

Centro de Investigaciones de Energía Solar
Santiago de Cuba

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD PROTEICA DE LA BIOMASA AUTOTRÓFICA DE *CHLORELLA VULGARIS*

Humberto Joaquín Morris Quevedo,¹ María Magdalena Quintana Cabrales,² Ángel Almarales Arceo³ y Lisethy Hernández Nazario³

RESUMEN

Se estudiaron la composición bioquímica y las características del perfil aminoacídico de la microalga *Chlorella vulgaris*, cultivada en régimen autotrófico, y se evaluó además la calidad de su proteína mediante métodos químicos. Los resultados evidenciaron que la biomasa de esta especie microalgal, dado su elevado contenido de proteína bruta y verdadera, superior al 40 y 30 %, respectivamente, unido a una composición balanceada y niveles aceptables de ácidos nucleicos, constituye una fuente alternativa de posible utilización como suplemento nutricional. El patrón de aminoácidos mostró una distribución bien equilibrada, que incluyó todos los aminoácidos esenciales, en tanto la fuente proteica presentó un cómputo corregido de 0,64, donde incidieron la digestibilidad de la biomasa, con un valor de 75,9 %, y el contenido relativamente bajo de aminoácidos sulfurados.

Descriptores DeCS: CHLORELLA/química; BIOMASA; SUPLEMENTOS DIETÉTICOS.

Las microalgas representan una fuente proteínica con posibles aplicaciones en la nutrición humana y como complemento de piensos animales, debido básicamente a sus elevados contenidos proteicos, potenciados por el hecho de poseer un buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos en comparación con otras fuentes de proteína unicelular.¹

Aunque las investigaciones sobre la utilización de las microalgas en la alimentación parecen ser un tema relativamente reciente, en realidad su consumo por los habitantes de determinadas zonas data de tiempos inmemoriales;² sin embargo, los primeros ensayos con *Chlorella* en la dieta humana fueron realizados en la década de los 60, unido a la ejecución de estudios

¹ Licenciado en Bioquímica. Aspirante a Investigador.

² Licenciada en Química. Investigadora Agregada.

³ Licenciado en Química. Aspirante a Investigador.

adicionales demostrativos de que *Scenedesmus* era una excelente fuente de proteínas para el hombre. Estas evidencias motivaron a los nutricionistas a continuar investigando las posibilidades de empleo de la biomasa obtenida a partir de cultivos masivos de microalgas en la formulación de tabletas, extractos, hidrolizados y otros productos dietéticos.³

Al tomar en consideración el interés actual en nuestro país por el desarrollo de nuevos suplementos nutricionales y la experiencia del Centro de Investigaciones de Energía Solar en el cultivo intensivo de diferentes especies de microalgas, se decidió estudiar en el presente trabajo la composición bioquímica general y las características del perfil aminoacídico de la proteína de *Chlorella vulgaris*, cultivada en régimen autotrófico, y evaluar preliminarmente su calidad mediante métodos químicos.

MÉTODOS

Obtención y tratamiento de la biomasa.

La biomasa de *Chlorella vulgaris* se obtuvo a partir de un cultivo autotrófico monoalgal, desarrollado a cielo abierto en una instalación experimental, tipo película descendente de 500 m², en el Centro de Investigaciones de Energía Solar. La crema obtenida después de la centrifugación de la suspensión algal fue sometida a un proceso de despigmentación con etanol, luego de lo cual se procedió a la disrupción celular de la crema resultante en un molino de bolas (Dynomill KDL), con un tiempo de retención de 3 min.

Para su conservación, la biomasa fue secada por aspersión en un secador *spray* (Niro Atomizer) y el polvo de color verde claro quedó almacenado en recipientes plásticos hasta su utilización.

Caracterización bioquímica de la biomasa de Chlorella vulgaris. Para el

análisis bioquímico de la biomasa se tomaron muestras, las que fueron caracterizadas en relación con: pérdidas por desecación, nitrógeno total, proteína bruta (micro-Kjeldahl, empleando 6,25 como factor de conversión para la estimación del contenido proteico), fibra cruda y cenizas, según los procedimientos de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC).⁴

Las proteínas verdaderas se cuantificaron por el método de Lowry y otros⁵ y los carbohidratos por el de fenol-sulfúrico, según *Dubois y otros*.⁶ El contenido de lípidos en la biomasa se evaluó como aconseja *Kocher*,⁷ luego de extraer los compuestos de bajo peso molecular con ácido perclórico 0,2 N en baño de hielo.

