

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas.
Universidad de Oriente

ARTÍCULOS ORIGINALES

COMBINACIONES ENZIMÁTICAS EN LA OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS A PARTIR DE *CHLORELLA VULGARIS*

Humberto Joaquín Morris Quevedo,¹ Ángel Almarales Arceo,² Olimpia Carrillo Farnés³ y Roberto T. Abdala Díaz⁴

RESUMEN

Las microalgas representan en la actualidad una opción atractiva para el desarrollo de nuevos suplementos nutricionales y alimentos para regímenes especiales, mediante la bioconversión de la energía solar en virtud del alto contenido de proteínas y sustancias biológicamente activas en la biomasa celular. Se investigó el efecto de la utilización de 5 combinaciones enzimáticas en la hidrólisis de las proteínas presentes en la biomasa autotrófica de la microalga *Chlorella vulgaris* tratada previamente con etanol. Los mejores resultados se obtuvieron con las mezclas papaína-tripsina y papaína-pancreatina, las que rindieron hidrolizados con niveles de nitrógeno amínico y grados de hidrólisis superiores al 4 y 45 %, respectivamente. Estos elementos evidencian un efecto positivo del empleo de mezclas enzimáticas en comparación con las enzimas individuales, lo cual está mediado por la superposición de sus acciones hidrolíticas.

DeCs: ALGAS; ALGAS VERDES; CHLORELLA; HIDROLIZADOS DE PROTEINA/
/uso terapéutico; HIDROLIZADOS DE PROTEINA/química; ALIMENTACION; DIE-
TA; PEPTIDO HIDROLASAS/uso terapéutico; HIDRÓLISIS.

En el tratamiento de diversas enfermedades se dedica una atención especial a la dieta y a la terapia nutricional, por lo que las modificaciones del patrón normal

de alimentación resultan convenientes y aun esenciales en ciertas afecciones.¹ Diversos estudios experimentales y clínicos han aportado numerosas evidencias relacionadas con

¹ Master en Bioquímica de la Nutrición. Investigador Agregado. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba.

² Licenciado en Química. Investigador Agregado. División de Biotecnología Solar. Centro de Investigaciones de Energía Solar. Santiago de Cuba.

³ Doctora en Ciencias Biológicas. Profesora Titular de Bioquímica de la Nutrición. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.

⁴ Master en Ciencias Químicas. Licenciado en Química. Investigador Agregado. División de Biotecnología Solar. Centro de Investigaciones de Energía Solar. Santiago de Cuba.

los efectos bioestimulantes y propiedades terapéuticas de los hidrolizados proteicos de distintas fuentes, de manera que comienzan a ser esclarecidos los mecanismos mediante los cuales ejercen sus acciones moduladoras.

Las dietas basadas en hidrolizados proteicos son útiles en el manejo nutricional de enfermedades de la mucosa gastrointestinal, en pacientes hipercatabólicos, síndromes de malnutrición² y en la disminución de las reacciones anafilácticas atribuidas a proteínas y macropéptidos.³ Otros efectos terapéuticos asociados con la administración de hidrolizados proteicos están relacionados con el incremento de la función detoxificadora del amonio en el tejido muscular⁴ y por otra parte, se ha sugerido que los hidrolizados de las proteínas influyen en la regulación endocrina de los procesos metabólicos.⁵

El alto contenido proteico (aproximadamente el 50 % de la biomasa) y el perfil aminoacídico de las algas verdes unicelulares, evidencian una calidad razonablemente buena al compararlas con las fuentes convencionales de proteínas. Sin embargo, las algas *Chlorella* y *Scenedesmus* debido a sus rígidas paredes celulares, muestran una pobre digestibilidad y prácticamente no son toleradas por el hombre y los animales monogástricos.⁶

La hidrólisis enzimática de las proteínas celulares constituye una de las tendencias más prometedoras para incrementar la digestibilidad de la biomasa algal y la formulación de diversos productos proteicos.⁷

En un trabajo anterior, *Morris* y otros⁸ estudiaron las posibilidades de hidrólisis enzimática de las proteínas celulares de *Chlorella vulgaris* cultivada en régimen autotrófico en el Centro de Investigaciones de Energía Solar (CIES). Los resultados evidenciaron que el proceso de hidrólisis transcurrió más eficientemente en la biomasa tratada previamente con etanol y se demostró, además, que diferentes

enzimas proteolíticas pueden ser utilizadas con este propósito.

