

OBTENCIÓN DE HARINA A PARTIR DEL CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* Y SU ANÁLISIS PROTEICO

OBTAINING OF FLOUR TO LEAVE OF THE CULTIVATION OF *Chlorella vulgaris* AND THEIR PROTEIN ANALYSIS

Ricardo D. Andrade¹, Ramiro Torres¹, Everaldo J. Montes¹ y Alfredo C. Fernández¹

Recibido para evaluación: Agosto 14 de 2006 - Aceptado para publicación: Noviembre 1 de 2006

RESUMEN

La obtención de proteína a partir organismos unicelulares es una alternativa de fácil accesibilidad, bajo costo y alto rendimiento. En este trabajo se cultivó la microalga *Chlorella vulgaris* a nivel de laboratorio, posteriormente se transformó en harina, a la cual se le determinó la composición bioquímica y las características del perfil de aminoácidos esenciales. El cultivo, de pureza monoespecífica y extensiva, se realizó por lotes utilizando tres concentraciones (1, 3 y 5 ml l⁻¹ de solución) del fertilizante comercial triple 15. La mayor velocidad de crecimiento se dio a una concentración de 1 ml de fertilizante l⁻¹ de solución, (Pr < 0.05). Las mediciones de concentración de proteína bruta revelaron valores relativamente altos, 56,25% (p/p), con un buen nivel de aminoácidos esenciales, sin limitantes para adultos comparados con el patrón WHO/FAO/UNU y teniendo solo como primer limitante los aminoácidos sulfurados (metionina y cisteína), mostrando una deficiencia del 6% para preescolares, la cual no es crítica.

Palabras clave: Proteína microalgal, escore químico, aminoácidos esenciales.

ABSTRACT

Protein from unicellular organisms is a low cost and high yield alternative. *Chlorella vulgaris* was cultivated and processed, and its biochemical composition, characteristics and amino acids content determined. A pure sample was cultivated in the presence of three commercial fertilizer concentrations (1, 3 and 5 ml l⁻¹) solution. Growth rate was higher at 1 ml l⁻¹ fertilizer concentration. Protein content was 56,25% (w/w), with fair levels of amino acids according to WHO/FAO/UNU, but absence of methionine and cistein and 6% deficiency for pre-school level.

Key words: Microalgal protein, chemical score, essential amino acids.

¹Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería de Alimentos, Km 12 vía Cereté - Ciénaga de Oro. Tel (4) 894 0508, Fax (4) 786 0255, Email: randrade@sinu.unicordoba.edu.co

INTRODUCCIÓN

La obtención de proteína a partir de productos alimenticios de fácil accesibilidad, bajo costo y alto rendimiento ha llevado a plantear investigaciones en la búsqueda de este importante alimento a partir de organismos unicelulares (De la Torre, 1985). En los últimos años, un creciente interés en el estudio de microorganismos como microalgas, algunos hongos y bacterias han sido de gran importancia debido a la posibilidad de aplicación comercial en distintas áreas como la nutrición, la salud humana y animal, el tratamiento de aguas residuales y la obtención de compuestos de interés en las industrias alimentarias, químicas y farmacéuticas (Bruno, 2001; Grobbelaar, 2004; Richmond, 2004).

Las microalgas se caracterizan por habitar todos los cuerpos de agua donde existan las condiciones más simples para crecer (Abalde *et al.*, 1995); su consumo se da desde tiempos inmemoriales, aunque las investigaciones sobre la utilización de éstas en la alimentación es un tema relativamente reciente (García *et al.*, 1993). La obtención de proteína a partir del cultivo de microalga data de los años 60, cuando los Alemanes en la ciudad de Dortmund, con el afán de contribuir a solucionar problemas alimenticios, estudiaron las posibilidades protéicas de estos microorganismos (Uribe, 1995). En Latinoamérica se comenzó la producción semi-industrial de microalgas en Sausal (Perú) en 1978, después de los buenos resultados de estudios realizados sobre la posibilidad de la producción masiva de la microalga *Scenedesmus acutus* var *alternans* (Castillo, 1978). En 1975, en la Universidad de Colima, México, se estudió el valor nutritivo de la alga *Spirulina gertleir*, para dietas en pollos de engorde, Mule (1988) determinó el contenido proteico de las

