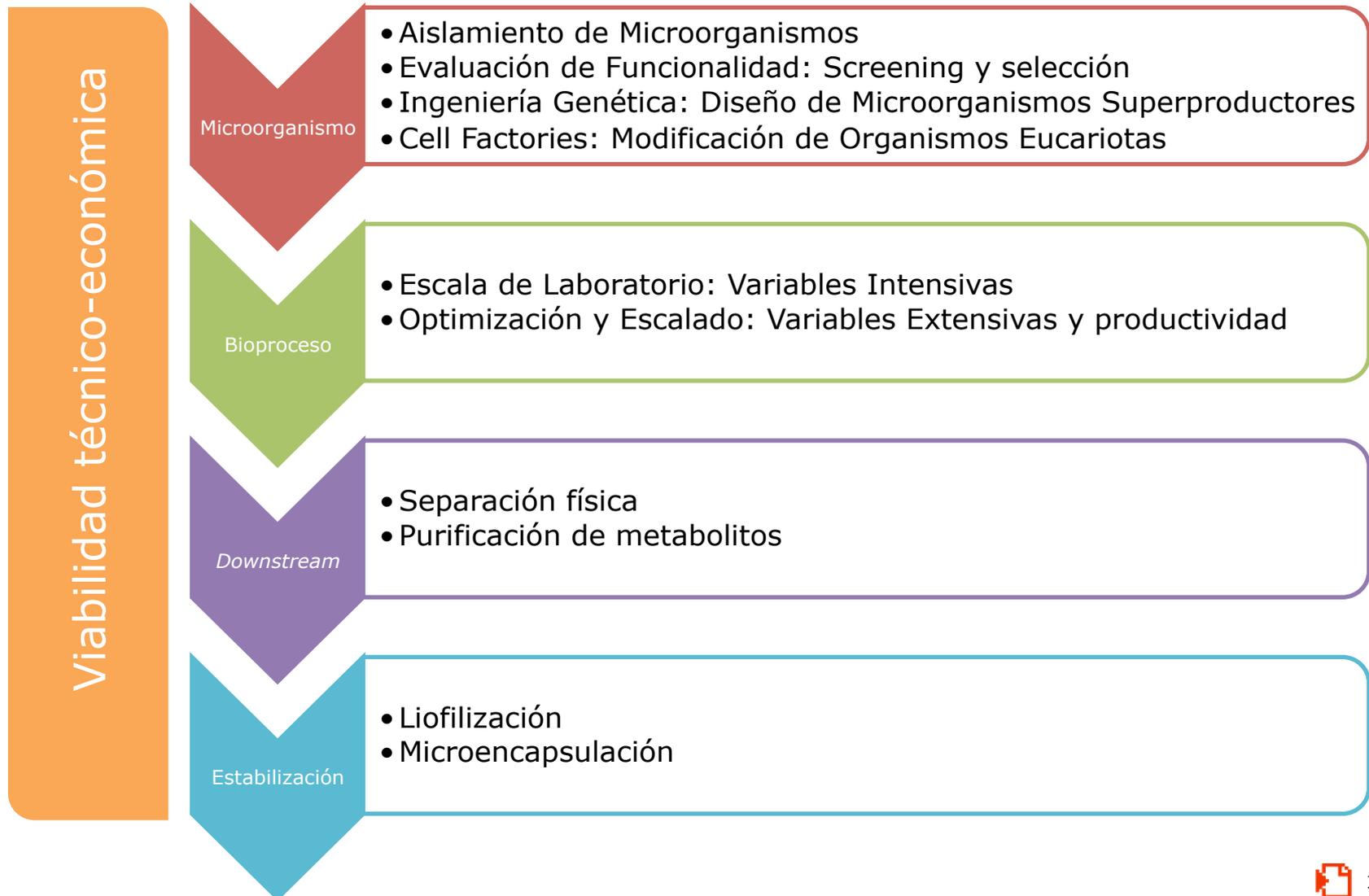
Producción de enzimas



Hidrólisis enzimáticas



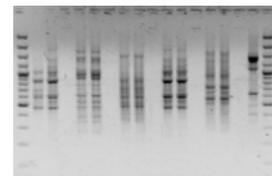
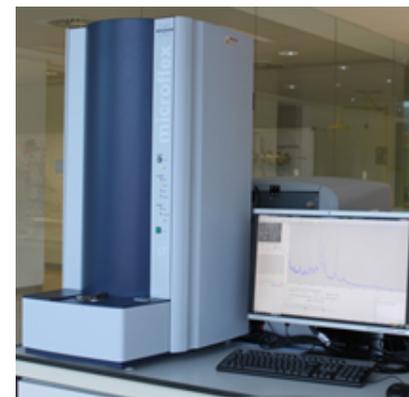
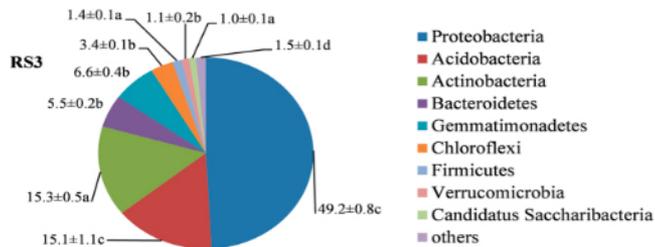
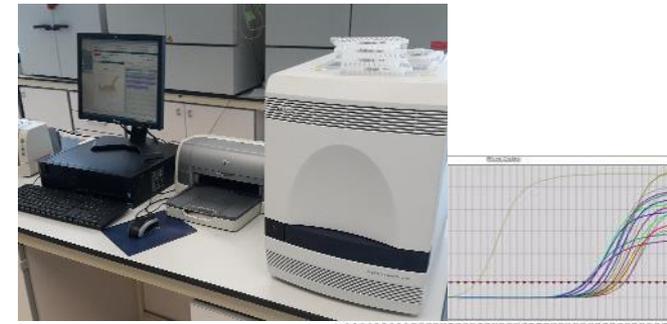
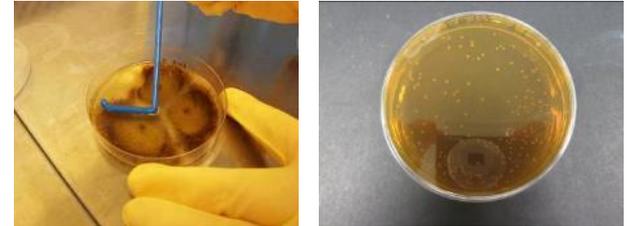
> Esquema general: Desarrollo de Principios Activos



> Biotecnología Industrial – FASE I: El microorganismo

