

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial
Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.

ENFOQUE INTEGRAL EN LA UTILIZACIÓN DE LOS MÉTODOS QUÍMICOS DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD PROTEICA

Humberto Joaquín Morris Quevedo,¹ Olimpia Carrillo Farnés² y Rosa Catalina Bermúdez Savón³

RESUMEN: Se plantea la utilización con un enfoque integral de una batería de métodos químicos de evaluación de la calidad proteica: digestibilidad *in vitro*, determinación del contenido de lisina disponible, índice modificado de aminoácidos esenciales, cómputo proteico de la FAO/OMS, valor suplementario y el cómputo de aminoácidos corregido en función de la digestibilidad (PDCAAS), como alternativa de los ensayos con animales de experimentación. Se ilustra con un estudio nutricional llevado a cabo con microalgas *Chlorella vulgaris* 87-1, aunque su campo de aplicación puede extenderse a otras fuentes de proteínas. La biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris* presentó una calidad proteica satisfactoria con una digestibilidad *in vitro* y valor suplementario de 75,9 y 15%, respectivamente. Los aminoácidos sulfurados constituyeron el primer limitante con un cómputo corregido de 0,64. Se demuestra el valor de los métodos químicos, empleados con un enfoque integral, como complemento de los métodos biológicos de evaluación de la calidad proteica.

DeCS: PROTEINAS; CALIDAD; ALGAS; CHLORELLA/química.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas ocupan un lugar primordial entre los principios alimentarios, a causa, fundamentalmente, del hecho de que puede prescindirse de ellas en menor grado que del resto de los alimentos.¹

Los ecosistemas acuáticos con las tecnologías disponibles en la actualidad ofrecen los más variados e importantes recursos de alimentos y productos biológicamente activos. En el medio acuático existe una gran diversidad de microalgas, y esta particularidad nos permite acceder a un aprovechamiento tecnológico potencial para su utilización como fuente de proteínas, vitaminas, minerales y sustancias con efectos bioestimulantes.²

El método más comúnmente utilizado en las evaluaciones de la calidad nutricional de las proteínas, en general, y de las de origen microalgal, en particular, ha sido la razón de eficiencia proteica (REP), el cual está basado en experimentos de alimentación a corto plazo (de tres a cuatro semanas) de ratas recién destetadas. La respuesta a las dietas se expresa en términos de peso ganado por unidad de proteína consumida. El valor de REP obtenido se compara con el de una proteína de referencia, como la caseína, que en la práctica se asume posee un valor de 2,50.³

Aunque la estimación del REP ha sido el método más aplicado para evaluar la calidad de las proteínas, tiene ciertas limitaciones. La principal fuente de errores consiste en

¹ Licenciado en Bioquímica, Máster en Bioquímica de la Nutrición Investigador Agregado, Asistente Adjunto del Departamento de Farmacia.

² Doctora en Ciencias Biológicas Profesora Titular de Bioquímica de la Nutrición. Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología. Universidad de La Habana.

³ Doctora en Ciencias Químicas, Profesora Titular. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente.

utilizar la ganancia de peso como el único criterio *per se* de valor proteico.³ Por estas razones, se ha recomendado la utilización de otros métodos más específicos para evaluar la calidad de la proteína microalgal, como la utilización de proteína neta (UPN) y el valor biológico (VB).⁴

En adición a los métodos biológicos, los datos analíticos sobre la composición aminoacídica de la proteína y su digestibilidad *in vitro* permiten llegar a ciertas conclusiones para determinar su valor nutricional. Entre los métodos utilizados más frecuentemente se destacan las distintas expresiones para el cómputo químico y simulaciones *in vitro* de la digestibilidad *in vivo*,⁵ el índice de aminoácidos esenciales⁶ modificado posteriormente por Mitchell,⁷ así como la determinación de la lisina disponible.⁸

Aunque estos métodos proporcionan una valiosa información sobre el valor nutritivo de las proteínas, su aplicación en evaluaciones de microalgas ha sido muy limitada, como lo demuestra la revisión de la literatura del tema.

