

Nudel, Clara; Nusblat, Alejandro; Valcarce, German; et. al. (septiembre 2004). *Novedoso desarrollo biotecnológico : Alimentos con menos colesterol*. En: Encrucijadas, no. 27. Universidad de Buenos Aires. Disponible en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad de Buenos Aires: <http://repositorioubu.sisbi.uba.ar>

## NOVEDOSO DESARROLLO BIOTECNOLOGICO

### Alimentos con menos colesterol

*Investigadores del Conicet y de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA desarrollaron un microorganismo unicelular (Tetrahymena) que al ser incorporado a alimentos como la leche y el huevo les reduce el colesterol en un 90 % transformándolo en provitamina D.*

### **Clara Nudel (\*), Alejandro Nusblat (\*\*), GERMAN VALCARCE (\*\*\*) y Jorge Florin-Christensen (\*\*\*\*)**

(\*) Doctora en Industrias Bioquímico-Farmacéuticas. Profesora Adjunta Regular de la Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Miembro de la Carrera del Investigador Científico del Conicet.

(\*\*) Bioquímico, UBA (1999). Docente de la Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

(\*\*\*) Licenciado Químico Farmacéutico, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

(\*\*\*\*) Biólogo, investigador independiente del Conicet, actualmente trabaja en la cátedra de Parasitología de la Facultad de Medicina.

Numerosos estudios epidemiológicos realizados en todo el mundo han demostrado que el alto consumo de grasas saturadas y de colesterol están íntimamente relacionados con la incidencia de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares [1].

Tradicionalmente, una de las herramientas más efectivas para reducir el riesgo de padecer estas enfermedades ha sido el cambio en los hábitos alimentarios, tendiendo siempre a reducir el consumo de alimentos ricos en grasas saturadas y colesterol e incorporar en la dieta ácidos grasos mono y poli-insaturados, ya que éstos cumplen un rol importante en la prevención de estas enfermedades cardiovasculares [2].

Tanto la leche como sus derivados son componentes importantes de la alimentación humana. Proveen de calcio, fosfato, aminoácidos, vitaminas, carbohidratos y otros compuestos en forma y cantidades adecuadas para la nutrición [3]. Sin embargo, estos productos son ricos en colesterol y pobres en contenido de ácidos grasos poli-insaturados, lo que constituye una importante desventaja. Otro de los alimentos naturales más completos en nutrientes esenciales para una dieta balanceada como el huevo es utilizado ampliamente como ingrediente en una gran variedad de productos alimenticios y al igual que la leche, su desventaja principal es el alto contenido de colesterol, y en forma menos frecuente la hipersensibilidad causadas por sus proteínas.

Esto ha llevado a industrias alimentarias así como también a investigadores a la búsqueda de desarrollos e innovaciones con el objetivo común de reducir el colesterol en estos alimentos.

En la actualidad no se dispone de un procedimiento simple, económico y selectivo para la eliminación del colesterol en los alimentos ya que todos los métodos propuestos poseen

algunas desventajas: son económicamente impracticables, como la extracción con solventes o el uso de fluidos supercríticos [4]; son inespecíficos, pues eliminan la totalidad de los lípidos, incluyendo vitaminas liposolubles, ácidos grasos insaturados y cofactores, como el desnatado y el agregado de ciclodextrinas [5]; de variada efectividad, como es el agregado de fitosteroles, que disminuyen la absorción intestinal de colesterol entre 5 y 20 % [6].

Por estos motivos, los productos de origen animal tienen severas limitaciones para su utilización en la elaboración de productos saludables. Este problema afecta fundamentalmente a la industria láctea, incluyendo la elaboración de quesos, manteca, derivados de huevo, y favorece el empleo de derivados menos sabrosos y nutritivos como la margarina, que posee ácidos grasos trans, altamente aterogénicos.