Aislamiento, conservación, caracterización

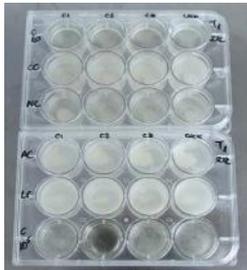
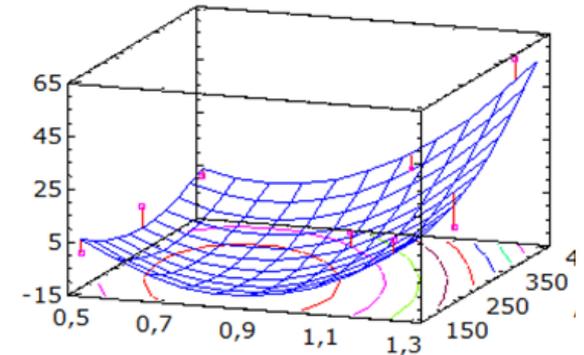
- Aislamiento y conservación
- Caracterización genética
- Identificación: MALDI-TOF, microscopía electrónica, genes de AMR, secuenciación masiva...
- Evaluación de la actividad in vitro:
 - Producción de compuestos de interés
 - Potencial probiótico
 - Modelos celulares
 - Resistencia GI, biodisponibilidad...