Por su parte, la Food and Drug Administration (FDA) manifestó en 1993 la necesidad de disponer de métodos perfeccionados para la evaluación de la calidad proteica de los alimentos, y recomienda la sustitución del REP y la introducción con fines regulatorios del cómputo de aminoácidos corregidos en función de la digestibilidad proteica (PDCAAS), para la evaluación nutricional de los productos destinados al consumo humano.⁹

En el presente trabajo se plantea como novedad la utilización, con un enfoque integral, de una batería de métodos químicos de evaluación de la calidad proteica en estudios nutricionales con microalgas, y la aplicación del cómputo de aminoácidos corregido en función de la digestibilidad por vez primera en investigaciones de esta naturaleza.

MÉTODOS

Obtención y tratamiento de la biomasa. Se utilizó la cepa de *Chlorella vulgaris* 87-1 depositada en la Colección de Microalgas del Centro de Investigaciones de Energía Solar (CIES). El cultivo se desarrolló a cielo abierto, en régimen autotrófico, en una instalación tipo película descendente de 500 m². La suspensión celular en la fase exponencial del crecimiento se concentró en una centrifuga de flujo continuo Alfa Laval. La crema resultante fue sometida a un proceso de secado por aspersión en un secador (Niro Atomyzer), y el polvo verde oscuro fue conservado en recipientes plásticos hasta su utilización. El contenido proteico de la biomasa resultó de 44,6 y 32,2 % en términos de proteína bruta y verdadera, respectivamente. Los datos de la composición aminoacídica fueron tomados de una publicación previa de Morris y otros.¹⁰

MÉTODOS QUÍMICOS DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD PROTEICA DE *CHLORELLA VULGARIS*

Digestibilidad *in vitro* de la proteína microalgal. La digestibilidad se evaluó mediante la simulación *in vitro* con el 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 Previamente, se procedió a la disrupción celular de la biomasa en un molino de bolas (Dynomill KDL) con un tiempo de retención de 3 minutos.

Determinación del contenido de lisina disponible. Los niveles de lisina disponible en la biomasa de *Chlorella vulgaris* se determinaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Carpenter.⁸

Índice modificado de aminoácidos esenciales. El índice modificado de aminoácidos esenciales (MEAA) se calculó mediante el procedimiento propuesto por Oser⁶ según las modificaciones realizadas por Mitchell.⁷

Cómputo proteico de la FAO/OMS.¹² Se expresó la cantidad de cada aminoácido esencial en la proteína algal como su contribución porcentual respecto al total de aminoácidos esenciales. Se calcularon, a continuación, las relaciones entre los porcentajes de cada aminoácido esencial en la proteína evaluada y la proteína del huevo entero, y se refirió la menor de ellas como el cómputo proteico.

Índice integrado de Kuhnau (valor suplementario). Se determinó a partir de la suma de las concentraciones de aminoácidos esenciales, referidas en g/16 g de nitrógeno, de la proteína de *Chlorella vulgaris* y de la leche humana, seleccionada como referencia. La relación entre la suma de la proteína que se debía evaluar respecto a la de referencia, expresada como porcentaje, se denomina "valor total". Se cuantificó, además, el exceso en que se encuentran los aminoácidos esenciales en la proteína algal y se sustrajo de la sumatoria de sus concentraciones previamente calculada, para obtener el denominado "valor puro". El valor suplementario se definió como la diferencia entre el valor total y el valor puro.⁵

Cómputo de aminoácidos corregido en función de la digestibilidad proteica (PDCAAS). Se obtuvo al comparar el perfil de aminoácidos esenciales de la proteína microalgal, corregido en función de su digestibilidad, con los requerimientos de aminoácidos esenciales (mg/g de proteína bruta) establecidos por la FAO/OMS para edades fluctuantes entre 2-5 años. La selección de este patrón de requerimientos se justifica por presentar las mayores exigencias, con excepción de menores de dos años.⁹

RESULTADOS

La digestibilidad *in vitro* de la biomasa de *Chlorella vulgaris* tuvo un valor promedio de 75,9 %, relativamente

inferior al alcanzado por la caseína (93,4 %), y el contenido de lisina disponible fue de 4,45 g/100 g de proteína.

