

Efecto de la extracción de lípidos sobre la estructura y solubilidad de proteína aislada de *Spirulina platensis*

A.R. Fonseca-Toussaint¹, J.C. Metri-Ojeda², M.M. Ramírez-Rodríguez² y D.K. Baigts-Allénde²

1 Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad De Las Américas Puebla **2** Departamento de Ingeniería Química y de Alimentos, Universidad De Las Américas Puebla. diana.baigts@udlap.mx

RESUMEN: Las microalgas son consideradas una fuente alternativa de proteínas que pueden ser cultivadas de manera sustentable. El objetivo de este trabajo fue caracterizar parcialmente el efecto del procesamiento en la estructura de proteína aislada a partir de *Spirulina platensis*. La proteína fue aislada mediante extracción alcalina asistida con ultrasonidos y precipitación ácida, a partir de material liofilizado sin desgrasar (control) y desgrasado por los métodos diferentes (Bligh & Dyer y Soxhlet). La microalga fresca presentó un contenido promedio de humedad, proteína, grasa y cenizas de 70.72, 16.31, 1.80 y 2.33 % respectivamente. El rendimiento promedio de aislado proteico fue ~50 % (p/v) para todas las metodologías. La solubilidad de los aislados aumentó a pH alcalinos, sin embargo, a valores neutros-alcalinos las muestras desgrasadas por el método por Bligh & Dyer mostraron una mejor solubilidad en comparación a la muestra control y Soxhlet. Similares diferencias en los espectros estructurales por FTIR fueron observados en cuanto a la intensidad de las bandas, probablemente debido a que una proteína más pura que la muestra control y mejor estructurada que Soxhlet (polaridad del solvente) y ausencia de calentamiento por largos periodos de tiempo.

Palabras clave: microalgas, proteínas, solubilidad.

ABSTRACT: Microalgae are considered as an alternative and sustainable protein source. The objective of this work was to partially characterize the effect of processing on *Spirulina platensis* protein isolate. The protein was isolate using ultrasound assisted alkali extraction and acid precipitation, from undefatted freeze-dried raw material (control) and defatted microalgae by two methods (Bligh & Dyer and Soxhlet). Fresh microalgae presented a moisture, protein, fat and ashes average content of 70.72, 16.31, 1.80 y 2.33 % respectively. The average yield of protein isolate was around 50 % (w/v) for all methods. The solubility of protein isolates raised at alkali pH, however, at neutral pH values the Bligh & Dyer defatted protein isolates showed higher solubility compared to control and Soxhlet. Similar differences in structural spectra were observed in FTIR bands intensities, probably due to a higher purity in protein structure compared to control and better arrangement compared when Soxhlet method was used (due to solvent polarity) and absence of heating for long period of time.

Keywords: microalgae, proteins, solubility.

Área: Aprovechamiento y valorización de subproductos

INTRODUCCIÓN

El uso inadecuado de los recursos naturales ha tenido un impacto negativo en el medio ambiente, entre ellos la producción y transformación de los alimentos. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas (ONU), el incremento exponencial de la población repercutirá en la demanda alimentaria, y por lo tanto su producción. De aquí la importancia en buscar una producción más sustentable que sea amigable con el medio ambiente sin sacrificar la calidad nutricional de los alimentos (FAO, 2017).

La mayor fuente de proteína alimentaria históricamente han sido los productos de origen animal, sin embargo, está bien establecido que su producción es uno de los factores más negativos a nivel ambiental tanto por el uso de recursos naturales (agua, tierra) como la emisión de gas metano (ganado vacuno). Las proteínas son macronutrientes esenciales en el mantenimiento de funciones vitales en el cuerpo humano, por lo cual es importante contar con fuentes alternativas más sustentables de igual calidad nutrimental.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que han sido estudiados por la gran cantidad de compuestos nutricionales que pueden aportar como grasas polinsaturadas, antioxidantes y principalmente proteínas (Bleakley & Hayes, 2017).

La microalga espirulina *Spirulina platensis* ha sido estudiada anteriormente como fuente de proteínas al igual que otras microalgas como *Chlorella vulgaris*, sin embargo, el proceso utilizado para su extracción puede afectar su rendimiento, estructura y por lo tanto su funcionalidad. Una de las principales propiedades funcionales para el uso de proteínas aisladas en el desarrollo de alimentos es la solubilidad, su pérdida por el procesamiento es uno de los principales problemas de uso en la industria alimentaria (Ursu et al., 2014).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de desgrasado de materia prima en el rendimiento y solubilidad de proteína aislada a partir de *Spirulina platensis*.