> Biotecnología Industrial – FASE II: El Bioproceso

Definición, optimización y escalado

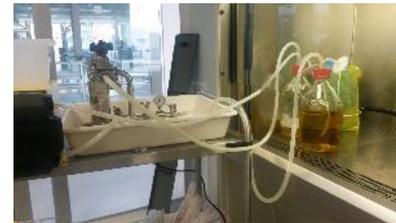
- Cinéticas de crecimiento
- Selección y optimización de variables (medios de cultivo, temperatura, factor de inoculación, agitación, aeración)
- Mejora resistencia a post-procesos
- Balances de materia y energía
- Estudios de viabilidad técnica y económica
- Etc.



> Biotecnología Industrial – FASE III: Downstream

Separación física

- Centrifugación
- Filtración tangencial
 - Microfiltración
 - Ultrafiltración
- Purificación (FPLC)
- Purificación mediante tecnologías de extracción (FSC)



> Biotecnología Industrial – FASE IV: Estabilización

- Liofilización
- Microencapsulación



	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>
colony-forming units/g before spray drying	10^{11}	10^{11}	10^8
colony-forming units/g after spray drying	10^{11}	10^{10}	10^6

> Microorganismos probióticos

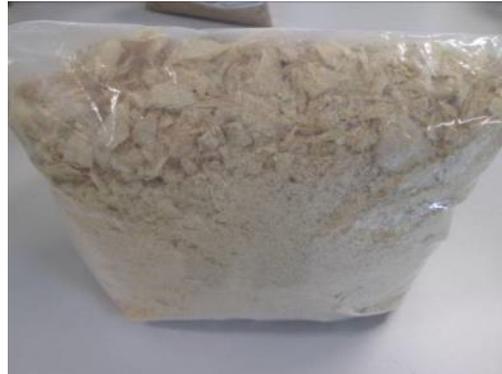
Aislamiento de Cepas probióticas

Caracterización de la actividad probiótico: Ensayos *in-vitro*

Selección de la cepa con capacidad probiótica

Definición del proceso de bioproducción

Estabilización de la cepa probiótica



>Co-productos como fuente de ingredientes bioactivos: Péptidos bioactivos

Selección de enzimas proteolíticas o de microorganismos con capacidad proteolítica

Definición del proceso de hidrólisis

Fraccionamiento de material proteico mediante ultrafiltración

Caracterización de las fracciones proteicas: Ensayos *in-vitro* para evaluación de la bioactividad

Definición del proceso de biocatálisis

Purificación del péptido bioactivo (FPLC) y estabilización



Estudios preclínicos con modelos in vitro: herramientas para la identificación y evaluación del efecto bioactivo

¿Qué implica el desarrollo de productos con declaraciones de propiedades saludables?

El **Reglamento (CE) N.º. 1924/2006** relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en alimentos define las declaraciones de propiedades saludables como “cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus componentes, y la salud”. Únicamente las **declaraciones** consideradas **científicamente fundamentadas** y **autorizadas por la Comisión Europea (CE)** podrán utilizarse en la UE.

La UE publica una lista con el Registro de Declaraciones Nutricionales y de Propiedades Saludables de la UE, que contiene todas las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables autorizadas y no autorizadas (<http://ec.europa.eu/nuhclaims/>).



<https://www.healthyfoods-online.com/true-life-red-berries-heart-up-250g>



European Food Safety Authority

EFSA Journal 2011;9(12):2471

CONCLUSIONS

On the basis of the data presented, the Panel concludes that:

- The food constituent, barley beta-glucans, which is the subject of the health claim, is sufficiently characterised.
- The claimed effect is “reduction of blood cholesterol, which may reduce the risk of heart disease”. The target population proposed by the applicant is adults who want to lower their blood cholesterol concentrations. Lowering blood LDL-cholesterol concentration is a beneficial physiological effect by decreasing the risk of coronary heart disease.
- A cause and effect relationship has been established between the consumption of barley beta-glucans and the lowering of blood LDL-cholesterol concentrations.
- The following wording reflects the scientific evidence: “Barley beta-glucans have been shown to lower/reduce blood cholesterol. High cholesterol is a risk factor in the development of coronary heart disease”.
- **At least 3 g of barley beta-glucans should be consumed per day in order to obtain the claimed effect. This amount can reasonably be consumed as part of a balanced diet. The target population is adults who want to lower their blood cholesterol concentrations.**

DOCUMENTATION PROVIDED TO EFSA

Health claim application on barley beta-glucans and lowering of blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006 (Claim serial no: 0306 SI). June 2011. Submitted by Valens Int. d.o.o.