El patrón de aminoácidos evidenció una distribución bien equilibrada, con un índice de aminoácidos esenciales de 82,13 (tabla 1). La determinación del cómputo proteico de la FAO/OMS (tabla 2) demostró que los aminoácidos sulfurados (Met+Cys) constituyen el primer limitante de esta fuente proteica, al aparecer como una fracción que representa el 49,2 % del requerimiento para un patrón balanceado, al tomar como referencia el huevo entero.

Resultados similares fueron obtenidos al calcular el cómputo de aminoácidos corregido en función de la digestibilidad proteica, a partir del perfil de aminoácidos esenciales de la proteína y su digestibilidad, asumiendo como referencia los requerimientos establecidos por la FAO/OMS para el grupo etéreo de 2-5 años de edad, el cual presentó un valor de 0,64.

Por su parte, el valor suplementario calculado para la proteína de *Chlorella vulgaris* según el índice integrado de Kuhnau resultó del 15% (tabla 3).

TABLA 1. Procedimiento de cálculo del índice modificado de aminoácidos esenciales (MEAA) de la proteína de *Chlorella vulgaris*

Aminoácido	<i>C. vulgaris</i> (g/16 g de N)	Huevo entero (g/16 g de N)	Relación <i>C. vulgaris</i> /huevo entero (%)	Relación corregida (%)	Logaritmos
His	2,40	2,60	92	92	1,9638
Lys	7,70	6,70	115	100	2,0000
Met	1,55	3,00	52	52	1,7160
Cys	0,50	2,10	24	24	1,3802
Met+Cys	2,05	5,10	40	40	1,6021
Phe	6,02	5,30	114	100	2,0000
Tyr	3,02	4,30	70	70	1,8451
Phe+Tyr	9,04	9,60	94	94	1,9731
Leu	10,78	9,00	120	100	2,0000
Ile	4,82	5,80	83	83	1,9191
Val	7,86	7,20	109	100	2,0000
Thr	5,60	5,30	106	100	2,0000
Trp	1,10	1,70	65	65	1,8129

Log promedio= 1,9145 antilog (MEAA)= 82,13.

TABLA 2. Determinación del cómputo proteico de la FAO/OMS para la proteína de *Chlorella vulgaris* (los aminoácidos se expresan como tanto por ciento del total de aminoácidos esenciales)

Aminoácidos	<i>C. vulgaris</i>	Huevo entero	Relación <i>C. vulgaris</i> /huevo entero (%)
His	4,63	4,90	94,5
Lys	14,80	14,70	-
Met	2,99	6,00	49,8
Cys	1,93	4,00	48,2
Met+Cys	4,92	10,00	49,2
Phe	11,6	10,40	-
Tyr	5,82	7,20	80,8
Phe+Tyr	17,42	17,60	98,9
Leu	20,80	16,60	-
Ile	9,30	11,10	83,8
Val	15,16	13,40	-
Thr	10,80	9,20	-
Trp	2,12	2,60	81,5

TABLA 3. Determinación del valor suplementario de la proteína de *Chlorella vulgaris*

Aminoácidos	<i>C. vulgaris</i> (g/16 g N)	Leche materna humana (g/16 g N)	Exceso de la proteína prueba respecto a la de referencia
His	2,40	2,2	0,2
Lys	7,70	6,6	1,1
Met	1,55	2,0	-
Cys	1,00	2,0	-
Phe	6,02	4,3	1-72
Tyr	3,02	5,2	-
Leu	10,78	9,1	1,68
Ile	4,82	5,5	-
Val	7,86	6,3	1,56
Thr	5,60	4,5	1,10
Trp	1,10	1,6	-
Valor total	51.85 (105.17%)	49.3 (100%)	7,36

$$\text{Valor puro} = \frac{51,85 - 7,36}{49,3} = 0,90 \text{ (90\%)} \quad \text{Valor suplementario} = 105 - 90 = 15 \%$$

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, la biomasa sometida a un tratamiento de disrupción celular en un molino de bolas presentó una digestibilidad *in vitro* de 75,9 % que cumple con las especificaciones de calidad establecidas por el Ministerio de Salud Pública para las tabletas de Spirulina.¹³

Ha sido demostrada la existencia de una correlación altamente positiva ($r = 0,90$) entre los valores de pH inmediatamente a los 10 min de iniciada la digestión *in vitro*, con el sistema enzimático tripsina-quimotripsina-peptidasa y la digestibilidad aparente *in vivo* en ratas,¹¹ lo cual constituye un elemento de gran valor predictivo en la realización de evaluaciones nutricionales, no referido con anterioridad en las investigaciones efectuadas con microalgas.