cianofitas en aguas residuales, con miras al aprovechamiento proteínico para la alimentación. Actualmente varias especies de microalgas son cultivadas comercialmente en algunos países y la biomasa producida ha sido utilizada en la industria de alimentos. El mercado de alimentos funcionales, utilizando microalgas en panes, yogurt y bebidas, presenta rápido desarrollo en países como Francia, Estados Unidos, China y Tailandia (Pulz y Gross, 2004).

El valor biológico de una proteína depende fundamentalmente de su composición en aminoácidos esenciales. Conocida ésta es posible predecir, dentro de ciertas limitaciones, su comportamiento en el organismo; para ello sólo es necesario contar con un adecuado patrón de comparación. El primer patrón utilizado fue la proteína del huevo. Su uso ha sido muy criticado ya que su composición en aminoácidos no es constante y el contenido de algunos aminoácidos es excesivo. Posteriormente, varios Comités de Expertos de la FAO han propuesto distintos patrones en los años 1956, 1965, 1970, 1973. La última propuesta de este organismo es la realizada en 1985, que se basó en los trabajos experimentales de corta y larga duración que evaluaron la cantidad de nitrógeno necesario para producir un balance de nitrógeno en equilibrio (Suárez *et al.*, 2006). Las principales microalgas cultivadas comercialmente son las especies *Chlorella Beyerinck* (Chlorophyceae) y *Arthrospira Stizenberger* (Cyanophyceae) para la formulación en alimentos naturales y *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyceae) para la obtención de betacarotenos (Richmond, 2004). En países como México, Estados Unidos y Japón, la *Spirulina máxima* se utiliza en la alimentación humana para suplir la deficiencia de proteína, y debido a su contenido de ácido gammalinoleico es muy

importante en la alimentación de hipertensos y pacientes con tensiones premenstruales (Roughan, 1998). Esta es obtenida con sistemas de producción, cosecha y secado muy tecnificados y costosos (Pedraza, 1989). Recientemente algunos cultivos han sido desarrollados en equipos especializados, denominados fotobiorreactores, donde se alcanzan elevadas productividades. Los cultivos son realizados en sistema construidos con tubos de plástico, vidrio o policarbonato, donde es posible controlar las condiciones de cultivo (cantidad de nutrientes, temperatura, iluminación y pH); viabilizando una producción comercial de productos con un mayor valor agregado (Richmond, 2004). Entre las microalgas de mayor importancia se encuentra *Chlorella* por su valor económico y nutricional, tanto a nivel animal como humano.

Chlorella vulgaris ha sido utilizada por su calidad proteica (Morris *et al.*, 1999) e incluso presenta propiedades antitumorales (Noda *et al.*, 1996). Actualmente, representa un sistema biológico ideal para diferentes líneas de investigación y además presenta una alta eficiencia por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio (Huss *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 2004). Morris *et al.* (1999), realizaron estudios sobre la composición bioquímica y las características del perfil aminoacídico de la microalga *Chlorella vulgaris*, cultivada en régimen autotrófico y evaluaron la calidad de su proteína mediante métodos químicos. En este estudio se cultivó la microalga *Chlorella vulgaris* a nivel de laboratorio, con el objetivo de evaluar la concentración del fertilizante Triple 15 y el tiempo adecuado para su óptima producción. Además, a su harina se le determinó su calidad proteica mediante el escore químico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microalga

Se utilizó una cepa de *Chlorella vulgaris* proveniente del Centro de Investigaciones Piscícola de la Universidad de Córdoba, Colombia.