Etapas en el desarrollo y validación de alimentos funcionales

ETAPA 1. OBTENCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE INGREDIENTES FUNCIONALES (AINIA)



ETAPA 2. DESARROLLO DE ALIMENTOS SALUDABLES. ESTUDIOS DE VIDA ÚTIL Y ESTABILIDAD (AINIA)



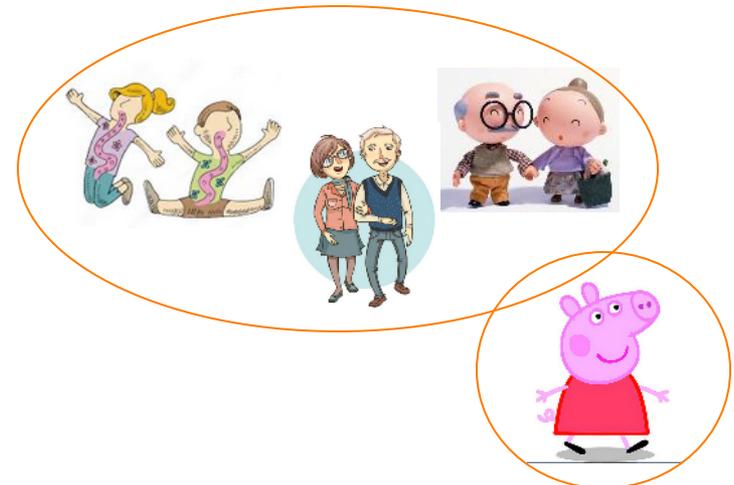
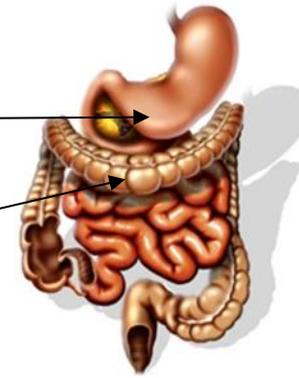
ETAPA 3. ESTUDIOS PRECLÍNICOS. ESTUDIOS DE LA BIODISPONIBILIDAD Y FUNCIONALIDAD *IN VITRO* (AINIA)



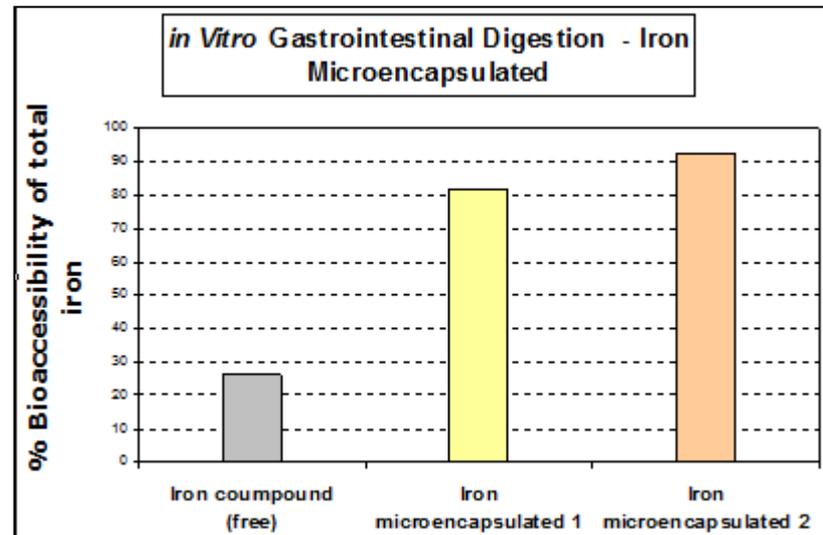
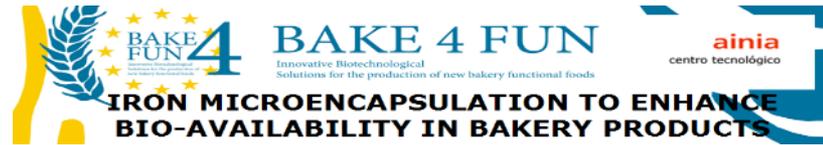
ETAPA 4. ESTUDIOS CLÍNICOS DE INTERVENCIÓN EN HUMANOS (HOSPITAL)