Se ha planteado la existencia de una buena correlación entre el valor biológico de los alimentos y los niveles de lisina disponible.⁸ De acuerdo con los resultados obtenidos, el valor biológico de la biomasa de *Chlorella vulgaris* puede ser estimado como satisfactorio en relación con su contenido de lisina disponible (4,45 g/100 g de proteína).

La determinación del índice modificado de aminoácidos esenciales (MEAA) es un método que brinda resultados muy próximos a los de los ensayos biológicos de alimentación. El índice en *Chlorella vulgaris* (82,13), aunque inferior al de la caseína (92,24), no manifestó diferencias notables con respecto al de la microalga marina *Dunaliella tertiolecta* (81,00) y la *Cyanobacteria spirulina* (85,22) y resultó superior al de *Scenedesmus* (70,72).¹⁴

La proporción global de los aminoácidos disponibles es más importante en la determinación de la calidad que simplemente la cantidad absoluta de cada aminoácido esencial. Una proteína balanceada se define como aquella en la cual los aminoácidos esenciales están presentes en proporciones óptimas unos respecto a los otros, para una mayor

eficiencia en la formación de nuevos tejidos y reparación de los ya existentes.¹⁵ El cómputo proteico de la FAO/OMS asume este criterio como punto de partida para la evaluación de la calidad de una proteína. La aplicación de este procedimiento a la biomasa de *Chlorella vulgaris* demostró que los aminoácidos sulfurados (Met+Cys) constituyen el primer limitante de esta fuente proteica, al aparecer como una fracción que representa el 49,2 % del requerimiento para un patrón balanceado, en este caso el huevo entero.

El valor suplementario de la proteína de *Chlorella vulgaris* resultó del 15 %, lo cual sugiere el establecimiento de complementaciones con proteínas que puedan ser deficitarias en aquellos aminoácidos que aparecen en exceso en la proteína microalgal y que, a la vez, sean capaces de compensar su déficit de aminoácidos sulfurados.

La razón de eficiencia proteica (REP) ha sido reconocida tradicionalmente como el método preferencial de evaluación de la calidad proteica; sin embargo, sobrestima el valor de ciertas proteínas animales y subvalora las de origen vegetal. En este sentido, la FDA¹⁶ recomendó la sustitución del REP y la utilización, 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. El PDCAAS de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris* tuvo un valor de 0,64, superior al de las lentejas, la harina de maní, el trigo entero, el gluten de trigo y la avena, entre otros alimentos.⁹ Es oportuno señalar que hasta el presente, la mayor parte de las evaluaciones de la calidad proteica de las microalgas han empleado el REP en experimentos de alimentación a corto plazo en ratas recién destetadas, por lo que la aplicación del PDCAAS en este campo tiene un carácter novedoso.¹⁰

En el presente trabajo ha sido demostrado, además, el valor de los métodos químicos de evaluación de la calidad proteica que, si bien tienen un carácter clásico, utilizados racionalmente y con un enfoque integral, resultan extremadamente informativos en cuanto a los elementos que aportan sobre las cualidades nutricionales de un nuevo producto con aplicaciones potenciales en la nutrición y la farmacología. Las evidencias acumuladas realzan el significado de estos métodos, particularmente del PDCAAS, y podrían conducirnos a evaluar nuevamente su alcance general como complemento y/o alternativa de los métodos biológicos de evaluación con animales de experimentación. Si bien el ejemplo abordado en el trabajo corresponde a estudios con microalgas, su campo de aplicación puede extenderse a otras fuentes de proteínas.