Inoculo y nutrientes

Se adicionó 1ml de inoculo a un erlenmeyer que contenía 3 l de agua destilada y la cantidad a evaluar del fertilizante triple 15 (NUTRIMON 15-15-15®) al 10% (p/v). Los cultivos inoculados en los erlenmeyers se mantuvieron durante 20 días iluminados artificialmente con una iluminancia de 2000 luxes y corriente continua de aire de 0,4 m³ h⁻¹. Cada dos días se tomaron muestras, por triplicado, de 5 ml para determinar la concentración de biomasa del cultivo (ig ml⁻¹) midiendo la absorbancia a 585 nm en un espectrofotómetro Merck SQ 118.

Elaboración, análisis y evaluación de la calidad de la harina

A los 20 días, el cultivo se centrifugó y la pasta húmeda se transfirió a un mortero de porcelana, colocándose en una estufa a 40°C durante 18 horas, luego la pasta seca se maceró hasta obtener la harina. Las variables que se determinaron fueron proteína bruta (micro-kjeldahl, empleando 6,25 como factor de conversión para la estimación del contenido proteico), humedad, fibra cruda, lípidos y cenizas, según metodología recomendada por la Association Of Official Analytical Chemists (Kirk *et al.*, 1996), y los aminoácidos esenciales se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un cromatógrafo líquido marca Shimadzu®, integrado por dos bombas LC-6A, una columna Alltex Ultrasphere ODS de 12,5 cm y partículas de silica de 5 mm de diámetro, y un detector de fluorescencia FLC-6A. El flujo fue constante

a 1 mL min⁻¹. Para la preparación de los solventes, así como el gradiente se utilizó el método propuesto por Umagat y Kucera (1982) modificado por Torres *et al.* (1994). La identificación y cuantificación de los aminoácidos se realizó por comparación con los tiempos de retención del estándar AA 18 Sigma®. El escore químico se determinó teniendo en cuenta como proteína de referencia el patrón de aminoácidos para preescolares y adultos (WHO/FAO/UNU, 1985).

Diseño experimental y análisis estadístico de los resultados

Se utilizó un diseño completamente al azar, con el factor concentración de fertilizante triple 15 en tres niveles (1, 3 y 5 ml de fertilizante en un litro de agua destilada), evaluando la densidad del cultivo a través del tiempo. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Para determinar las mejores condiciones de crecimiento de los cultivos estudiados, se realizó un análisis de varianza (ANAVA) ($\alpha=0.05$). Posteriormente,

se realizó la prueba de Tukey para seleccionar el mejor tratamiento, utilizando el programa STATISTICA 5.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presenta la densidad óptica y el rendimiento de harina alcanzado, respectivamente, para los tres cultivos de *Chlorella vulgaris*, con diferentes concentraciones de fertilizante. El análisis de varianza para las variables densidad óptica y rendimiento de harina alcanzado, indican que existen diferencias significativas ($Pr < 0.0001$) entre las medias de los tratamientos. La Prueba de Tukey, determinó que la mayor producción de biomasa se dio en el cultivo con una concentración de 1 ml de fertilizante por litro de agua destilada, a los 20 días (figura 1). Este tiempo concuerda con los datos reportados por Uribe (1995). El rendimiento alcanzado de la harina producida fue en promedio de 444 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cultivo.

Tabla 1. Densidad óptica, en absorbancia y rendimiento de harina (μg de harina ml^{-1} de cultivo) promedio, para cultivos de *Chlorella vulgaris*.

Tiempo (días)	Densidad óptica ml de Triple 15L ⁻¹ de solución			Rendimiento de harina mL de Triple 15L ⁻¹ de solución		
	1mL	3mL	5mL	1mL	3mL	5mL
0	0,098	0,170	0,244	23,4	40,6	57,4
2	0,202	0,280	0,326	48,2	66,8	78,3
4	0,363	0,446	0,422	86,7	106,4	99,9
6	0,640	0,485	0,572	152,8	115,8	137,3
8	0,878	0,672	0,689	209,6	160,4	164,7
10	1,191	0,875	0,746	284,3	209,0	177,6
12	1,449	1,213	0,821	346,0	289,6	196,4
14	1,620	1,242	0,948	386,7	296,5	225,6
16	1,721	1,326	1,084	410,8	316,5	258,9
18	1,804	1,376	1,162	430,7	328,5	277,8
20	1,860	1,448	1,220	444,0	345,7	290,8