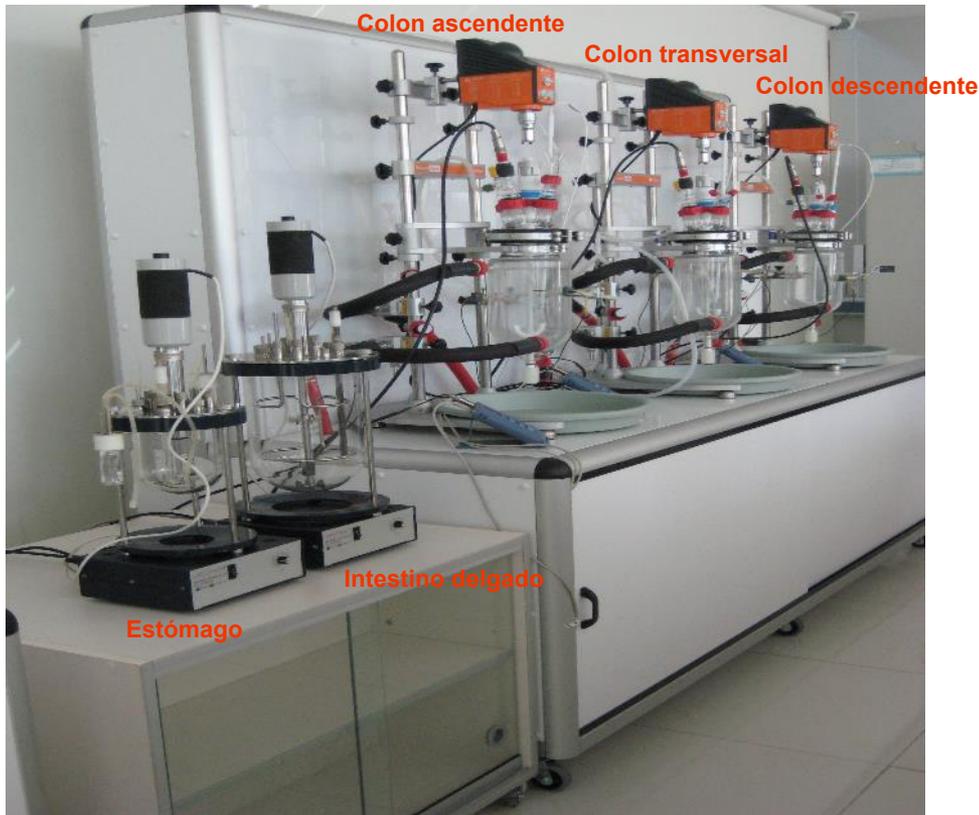
El **Digestor Dinámico *in vitro*** reproduce las condiciones naturales del tracto gastrointestinal humano (estómago e intestino delgado) y sus características principales



Nuevas formulaciones que posibiliten una mejor absorción de nutrientes: Estudio de resistencia gastrointestinal de Fe microencapsulado



El **Digestor in vitro de Fermentación Colónica**, reproduce el proceso de digestión gastrointestinal (estómago , intestino delgado y colon)