Tomando en consideración estos elementos, ha sido de interés investigar en el presente trabajo el efecto que produciría la utilización de combinaciones enzimáticas en la hidrólisis de las proteínas presentes en la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris* tratada previamente con etanol.

MÉTODOS

Obtención y tratamiento de la biomasa. La biomasa de *Chlorella vulgaris* fue obtenida a partir de un cultivo autotrófico desarrollado a cielo abierto en una instalación experimental de 500 m² en el CIES. Después de la centrifugación de la suspensión algal, la crema resultante fue sometida a un proceso de secado por aspersión (Niro Atomyzer) y el polvo verde oscuro fue conservado en recipientes plásticos hasta su utilización. Esta biomasa se despigmentó con etanol (400 mL/100 g), realizando 3 extracciones sucesivas de 1 h de duración cada una en condiciones de agitación moderada.

La composición bioquímica porcentual de la biomasa de *Chlorella vulgaris* utilizada en nuestras experiencias son las siguientes:⁹

– Pérdida 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

Determinación de la actividad enzimática de los preparados proteolíticos empleados. Se utilizaron las enzimas proteolíticas siguientes: papaína,

pancreatina (MERCK), tripsina (Léciva, Praha) y bromelina (Centro de Bioplasmas, Ciego de Ávila). La determinación de la actividad enzimática de estos preparados se realizó según el método de Anson,¹⁰ empleando como sustrato proteico una solución de caseína desnaturalizada al 2 %. Una unidad de actividad proteolítica expresa la cantidad de enzima necesaria para catalizar la liberación de 1 μmol de tirosina a 35 °C y al pH óptimo de la enzima en 1 min. Para el cálculo de la actividad específica (unidades de actividad/miligramos de proteína) se determinó la concentración de proteínas en los preparados enzimáticos según el método de Lowry y otros.¹¹ Las enzimas empleadas y las actividades específicas (μmol de Tyr $\text{min}^{-1}/\text{mg}$ de proteína) correspondientes se presentan a continuación:

– Papaína	0,130
– Bromelia	1,197
– Tripsina	0,070
– Pancreatina	0,470

Estudio del efecto de la combinación de diferentes enzimas proteolíticas. Se realizaron experiencias empleando suspensiones al 10 % en agua de la biomasa des pigmentada con etanol, las que fueron sometidas a hidrólisis enzimática durante 4 h a una temperatura de 37 °C en condiciones de agitación continua. Se utilizaron las mezclas enzimáticas siguientes: bromelina-tripsina, bromelina-pancreatina y papaína-bromelina (pH 7,0) y por otra parte, papaína-tripsina y papaína-pancreatina (pH 7,5). Las mezclas fueron conformadas de modo tal de emplear 10 unidades proteolíticas de cada enzima por gramo de biomasa.

La reacción se detuvo mediante el calentamiento a 100 °C durante 15 min. La mezcla resultante se centrifugó a 4 000 r.p.m. 10 min y se determinó el contenido de nitrógeno amínico en los sobrenadantes de acuerdo con el método descrito en la USP

XXII¹² basado en una valoración potenciométrica en presencia de formaldehído.

El grado de hidrólisis se definió como el porcentaje de nitrógeno amínico en los hidrolizados con respecto al nitrógeno total de la biomasa y se tomó en consideración la concentración de nitrógeno amínico en la biomasa algal para realizar las correcciones necesarias.