Los ácidos nucleicos totales fueron determinados espectrofotométricamente en la región ultravioleta mediante el método de Rut,⁸ previa extracción con ácido perclórico 0,5 M. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Composición aminoacídica. La composición de aminoácidos se precisó en un analizador automático (Alpha Plus, modelo 4151, LKB), después de la hidrólisis de las muestras con HCl 5,7 N a 110 °C durante 24 h.⁹ La cuantificación de triptófano se hizo mediante espectrofotometría UV de la cuarta derivada, según *Fletouris y otros*.¹⁰

Evaluación de la calidad proteica. La digestibilidad de la proteína microalgal fue evaluada mediante la simulación *in vitro* del sistema enzimático tripsina-quimotripsina-peptidasa, a partir de los valores de pH de las suspensiones proteicas, registrados exactamente a los 10 min de iniciada la digestión enzimática, según *Hsu y otros*.¹¹

El cómputo químico se obtuvo de comparar el perfil de aminoácidos esenciales de la proteína microalgal, corregido en función de su digestibilidad (PDCAAS), con los requerimientos de aminoácidos esenciales (mg/g de proteína bruta) establecidos por FAO/OMS para edades fluc-

tuantes entre 2-5 años. La selección de este patrón de demandas se justifica por presentar las mayores exigencias, con excepción de menores de 2 años.¹²

El índice modificado de aminoácidos esenciales (MEAA) se calculó mediante el procedimiento descrito por Oser,¹³ según las modificaciones de Mitchell.¹⁴

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los componentes principales de la biomasa de *Chlorella vulgaris*, tratada previamente con etanol, cuyo contenido proteico resultó superior al 40 y 30 % en términos de proteínas bruta y verdadera, respectivamente, seguidas cuantitativamente por los carbohidratos. También se señala la presencia de cenizas, fibra cruda y ácidos nucleicos como elementos minoritarios (22,79 %), así como concentraciones de lípidos inferiores al 1 %.

La digestibilidad *in vitro* de la biomasa de *Chlorella vulgaris* tuvo un valor prome-

TABLA 1. Composición bioquímica (%) de la biomasa de *Chlorella vulgaris*

Componentes	Porcentaje
Pérdidas por desecación	7,18
Nitrógeno total	7,13
Proteína bruta	44,56
Proteína verdadera	32,25
Carbohidratos	16,00
Fibra cruda	8,20
Lípidos	0,29
Cenizas	8,90
Ácidos nucleicos totales	5,69

dio de 75,9 %, relativamente inferior al alcanzado por la caseína (93,4 %).

La tabla 2 registra la composición aminoacídica de *Chlorella vulgaris* en comparación con la proteína de referencia de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO)¹⁵ y otras proteínas de microalgas y alimentos convencionales.¹⁶ El patrón de aminoácidos evidenció en general una distribución bien equilibrada, con un índice de aminoácidos esenciales de 82,13 y un valor del PDCAAS de 0,64.

TABLA 2. Composición aminoacídica (g/16 g N) de la proteína de *Chlorella vulgaris* en comparación con el patrón FAO y proteínas de microalgas y alimentos convencionales

<i>C. vulgaris</i>	Patrón FAO	<i>Scenedesmus</i>	Huevo entero	Trigo
Ile 4,82	4,00	3,60	5,80	3,80
Leu 10,78	7,00	7,30	9,00	6,40
Lys 7,70	5,50	5,60	6,70	2,70
Met 1,55	3,50 (Met + Cys)	1,50	3,00	1,60
Phe 6,02	6,00 (Phe + Tyr)	4,80	5,30	4,60
Thr 5,60	4,00	5,10	5,30	2,90
Val 7,86	5,00	6,00	7,20	4,30
Trp 1,10	1,00	-	1,70	-
Tyr 3,02		3,20	4,30	3,20
Ala 7,18		9,00	-	3,40
Arg 7,97		7,10	6,40	4,30
Asp 10,39		8,40	10,70	5,00
Cys 0,50		0,60	2,10	2,10
Glu 11,60		10,70	12,30	27,70
Gly 5,05		7,10	3,80	3,80
His 2,40		2,10	2,60	2,10
Pro 3,88		3,90	4,30	10,10
Ser 3,50		3,80	7,70	4,80

DISCUSIÓN

Las concentraciones de proteínas bruta y verdadera detectadas en nuestro estudio revelaron una calidad razonablemente buena en contraste con otras fuentes proteínicas reconocidas; asimismo, los carbohidratos presentes (16,00 %) suelen formar parte del material de reserva y desempeñan una importante función en la digestibilidad de la biomasa total de microalgas.