Digestión gástrica de los alimentos, consistente en la transformación del bolo alimenticio en el quimo (digerido gástrico)

Digestión intestinal se siguen descomponiendo los nutrientes y/o compuestos bioactivos, dando lugar al quilo (digerido intestinal)

Fermentación por acción de la microbiota intestinal que tiene lugar en el intestino grueso (colon ascendente, transversal y descendente)



Probióticos: Estudio de resistencia gastrointestinal y fermentación colónica de probióticos

Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica

Estómago Intestino Colon ascendente Colon transversal Colon descendente

Viabilidad de la cepa probiótica tras su paso por el tracto gastrointestinal

- Toma de muestra al inicio final de la digestión gastrointestinal
- Recuento de *Bifidobacterias* totales mediante el recuento en placa en medio selectivo y su incubación a 37°C ± 1°C en condiciones de anaerobiosis.

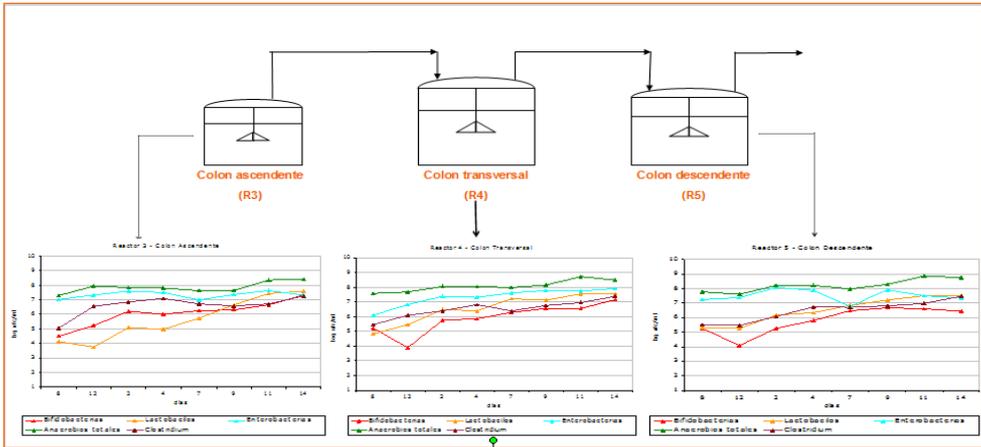
Análisis de la microbiota intestinal

- Toma de alícuotas en el periodo basal (0, 5, 7 y 12 días) y en el periodo de tratamiento (2, 4, 7, 9, 11 y 14 días)
- Análisis de microorganismos indicadores de la microbiota intestinal total, potencialmente beneficiosos para la salud humana y relacionados con *patogenicidad*.

Lactobacillus
Bifidobacterium
Enterobacteriaceae
Clostridium
 Anaerobios totales

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA GASTROINTESTINAL IN VITRO DE UN SIMBIÓTICO Y SU CAPACIDAD DE MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Vizuel B¹, Porta S¹, Murolet A²
¹AINIA Centro Tecnológico, C/Revelador, Franklin, 5-11 Paterna (Valencia)
²LABINDERB C/Alvar el Pí, Los Mochos 33000 (Valencia)
 bvizuel@ainia.es



Modelos celulares que mimetizan el órgano diana

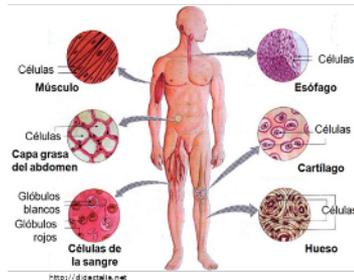
Desarrollo de bioensayos a medida según el objetivo funcional de interés



Modelo Celular



Modelos celulares que mimetizan el órgano diana



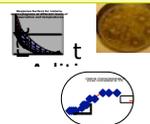
Funcionalidad

- ✓ Anti-inflamatorio
- ✓ Probiótico
- ✓ Regulación del colesterol
- ✓ Neuroprotector
- ✓ Modulador de obesidad
- ✓ Resistencia a insulina
- ✓ Biodisponibilidad
- ✓ Saciante
- ✓ Efecto antiedad
- ✓ Salud ósea
- ✓ ...