RESULTADOS

Las concentraciones de N-amínico y los grados de hidrólisis alcanzados con las diferentes mezclas enzimáticas evaluadas se muestran en las figuras 1 y 2. Los mejores resultados se obtuvieron con las combinaciones papaína-tripsina y papaína-pancreatina, las que rindieron hidrolizados con niveles de N-amínico y grados de hidrólisis superiores al 4 y 45 %, respectivamente. Con estas mezclas se alcanzaron grados de hidrólisis que superan del 10 al 15 % los obtenidos con los preparados enzimáticos de forma aislada.

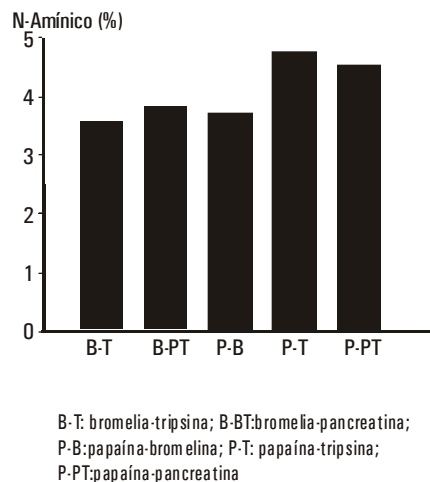


FIG. 1. Contenido de N-amínico (g/100 g, base seca, en los hidrolizados proteicos de *Chlorella vulgaris* con diferentes combinaciones enzimáticas.

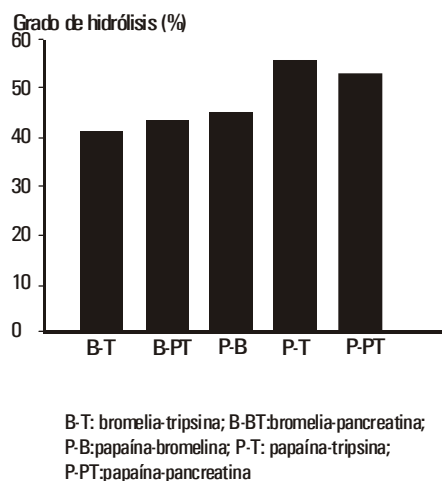


FIG. 2. Grado de hidrólisis (%) en los hidrolizados proteicos de *Chlorella vulgaris* con diferentes combinaciones enzimáticas.

DISCUSIÓN

La obtención de hidrolizados proteicos puede ser concebida como parte de una estrategia integral de aprovechamiento de la biomasa algal. En este sentido, *Morris* y otros⁸ demostraron en un trabajo previo que a excepción de la pepsina, las restantes enzimas proteolíticas evaluadas rindieron hidrolizados con niveles de N-amínico y grados de hidrólisis superiores al 3 y 30 %, respectivamente, adecuados para una rápida solubilización y asimilación por el organismo.

A partir de la década de los 60, comenzaron a aparecer con más frecuencia en la literatura estudios que referían la hidrólisis completa de las proteínas a aminoácidos, utilizando mezclas de enzimas. Por ejemplo, *Matsumura* y otros lograron este objetivo incubando el sustrato con proteasas y aminopeptidasas de origen microbiano, específicamente de *Bacillus subtilis* y *Streptomyces sp* (Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Obtención de hidrolizados proteicos. Situación

actual y perspectivas de desarrollo. La Habana, 1990). Estos antecedentes motivaron nuestro interés en estudiar el efecto de la combinación de enzimas en la hidrólisis de las proteínas celulares de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Desde una perspectiva clínica, las nuevas tecnologías de obtención de hidrolizados proteicos a partir de fuentes no convencionales de proteínas podrían aportar soluciones a muchos aspectos de la terapéutica nutricional. Estos biopreparados se incluyen dentro de los alimentos para regímenes especiales, que se definen como aquellos soportes nutricionales preparados específicamente para satisfacer necesidades particulares de determinados seres humanos por razones físicas, fisiológicas o alteraciones metabólicas.¹³

En este sentido, los niveles de N-amínico y grados de hidrólisis obtenidos con el empleo de las combinaciones enzimáticas evaluadas, especialmente papaína-tripsina y papaína-pancreatina, sugieren su posible utilización en la elaboración de hidrolizados proteicos destinados a situaciones en las que resulte necesario un mayor grado de hidrólisis de la fuente proteica en comparación con las enzimas individuales.