Los niveles de lípidos, inferiores al 1 %, son una consecuencia lógica de la extracción de muchos de los compuestos lipofílicos de la biomasa con etanol. Este tratamiento se realizó para atenuar la coloración verde intensa de la biomasa, con la consiguiente mejoría de las propiedades organolépticas e incremento de la aceptabilidad.

Las cenizas representaron una fracción considerable del peso seco, que resultó comparable con los valores informados para otras especies dulceacuícolas y por debajo de los existentes en las especies marinas.¹⁶

Los ácidos nucleicos devienen el único componente intrínseco de relevancia toxicológica y una de las mayores limitaciones para el uso de este tipo de biomasa, al constituir una fuente no despreciable de purinas, que en su metabolismo producen ácido úrico.¹⁷ Las altas concentraciones de ácidos nucleicos son típicas de todas las proteínas unicelulares; en *Chlorella vulgaris*, el contenido total de éstos (RNA + DNA) presentó un valor de 5,69 %, comprendido en el intervalo notificado para las algas unicelulares e inferior al de bacterias y levaduras.

El contenido de 8,20 % de fibra cruda refleja la fracción de materiales derivados de la pared celular. Las proteínas microalgales (a excepción de las cianobacterias) brindan pobres resultados si

se utilizan como células intactas en la alimentación de animales monogástricos y seres humanos, por lo cual se desarrollan diferentes métodos mecánicos, enzimáticos y químicos para degradar las células y aumentar así la disponibilidad nutritiva de estas proteínas.

En nuestro estudio, la digestibilidad *in vitro* presentó un valor de 75,9 %, que cumple con las especificaciones de calidad establecidas por el Ministerio de Salud Pública para las tabletas de *Spirulina*.¹⁸

La composición aminoacídica de *Chlorella vulgaris* fue comparable con la proteína de referencia de la FAO, excepto por los bajos contenidos de los aminoácidos sulfurados (Met + Cys), fenómeno muy común en otros microorganismos. En cambio, presentó niveles de lisina superiores al patrón FAO y similares al huevo entero; aminoácido este que es el limitante en muchos cereales, por lo que tal microalga constituye una fuente apropiada para mejorar la calidad de dichos alimentos, en función de su composición de aminoácidos.

En la literatura existen referencias sobre las propiedades hipocolesterolemicas de la microalga *Chlorella vulgaris*. Se ha demostrado que la relación Lys/Arg influye significativamente sobre el metabolismo del colesterol en las ratas: una relación Lys/Arg de 1,0 se asocia a una disminución de los niveles de colesterol en suero, hígado y aorta y a un incremento de la conversión oxidativa del colesterol en ácidos biliares, en comparación con un valor de 2,0.¹⁹ Mientras menor sea esta relación, mayor será la reducción de la concentración de colesterol plasmático. La proteína de *Chlorella vulgaris* presentó una relación Lys/Arg de 0,97; elemento que conjuntamente con otros factores podría explicar sus acciones moduladoras sobre el metabolismo del colesterol.

La determinación del índice modificado de aminoácidos esenciales (MEAA)

es un procedimiento que brinda resultados muy próximos a los valores obtenidos en los ensayos biológicos de alimentación. El índice en *Chlorella vulgaris* (82,13), aunque fue inferior al de la caseína (92,24), no mostró diferencias significativas con respecto al de la microalga marina *Dunaliella tertiolecta* (81,00) y la cianobacteria *Spirulina* (85,22) y presentó un valor superior al de *Scenedesmus* (70,72).¹⁶

La razón de eficiencia proteica (PER) ha sido reconocida tradicionalmente como el método preferencial de evaluación de la calidad proteica, sin embargo, sobreestima el valor de ciertas proteínas animales, a la vez que subvalora a las vegetales. En este sentido, la Regional Federation of Food and Drug Administration (FDA) recomendó la sustitución de la razón de eficiencia proteica y la introducción, con propósitos regulatorios, del cómputo de aminoácidos corregido en función de la digestibilidad proteica (PDCAAS) para la evaluación

nutricional de productos destinados al consumo humano.²⁰

El PDCAAS de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris* tuvo un valor de 0,64, en el cual incidieron fundamentalmente la digestibilidad de la fuente proteica y el déficit de los aminoácidos sulfurados (primer limitante). Es oportuno señalar que la aplicación de este método para la evaluación de la calidad proteica de las microalgas resulta novedosa y que no existe en la bibliografía consultada referencia alguna sobre su uso con anterioridad. Hasta el presente, la mayor parte de las evaluaciones realizadas emplean la razón de eficiencia proteica en experimentos de alimentación a corto plazo en ratas recién destetadas.¹

Los resultados del presente trabajo sugieren la utilización de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris* como materia prima en la formulación de suplementos dietéticos y preparados bioestimulantes, en virtud de su composición bioquímica y calidad proteica.