Biomarcador

inflamación (NFkb, citokinas), muerte celular (BAX, BCL2), regulación tejido adiposo (leptina, cuerpos grasos), proliferación celular, formación de colágeno, etc

Técnicas recuento



Espectro-fluorimetría



Metodología

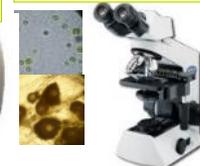
Análisis molecular



Citometría de flujo



Microscopia



Espectrometría de masas

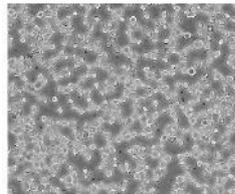


Evaluación de la capacidad anti-inflamatoria de compuestos polifenólicos

Ensayo celular



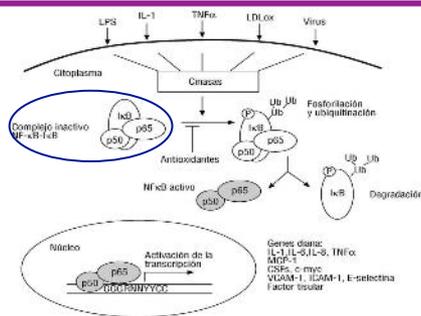
Extractos de Polifenoles vegetales



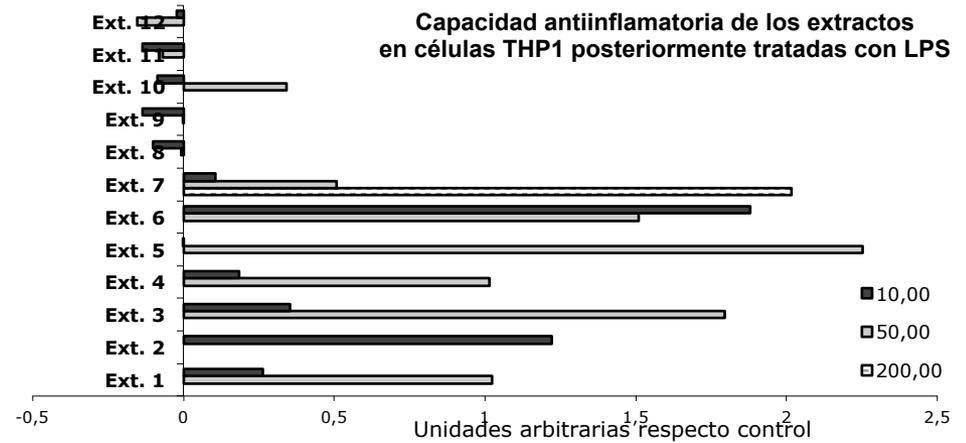
Lectura e interpretación del biomarcador



Bioensayo con la línea de monocitos THP1
Evaluar la capacidad de inhibir NFKB

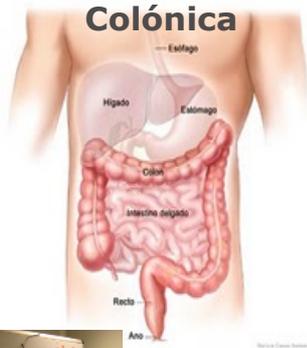


Capacidad antiinflamatoria de los extractos en células THP1 posteriormente tratadas con LPS



Sistema integrado
Digestor Dinámico *in vitro*/ Modelos celulares que mimetizan el sistema biológico

**Digestores in vitro: de
 digestión
 gastrointestinal y de
 Fermentación
 Colónica**

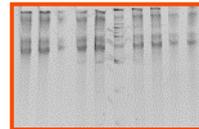


Funcionalidad

Reproducción del sistema biológico, caracterización y monitorización



Bioactividad: antiinflamatorio, obesidad...