Estas evidencias experimentales pueden ser interpretadas partiendo del hecho de que las enzimas proteolíticas no actúan sobre todos los enlaces peptídicos, sino solo sobre aquellos de los que forman parte ciertos aminoácidos. Por esta razón, se obtienen hidrólisis más completas empleando mezclas de enzimas al lograr la superposición de sus acciones hidrolíticas.

En Cuba, estas investigaciones tienen un carácter novedoso, por lo que se debe continuar profundizando en el estudio de las posibilidades de hidrólisis enzimática de las proteínas celulares de *Chlorella vulgaris* para sustentar sus aplicaciones potenciales como alimentos fisiológicamente funcionales en el campo de la nutrición farmacológica.

SUMMARY

The microalgae represent today an attractive option for the development of new nutritional supplements and food for special diets by the bioconversion of solar energy in virtue of the high content of proteins and biologically active substances existing in the cellular biomass. The effect of the utilization of 5 enzymatic combinations in the hydrolysis of the proteins present in the autotrophic biomass of the microalga *Chlorella vulgaris* previously treated with ethanol was investigated. The best results were obtained with the papain-trypsin and papain-pancreatinin mixtures, which yielded hydrolysates with levels of amino nitrogen and degrees of hydrolysis over 4 and 45 %, respectively. These elements show a positive effect of the use of enzymatic mixtures compared with the individual enzymes, which is mediated by the superposition of their hydrolytic actions.

Subject headings: ALGAE; ALGAE GREEN; CHLORELLA; PROTEIN HYDROLYSATES/therapeutic use; PROTEIN HYDROLYSATES/chemistry; FOOD; DIET; PEPTIDE HYDROLASES/therapeutic use; HYDROLYSIS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Montejó JC. Nutrición enteral. Indicaciones y dietas enterales. *Med Intensiva* 1994;18(8):386.
2. Baró L, Guadiz EM, Martínez-Agustín O, Boza JJ, Gil A. Serum amino acid concentrations in growing rats fed protein versus enzymatic protein hydrolysate based diets. *Biol Neonate* 1995;68:55-61.
3. Lee YH. Food-processing approaches to altering allergenic potential of milk-based formula. *J Pediatric* 1992;121(5):47-50.
4. Margalamov AG, Levchencho IV, Anoshina MI, Ishchuk DE. The enzymatic activity of ammonia metabolism in the liver during the parenteral nitrogen feeding of animals with experimental liver failure. *Vrach Delo* 1992;3:46-8.
5. Malikova NA, Marokko IN, Samenkova NF, Gmoshinskii IV, Mazo VK. The effect of cow's milk and its hydrolysates on the metabolism of 17-hidroxycorticosteroids and the functional state of the gastrointestinal tract in guinea pigs. *Vopr Pitani* 1991;4:48-52.
6. Becker EW. *Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Cambridge University, 1994:293.
7. Tchorbanov B, Bozhkova M. Enzymatic hidrolisis of cell proteins in green algae *Chlorella* and *Scenedesmus* after extraction with organic solvents. *Enzyme Microbiol Technol* 1988;10:233-8.
8. Morris HJ, Almarales A, Abdala RT. Influencia del tratamiento de la biomasa y la naturaleza de las enzimas proteolíticas en la hidrólisis de las proteínas celulares de *Chlorella vulgaris*. *Rev Cubana Quím* 1998;10(1-2):59-67.
9. Morris HJ, Quintana MM, Almarales A, Hernández L. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Rev Cubana Aliment Nutr* 1999;13(2):123-8.
10. Anson MI. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 1938;22:79-85.
11. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
12. United States Pharmacopeial Convention. *USP XXII: United States Pharmacopoeia*. 22 ed. Rockville: Mack Printing, 1990:1185.
13. Castañedo R. Alimentos para regímenes especiales. *Rev Cubana Aliment Nutr* 1998;12(2):120-4.

Recibido: 12 de enero del 2001. Aprobado: 23 de febrero del 2001.

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