El cultivo de la leche con varios microorganismos para aumentar sus efectos beneficiosos es de particular importancia en el desarrollo de la industria alimentaria. Estos tipos de productos mejorados (probióticos) atraen cada vez más al público en busca de dietas más naturales [7]. De esta forma está aumentando la demanda de microorganismos nuevos y más versátiles. El ciliado *Tetrahymena thermophila* es un protozoario de vida libre, no patógeno, el cual crece con tiempo de generación corto (1,4 hs.) [8]. Posee varias peculiaridades de interés para la aplicación en procesamientos de alimentos. Éstas incluyen la habilidad de bioconvertir colesterol a  $\Delta^7$ -dehidrocolesterol (provitamina D3) y  $\Delta^7,22$ -dehidrocolesterol, un análogo cercano al ergosterol (provitamina D2), la biotransformación es realizada por dos enzimas: la C7 y la C22-colesterol desaturasa figura 1, [9]. Este ciliado posee también la habilidad de desaturar ácidos grasos saturados preformados, convirtiéndolos a mono y poli-insaturados, como la conversión de ácido estearico (18:0) a ácido linoleico (18:3, n-6) [10]. Otro aspecto benéfico del protozoario es la secreción de altas cantidades de enzimas hidrolíticas al medio extracelular, las cuales podrían servir para predigerir componentes complejos de varias fuentes alimenticias [11], dentro de estas hidrolasas se encuentran enzimas lipolíticas como la fosfolipasa C, fosfolipasa A1 y la triacilglicerol lipasa, las cuales participarían en el proceso de remoción del colesterol [12].

La batería enzimática de *Tetrahymena* es potencialmente útil para tratar la leche o el huevo con el objetivo de reducir el colesterol y simultáneamente aumentar la provitamina D. Podría también proveer ácidos grasos esenciales y digerir proteínas. Con este fin, hemos investigado como cultivos de *Tetrahymena* pueden ser utilizados para el tratamiento de estos importantes alimentos.

Un importante rol de la provitamina D3 es ser el precursor del calcitriol, la hormona que controla la absorción y excreción del calcio en el organismo. La conversión de esta provitamina a calcitriol involucra la apertura de la molécula por luz UV, seguido de la hidroxilación en posición 1 y 25 de la misma. La carencia de vitamina D3 causa raquitismo en niños y osteomalacia en adultos [13]. La misma es normalmente agregada a la leche y sus derivados, y es comercialmente producida mediante largos pasos de síntesis química. Un mejor método para suplementar vitamina D3 y al mismo tiempo reducir el tenor de colesterol, sería el tratamiento con el microorganismo *Tetrahymena*, promoviendo la correcta formación y mantenimiento óseo sin afectar la salud cardiovascular. Como se ha explicado, este doble propósito puede ser llevado a cabo mediante un simple paso enzimático: la desaturación de colesterol en posición siete.

Diferentes ensayos han sido realizados en leche y huevo con cultivos del microorganismo, se ha estudiado también la caracterización enzimática y actualmente se está llevando a

cabo la investigación genética de las enzimas.

La biotransformación del colesterol de la leche por *Tetrahymena* requirió del desarrollo de un procedimiento especial para preservar la viabilidad del mismo antes de ser transferido a la leche. Se observó que las células no toleraban la alta osmolaridad (50 gramos / L de lactosa). Para resolver este inconveniente se incubó previamente la suspensión celular con 5% de glucosa, equilibrando osmóticamente al ciliado para así preservar su viabilidad al momento de la bioconversión. De esta forma con cultivos de  $10^7$  células / ml se logró convertir más del 40% del colesterol en derivados desaturados, incluyendo la provitamina D3 (Figura 2). El colesterol restante es encapsulado por el ciliado, quedando solamente un 5% en la leche.

Otros interesantes resultados al incubar *Tetrahymena* en la leche fue el cibaje de la caseína (proteína más abundante) sin la coagulación o la aparición de sabor amargo en la misma, más aún se obtuvo un remarcable incremento en los aminoácidos totales (cerca del 50 %) a las 10 horas del proceso. También se logro un cambio en la composición de ácidos grasos, se observo que el ácido linoleico 18:3 (n-6) (ácido graso poli-insaturado) estaba aumentado 5 veces.