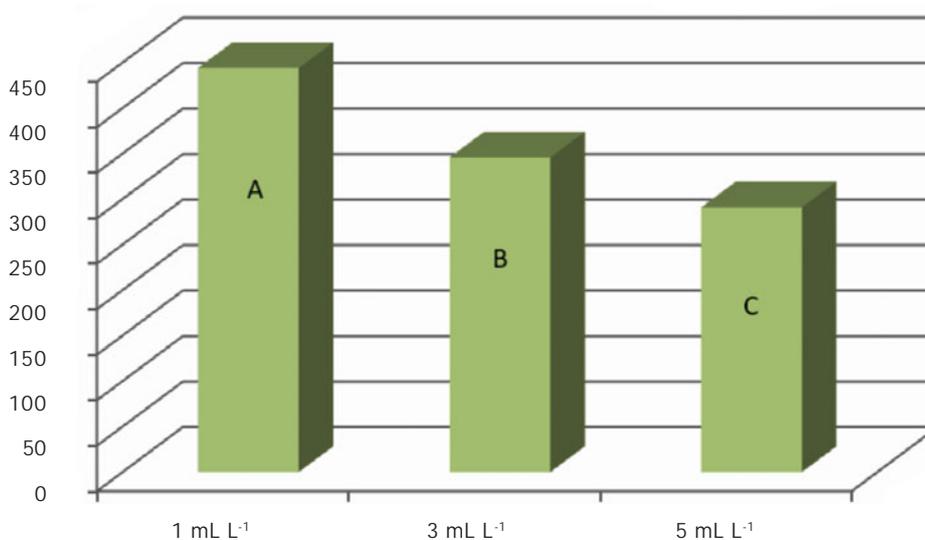


Figura 1. Rendimiento de harina (μg de harina ml^{-1} de cultivo) a los 20 días, para cultivos de *Chlorella vulgaris*

La tabla 2 muestra que la harina de *Chlorella vulgaris*, cultivada en presencia del fertilizante, presenta un mayor nivel de proteína bruta (56,25% p/p) que la cultivada sin el fertilizante (44,56% p/p) reportada por Morris *et al.* (1999). El 9,8% (p/p) de cenizas, que representaron una fracción considerable del peso seco, es comparable con los valores informados para otras especies dulceacuícolas y está por debajo de los reportados para la *Spirulina maxima* (Shubert *et al.*, 1995).

Como se observa en las tablas 3 y 4, el nivel aminoacídico de la *Chlorella vulgaris* al compararse con el patrón de referencia de WHO/FAO/UNU (1985) para preescolares, indica que su proteína tiene como primer limitante a los aminoácidos sulfurados (AAS) con 94,0%, es decir, la proteína de *Chlorella vulgaris* tiene un déficit de AAS del 6,0% que, como se aprecia, no es muy crítico. Sin embargo, comparados con el patrón de referencia de WHO/FAO/UNU (1985) para adultos no presenta ningún limitante, lo que la convierte en una proteína de alta calidad (tabla 5). Igualmente, la harina de *Chlorella*

Tabla 2. Composición bioquímica (% p/p) de la harina de *Chlorella vulgaris*, comparada con la reportada por Morris *et al.* (1999).

Componente	<i>Chlorella vulgaris</i>	Morris <i>et al.</i> (1999)
Proteína Bruta	56,25	44,56
Humedad	7,05	7,18
Grasas	5,25	0,29
Cenizas	9,80	8,90
Carbohidratos	17,10	16,00
Fibra cruda	4,60	8,20

Tabla 3. Contenido de aminoácidos de *Chlorella vulgaris*, comparado con diversas proteínas y el patrón WHO/FAO/UNU (1985).