SUMMARY

The biochemical composition and the characteristics of amino acid profile of microalgae *Chlorella vulgaris*, cultured under autotrophic conditions, were studied and, additionally, protein quality of these microalgae was assessed by chemical methods. The results revealed that this microalga biomass, given its high gross and real protein content over 40 % and 30 % respectively, together with balanced composition, acceptable levels of nuclear acids, constitutes an alternative source that may be used as nutritional supplement. The amino acid distribution pattern was well?balanced including all essential amino acids whereas protein source showed a corrected index of 0.64 due to the effects of the biomass digestibility value of 75.9 % and the relatively low sulfided amino acids.

Subject headings: CHLORELLA/chemistry; BIOMASS; DIETARY SUPPLEMENTS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abalde J, Cid A, Fidalgo JP, Torres E, Herrero C. Microalgas: cultivo y aplicaciones. La Coruña: Servicio de Publicaciones;1995:210.
2. Furst PT. Spirulina. Human Nature 1978;60:60-5.
3. Kay RA. Microalgae as food and supplement. Crit Rev Food Sci Nutr 1991;30(6):555-73.
4. AOAC. Official methods of analysis. 14 ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists;1984:
5. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.
6. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956;28:350-6.

7. Kochert G. Quantitation of the macromolecular components of microalgae. En: Hellebust JA, Craigie JS, eds. Handbook of phycological methods. Physiological and biochemical methods. London: Cambridge University;1978:189-95.
8. Rut M. Kuasny Prumyse 1973;19:131.
9. Blackburn S. Amino acid determination. Methods and techniques. 2 ed. New York: Marcel Dekker;1978:
10. Fletouris DJ, Botsoglou NA, Papageorgiou GE, Mantis AJ. Rapid determination of tryptophan in intact proteins by derivative spectrophotometry. J AOAC Internat 1993;76(6):1168-73.
11. Hsu HW, Vavak DL, Satterlee LD, Miller GA. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. J Food Sci 1977;42(2):1269-73.
12. Henley EC, Kuster JM. Protein quality evaluation by protein digestibility?corrected amino acid scoring. Food Technol 1994;48(4):74-7.
13. Oser BL. Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein. J Am Diet Assoc 1951;27:396-402.
14. Mitchell HH. Biological values of proteins and amino acids interrelationships. En: Spector H, Peterson MS, Friedman TE, eds. Symposium on methods for the evaluation of nutritional adequacy and status. Washington, DC:National Research Council;1954:13-28.
15. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Amino acid content of foods and biological data on proteins. Rome: FAO, 1970: (Nutritional Studies;no. 24).
16. Herrero C, Vecino E, Abalde J. The marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher): nutritional properties and hypocholesterolemic effects. En: Villa TG, Abalde J, eds. Porfiles on biotechnology. La Coruña: Servicio de Publicaciones;1992:271-88.
17. Becker EW. Biotechnology and microbiology. Cambridge: University Press;1994:293.
18. Bermúdez E, Núñez R, Serrano A. Spirulina tabletas. Especificaciones de calidad. La Habana: Laboratorio Técnico de Medicamentos, Departamento de Estabilidad;1991. (Técnica nr 5-10-91A).
19. Rajamohan T, Kurup PA. Lysine to arginine ratio of protein and its effect on cholesterol metabolism. Indian J Biochem Biophys 1986;23:294-6.
20. FDA. Food labeling. General provisions; nutrition labeling; label format; nutrient content claims; health claims; ingredient labeling; state and local requirements and exemptions; final rules. Food Drug Admin Fed Reg 1993;58(3):2101-6.

Recibido: 9 de febrero de 1999. Aprobado: 26 de marzo de 1999.

Lic. *Humberto Joaquín Marris Quevedo*. Agramonte No. 58 entre Veteranos y Correoso, El Cristo, Santiago de Cuba, CP 94310, Cuba.