En comparación con los métodos biológicos tradicionalmente empleados, la utilización de una batería de méto-

dos químicos introduce una serie de ventajas, entre las que se destacan:

- Científicas: Ofrecen información valiosa acerca del valor nutricional de las proteínas y permiten explicar la integralidad de los fenómenos observados en el organismo animal, se controlan mejor los distintos parámetros y variables y son convenientes para respondernos preguntas específicas.
- Económicas: Ahorro por concepto de animales, alimentos, mantenimiento y personal encargado de la actividad, son relativamente simples y más flexibles, se desarrollan más rápidamente y son susceptibles de ser automatizados.
- Éticas: No implican el uso de animales de laboratorio (por ende, no se les inflige dolor, sufrimiento, angustia, etc.). En este sentido, el uso de alternativas, siempre que sea apropiado, se destaca dentro de los principios éticos internacionales para investigaciones biomédicas con animales de laboratorio.

Summary: It is stated to use under a comprehensive approach a battery of chemical methods for the evaluation of protein quality: digestibility in vitro, determination of the content of available lysin, modified index of essential aminoacids, FAO/WHO's protein calculation, supplementary value and the calculation of aminoacids corrected according to digestibility (PDCAAS), as an alternative to the tests with experimental animals. It is illustrated with a nutritional study conducted with microalgae *Chlorella vulgaris* 87-1, although it may be also applied to other protein sources. The autotrophic biomass of *Chlorella vulgaris* presented a satisfactory protein quality with a digestibility in vitro and supplementary value of 75.9 and 15 %, respectively. The sulfurated aminoacids were the first limitation with a corrected computation of 0.64. It is proved the value of the chemical methods used with a comprehensive approach as a complement of the biological methods to evaluate the protein quality.

Subject headings: **PROTEINS; QUALITY; ALGAE; CHLORELLA/chemistry.**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Otero MA. Proteína unicelular para consumo humano. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1985:p. 87-97.
- 2 Herrero C, Cabezas B, Abalde J, Fábregas J. Avances en tecnología de microalgas para nutrición animal. Santiago de Compostela: Servicio de Publicaciones; 1985:p.100.
- 3 Allison JB. Biological evaluation of protein. *Physiol Rev* 1995;35:664-700.
- 4 Becker EW. *Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: University Press; 1994:p.293.
- 5 Sheffner AL. In vitro protein evaluation. En: Albanese AA, ed. *Newer methods of nutritional biochemistry III*. New York: Academic Press; 1967: p.125-95.
- 6 Oser BL. Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein. *J Am Diet Assoc* 1951; 27:p.396-402.
- 7 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:p.13-28.
- 8 Carpenter KJ. The estimation of the available lysine in animal-protein foods. *Biochem J* 1960;77:604-10.
- 9 Henley EC, Kuster JM. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. *Food Technol* 1994; 48(4):74-7.
- 10 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.
- 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 Food and Agriculture Organization of the United Nations Protein Requirements. Report of a joint FAO/WHO expert group. Rome: FAO;1965: (Tech Rept Ser;no. 301).
- 13 Bermúdez E, Nuñez R, Serrano A. *Spirulina* tabletas. Especificaciones de calidad. La Habana: Laboratorio Técnico de Medicamentos, Departamento de Estabilidad; 1991. (Técnica nr. 5-10-91A).
- 14 Herrero C, Vecino E, Abalde J. The marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher): nutritional properties and hypocholesterolemic effects. En: Villa TG, Abalde J, eds. *Profiles on Biotechnology*. La Coruña: Servicio de Publicaciones; 1992:271-88.
- 15 Reeds PJ, Beckett PR. Proteínas y aminoácidos. En: Ziegler EE, Filer LJ Jr, eds. *Conocimientos actuales sobre nutrición 7*. ed. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud; 1997:73-94.

16 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: 10 de diciembre de 2002. Aprobado: 17 de diciembre de 2002. Prof. Humberto Joaquín Morris Quevedo. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. Apartado postal 4011, CP 90 400. E-mail: hmorris@cebi.uo.edu.cu