En contraste a la leche, la modificación del colesterol en el huevo no requirió previa incubación con glucosa. Una suspensión de huevo entero, diluido al quinto con agua destilada fue incubado bajo continua aireación por 24 horas luego de la adición de 106 células/ ml. La conversión obtenida esta vez fue del 55% del colesterol inicial presente en el huevo (Figura 3).

El proceso fue acompañado también con marcada degradación proteica, pero las características organolépticas del huevo fueron similares a la suspensión control incubada sin el agregado del microorganismo.

Una consideración importante en la introducción de nuevos organismos en la industria alimentaria es su seguridad. En este aspecto, debe enfatizarse que *Tetrahymena* es considerado como GRAS (organismos seguros). A pesar de su localización ubicua, no se han detectado efectos nocivos del microorganismo para la salud humana. Es importante destacar que todas las propiedades relevantes ocurren naturalmente en esta célula, no es un organismo genéticamente modificado, en el sentido que ninguna tecnología de ADN recombinante ha sido involucrada para la producción de estas cepas.

En conclusión, *Tetrahymena* aparece como una nueva herramienta para mejorar alimentos como la leche, el huevo y sus derivados, manteniendo sus efectos benéficos y disminuyendo aquellos que no lo son.

### **¿Qué es el colesterol?**

Los esteroides son constituyentes esenciales de las membranas de las células, sintetizados por la mayoría de los eucariontes. Regulan la fluidez y permeabilidad e interactúan con lípidos y proteínas cumpliendo funciones regulatorias en diversos sistemas. Desde esta perspectiva intervienen en el desarrollo embrionario en vertebrados [14] y en la formación de centros de señalización al crear microdominios en membrana relacionados con la internalización de antígenos como los lipids rafts [15]. Finalmente en vertebrados son los precursores de numerosos compuestos con actividad fisiológica como esteroides y sales biliares [16].

El producto final en la biosíntesis de esteroides en vertebrados es el colesterol, mientras

que en numerosos hongos y levaduras es el ergosterol y en las plantas superiores se sintetiza una mezcla compleja de esteroides con predominio de sitosterol y estigmasterol. Todos estos compuestos responden a la estructura general del ciclopentoperhidrofenantreno y presentan desaturaciones en la molécula.

Si bien es muy poco frecuente la presencia de esteroides en bacterias, en ciertos géneros los opanoides son los componentes encontrados en las membranas. Éstos, a diferencia de los esteroides, son totalmente saturados y su biosíntesis no necesita oxígeno debido a la ausencia de la enzima escualeno oxidasas [17]. Estos compuestos son químicamente inertes y tienden a acumularse siendo las moléculas orgánicas más abundantes de la naturaleza, y se los encuentra formando parte de los yacimientos petrolíferos [18].

Un aspecto de particular interés en el protozoario *Tetrahymena* es que en lugar de esteroides produce opanoides como el tetrahymanol y el diplopterol. Por este motivo se ha postulado que estos compuestos representan los análogos de los esteroides que prevalecían en los eucariotas en los tiempos en los que la atmósfera era anaerobia. Si bien *Tetrahymena thermophila* carece de la capacidad de biosintetizar esteroides, cuando se agregan los mismos en el medio de cultivo se interrumpe inmediatamente la síntesis de tetrahymanol y el esteroide es acumulado o modificado parcialmente. En el caso del colesterol se introducen modificaciones en la molécula por desaturación en las posiciones D-7 y D-22 en el anillo B y cadena lateral respectivamente [9]. Los compuestos generados son D-7 dehidrocolesterol (pro vitamina D3), D-7, 22 bis, dehidrocolesterol (análogo de la provitamina D2) y D-22 dehidrocolesterol, como se indica en la Figura 1.

### **Reseña histórica**

El proyecto de investigación nació de una idea entre el Lic. Germán Valcarce, la Dra. Clara Nudel y el Dr. Jorge Florin-Christensen. En 1999 el Dr. Christensen, mientras realizaba tareas de investigación en la Universidad de Washington, se contactó con inversores mormones, quienes apoyaron la idea. De esta forma se pudo realizar y patentar el trabajo. Luego, a partir del año 2000, los bioquímicos Luciana Muñoz y Alejandro Nusblat (este último realizando su tesis de doctorado) continuaron el estudio de las enzimas en el nivel genético-molecular, involucradas en el proceso de biotransformación del colesterol.