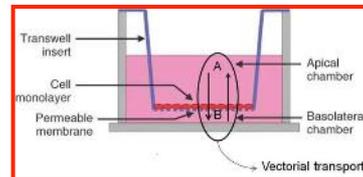


Actividad probiótica

Actividad antimicrobiana

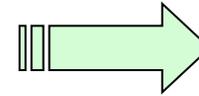
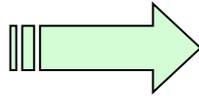


Modulación del perfil microbiológico



Absorción intestinal

Evaluación de la biodisponibilidad de aminoácidos



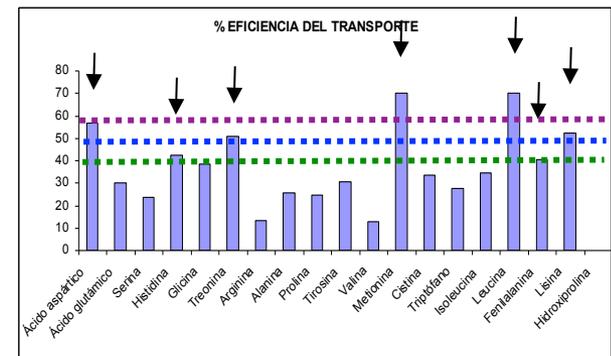
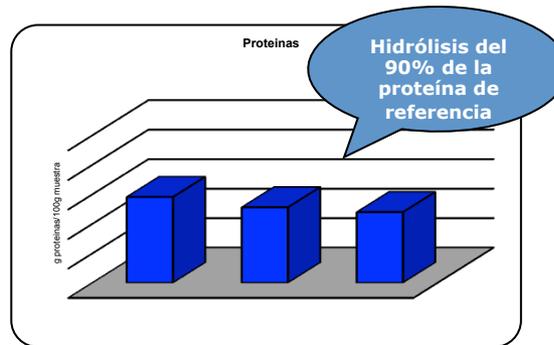
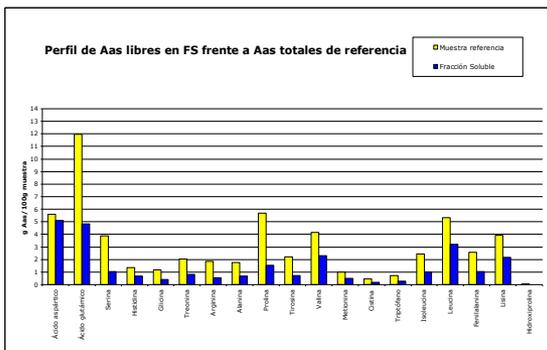
Proteína vegetal

Bioaccesibilidad

(simulación de la digestión gastrointestinal)

Biodisponibilidad y transporte

(ensayo celular con Caco-2)



> Conclusiones finales

- **La biotecnología industrial** permite obtener **compuestos bioactivos** a través de bioproducción, biosíntesis y biocatálisis con propiedades similares a las sintéticas. Esos ingredientes podrían producirse utilizando **microorganismos seleccionados, microalgas o enzimas**. Estos ingredientes tienen un alto valor añadido, **siendo naturales, orgánicos y efectivos**.
- Los **modelos *in vitro*** son herramientas útiles para diseñar, cribar y desarrollar ingredientes y/o productos funcionales debido a que permiten estudiar su impacto en la salud humana mediante la evaluación de la **bioaccesibilidad, la biodisponibilidad, la bioactividad y la interacción con la microbiota**.

**Digestión gastrointestinal/
fementación colónica**

Blanca Viadel
bviadel@ainia.es

Elisa Gallego
egallego@ainia.es

Juan Nieto
jnieto@ainia.es



Modelos celulares

Lidia Tomás
ltomas@ainia.es

Laura Soriano
lsoriano@ainia.es

Modelos microbianos

Sonia Porta
sporta@ainia.es

Biotecnología Industrial

Alex Martínez
amartinez@ainia.es

Joaquin Espí
jespi@ainia.es

Ana Torrejón
atorrejon@ainia.es

Gracias por vuestra atención