Aminoácidos esenciales (g 100g ⁻¹ de Proteína)	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Scenedesmus Sp</i> ¹	Maíz ²	Leche de vaca ²	Huevo de gallina ¹	Patrón WHO/FAO/UNU (1985)	
						preescolares	adultos
Isoleucina	4,82	3,80	3,68	4,72	6,29	2,8	1,3
Leucina	10,78	8,40	12,53	9,54	8,84	6,6	1,9
Lisina	7,70	5,70	2,67	7,79	6,98	5,8	1,6
Total de aminoácidos sulfurados	2,35	2,30	3,47	3,33	5,79	2,5	1,7
Total de aminoácidos aromáticos	9,04	5,10	8,70	10,13	8,99	7,4	2,4
Treonina	5,60	5,10	3,60	4,45	5,12	3,4	0,9
Triptófano	1,12	1,50	0,70	1,41	1,49	1,1	0,5
Valina	n.r	5,70	4,85	5,79	6,85	3,5	1,3

¹Morris *et al.* (1999); ²Fennema (2000); n.r = no reportado.

Tabla 4. Escore químico de proteínas de diferentes productos alimenticios para preescolares tomando el patrón WHO/FAO/UNU (1985)¹.

Aminoácidos esenciales	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Scenedesmus Sp</i> ¹	Maíz	Leche de vaca	Huevo de gallina
Isoleucina	172,14	135,71	131,43	168,57	224,64
Leucina	163,33	127,27	189,85	144,55	133,94
Lisina	132,76	98,28***	46,03*	134,31	120,34
Total de aminoácidos sulfurados	94,00*	92,00**	138,80	133,20	231,60
Total de aminoácidos aromáticos	122,16	68,92*	117,57	136,89	121,49
Treonina	164,71	150,00	105,88	130,88	150,59
Triptófano	101,82	136,36	63,64**	128,18	135,45
Valina	n.r	162,86	138,57	165,43	195,71

¹Cálculos realizados por autores con base en datos reportados en tabla 5.
n.r = no reportado; *Primer limitante; **Segundo limitante; ***Tercer limitante

Tabla 5. Escore químico de proteínas de diferentes productos alimenticios para adultos tomando el patrón WHO/FAO/UNU (1985)¹.

Aminoácidos esenciales	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Scenedesmus Sp</i> ¹	Maíz	Leche de vaca	Huevo de gallina
Isoleucina	370,77	292,31	283,08	363,08	483,85
Leucina	567,37	442,11	659,47	502,11	465,26
Lisina	481,25	356,25	166,88	486,88	436,25
Total de aminoácidos sulfurados	138,24	135,29	204,12	195,88	340,59
Total de aminoácidos aromáticos	376,67	212,50	362,50	422,08	374,58
Treonina	622,22	566,67	400,00	494,44	568,89
Triptófano	224,00	300,00	140,00	282,00	298,00
Valina	n.r	438,46	373,08	445,38	526,92

¹Cálculos realizados por autores con base en datos reportados en tabla 5; n.r = no reportado

vulgaris presenta mejor perfil de aminoácidos esenciales (AAE) que la proteína de maíz, la cual tiene como primer limitante a L-Lisina (46,03%), y como segundo limitante L-Triptófano (63,64%), con déficit relativos de 53,97% y 36,36% respectivamente, que son muy críticos (Tabla 4). Los niveles de L-Lisina en la microalga investigada fueron similares a los del huevo completo y leche; este es el aminoácido esencial limitante en muchos cereales, como en la proteína del maíz que lo tiene como primer limitante (Badui, 1999).