Hoy el proyecto es declarado de "interés científico y social" por el Senado de la Nación. Si bien aún no hay disponible en el mercado un alimento que incluya la metodología desarrollada, el doctor Florin-Christensen se encuentra en tentativas con inversores privados locales para trasladar la metodología a una escala industrial. Sus trabajos fueron publicados en las revistas especializadas *Journal of Dairy Science*, *Journal of Food Science*, *Applied Microbiology and Biotechnology* y *Current Topics in Biotechnology*.

### **Notas**

[1] Gotto, A.M. Jr. (2002), "High-density lipoprotein cholesterol and triglycerides as therapeutic targets for preventing and treating coronary artery disease". *Am. Heart J. Dec*; 144 (6 Suppl): S33-42.

[2] Mutanen, M. (1997), "Comparison between dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids as regards diet-related diseases". *Biomed. Pharmacother.* 51:314-317.

[3] Hullar, I. and Brand, A. (1993), "Nutritional factors affecting milk quality, with special

regard to milk protein: a review". *Acta Vet Hung.* 41 (1-2):11-32.

[4] Cully, J.; Vollbrecht, H.-R.; Schutz, E. (Oct. 29, 1991), Process for the removal of cholesterol and/or cholesterol esters from foodstuffs. U.S.Patent 5,061,505.

[5] Courregelongue, J. and Maffrand J-P. (Nov. 14, 1989), Process for eliminating cholesterol contained in a fatty substance of animal origin and the fatty substance with reduced cholesterol obtained. U.S.Patent 4,880,573.

[6] Ostlund, R.E. Jr. (2004), "Phytosterols and cholesterol metabolism". *Curr Opin Lip.* 15 (1):37-41.

[7] Chandan, R.C. (1999), "Enhancing the market value of milk by adding cultures". *J. Dairy Sci.* 82: 2245-2256.

[8] Kiy, T., and A. Tiedtke (1992), "Mass cultivation of *Tetrahymena thermophila* yielding high cell densities and short generation times". *Ap. Microbiol. Biotech.* 37:576-579.

[9] Mallory, F.B. and R.L. Conner (1970), "Dehydrogenation and De-alkylation of Various Sterols by *Tetrahymena pyriformis*". *Lipids* 6:149-153.

[10] Holz, G.G. Jr., and R.L. Conner (1973), "The composition, metabolism and roles of lipids in *Tetrahymena*". In: *Biology of Tetrahymena*, pp. 99-122 A.M. Elliott, ed. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. Stroudsburg, PA.

[11] Florin-Christensen, M.; J. Florin-Christensen; A. Tiedtke, and L. Rasmussen (1989), Minireview: New aspects of extracellular hydrolytic enzymes in lower eukaryotes. *Eur. J. Cell Biol.* 48:1-4.

[12] Kozo, O., and S. Chiaki (1992), "Method of reducing cholesterol concentration in food". European Patent EP 0493045.

[13] Rozman, C. (1995), *Medicina Interna*. Mosby/Doyma, Madrid.

[14] Kip Guy, R. (2000), "Inhibition of sonic hedgehog autoprocessing in cultured mammalian cells by sterol deprivation". *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 97, 7307-7312.

[15] Karpen, H.E.; Bukowski, J. T.; Hughes, T.; Gratton, J.P.; Sessa, W.C., and Gailani, M.R. (2001), "The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane". *J. Biol. Chem.* 276:19503-19511.

[16] Benveniste, P. (2002), *Sterol Metabolism, The Arabidopsis Book*.

[17] Kannenberg E.L, Poralla K. 1999: Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* 86, 168-176.

[18] Mallory, F.B. and R.L. Conner (1970), *Op. cit.*, in *Lipids*, Vol. 6, No.3: 149-152.