CONCLUSIONES

- La mejores condiciones para el crecimiento de biomasa de la *Chlorella vulgaris*, se presentaron para una concentración de 1 ml de Triple 15 en la solución al 10% (p/v) de fertilizante en agua destilada, a los 20 días de cultivo, con un rendimiento de 444 μg de harina ml^{-1} de cultivo.
- La harina producida a partir de *Chlorella vulgaris*, cultivada con Triple 15 presenta un mayor nivel de proteína bruta que la cultivada sin nutrientes; es una buena alternativa como complemento alimenticio en la elaboración de concentrados para animales; y puede ser utilizada como suplemento en la dieta humana, debido a su alto contenido de proteína y buen perfil de aminoácidos esenciales.
- La proteína de *Chlorella vulgaris* presentó menos limitantes en aminoácidos esenciales que la proteína del maíz y la microalga *Scenedesmus* sp.
- La proteína de *Chlorella vulgaris* muestra como primer limitante a los aminoácidos sulfurados (94,00% p/p) con relación al patrón de aminoácidos esenciales, WHO/FAO/UNU (1985) para preescolares.

BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J.; Cid, A.; Hidalgo, P.; Torres, E. y Herrero, C. 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. Universidade da Coruña, La Coruña, p210
- Badui, S. 1999. Química de los alimentos, Pearson Educación, México, p138
- Bruno, J. 2001. Edible microalgae: a review of the health research. Center for Nutritional Psychology Press, Pacifica 3:56
- Castillo, J. 1978. Proyecto Peruano-Alemán. Microalgas para consumo humano. Informe Técnico: Estación Planta Piloto Sausal. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú, p53
- De La Torre, M. 1985. Aprovechamiento de esquilmos agrícolas y desechos agroindustriales: Prospectiva de la biotecnología en México. Fundación Barrio Sierra, A.C. México p222-234
- Fennema, O. 2000. Química de los alimentos, Acibia S.A, Zaragoza, p472
- García, M.; Quintero, R. y López-Munguía, M. 1993. Biotecnología Alimentaria, Limusa, México, p383-396
- Grobbelaar, J. 2004. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. South African Journal of Botany 70(1):140-144

- Huss, V.; Frank, C.; Hartmann, E.; Hirmer, M.; Kloboucek, A.; Seidel, B.; Wenzeler, P. y Kessler, E. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 35(3):587-598
- Kirk, R.; Sawyer, R. y Egan, H. 1996. Composición y análisis de alimentos de Pearson. CECSA, México, p10-27
- Morris, H.; Quintana, M.; Almarales, A. y Hernández, L. 1999. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y nutrición* 13(2):123-128
- Mule, M. 1988. Contenido proteico de cianofitas de aguas residuales. Universidad de Colima, México, p21-23
- Noda, K.; Ohno, N.; Tanaka, K. y Shoyama, Y. 1996. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Médica* 62(5):423-426
- Ortega, J.; Moronta, R. y Morales, E. 2004. Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp. *CIENCIA* 12(1):25-31
- Pedraza, G. 1989. Cultivo de *Spirulina* máxima para suplementación proteica. *Livestock Research for Rural Development* 1(1):2
- Pulz, O. y Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(6):635-648
- Richmond, A. 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science. Oxford, p566
- Roughan, P. 1989. *Spirulina*: a source of dietary Gamma Linoleic Acid. *Journal Science Food and Agricultura* 47(1):85-93
- Shubert, L.; Larsen, B. and Johnson, P. 1985. Nutritional values of *Spirulina* and *Chlorella* for human consumption. En: Annual Meeting of the Phycological Society of America, San Diego
- Suárez, M.; Kizlansky, A. y López, L. 2006. Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el score de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición Hospitalaria* 21:48-49
- Torres, G.; Gómez O. y Márquez E. 1994. Análisis de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución usando un gradiente binario y un sistema temario de solventes. *Acta Científica Venezolana* 45(1):313
- Umagat, H. y Lucera, P. 1982. Total aminoacid analysis using precolumn fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography* 239:463-74
- Uribe, E. 1995. Cultivo de Microalgas. Memoria: Curso Interamericano de Biología Marina. Universidad Católica del Norte - Organización de Estados Americanos, Santiago de Chile, p15-17
- WHO/FAO/UNU. 1985. Report: energy and protein requirements. WHO Technical Report Series N° 724. Ginebra, p220