El rendimiento de la proteína no fue afectado por el pre-tratamiento del material, sin embargo, su solubilidad disminuyó cuando el material no fue desgrasado y cuando se utilizaron solventes orgánicos y calentamiento (Soxhlet). El método Bligh & Dyer resultó en proteína con una mejor estructura y solubilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La microalga fresca (*Spirulina platensis*) se adquirió a la empresa mexicana Galtec, Monterrey. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico marca Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA).

Análisis proximal.

El contenido de humedad (925.09), proteína (954.01), ceniza (923.03) y grasa (920.39) y de la materia prima (microalga fresca) fueron determinados mediante los métodos descritos por AOAC (1997).

Secado

La microalga fresca previamente congelada (-80 °C) fue liofilizada en un liofilizador de placas (LABCONCO), posteriormente fue reducida a polvo con ayuda de un mortero.

Extracción de grasas

Método Soxhlet (AOAC, 1997)

La muestra liofilizada fue colocada en cartuchos de celulosa en el equipo de extracción Soxhlet (adaptado con placa calefactora) utilizando n-hexano como solvente a una relación 1:15. El rendimiento se obtuvo por gravimetría al término de los ciclos de extracción y la total evaporación del solvente.

Método Bligh & Dyer.

La microalga liofilizada (4g) fue mezclada con una solución de cloroformo y metanol (1:2) y se agitó durante dos minutos, posteriormente se añadieron 10 ml de cloroformo y se agitó por 10 segundos. A la mezcla se le agregaron 8 ml de una solución de NaCl (1 %) se agitó por 30 segundos y reposó hasta la separación de fases. El sobrenadante fue colocado en recipientes de aluminio (peso constante), los cuales se calentaron hasta la evaporación del solvente para la determinación del contenido graso (Bligh and Dyer, 1959).

Aislamiento de proteína.

Se preparó una solución de microalga liofilizada con una solución NaOH 0.05M (1:9) y se asistió con ultrasonidos a una amplitud de onda de 70 % con 2 intervalos de 2.5 minutos. Posteriormente, la solución se calentó a 60 °C por 1 hora en un baño termostataado. La mezcla se centrifugó a 6000 rpm por 25 minutos (4 °C) y el sobrenadante se acidificó a un pH de 3.2 utilizando una solución de HCl (1M). El precipitado de proteína se centrifugó y liofilizó para su posterior uso.

Estructura secundaria por espectroscopía infrarrojo (FTIR).

Los espectros de transmitancia de los aislados proteicos se obtuvieron a un rango de longitud de onda de 500 a 4000 cm⁻¹ utilizando un espectrofotómetro Agilent Cary 630 acoplado con un ATR ZNSe. Los espectrogramas fueron analizados usando el software Microlab PC (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

Solubilidad.

La solubilidad de los aislados proteico a diferentes valores de pH (3-11) ajustando una solución de NaOH (1M) con HCl (0.1 M) fue determinada en soluciones proteicas La cantidad de proteína soluble se determinó mediante el método espectrofométrico de Lowry utilizando albúmina sérica bovina (BSA) para la curva de concentración.

El porcentaje de solubilidad de calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{\text{mg proteína solubilizada} * 100}{\text{mg de muestra}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis proximal.

Las características composicionales de la microalga fresca se muestran en la **Tabla 1**. Se puede observar que después del contenido de humedad la proteína es el componente mayoritario de la materia prima.

Tabla I: Análisis proximal de microalga <i>Spirulina platensis</i> .	
Componente	Contenido en %
Proteína (bs)	55.71 ± 0.58
Grasas (bs)	6.33 ± 0.58
Cenizas (bs)	2.33 ± 0.09
Humedad (bh)	70.72 ± 0.41

Tanto los valores de proteína como el contenido graso coinciden con valores reportados previamente para la misma cepa, con variaciones entre el 50-70 % (proteínas) y entre el 5-11 % (grasas) dependiendo de las condiciones de cultivo (Marrez et al., 2014).

En cuanto a la extracción de lípidos, se observó un mayor rendimiento de extracción mediante el método Bligh (16.63 %) comparado con el método Soxhlet (3.63 %) utilizando hexano como solvente. Esta diferencia puede deberse a la afinidad de los lípidos a diferentes solventes, el hexano por su fuerte carácter no polar extrae principalmente lípidos neutros como triacilglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol y derivados. Sin embargo, otros compuestos como los fosfolípidos que presentan cierta carga son mayoritariamente extraídos con metanol (Ranjith Kumar et al., 2015). Lo cual nos indica que el tipo de lípidos presentes en las microalgas son principalmente de estructura fosfo y glicolípídica.

Estructura proteica.

En la **Figura 1** se observan los espectros de infrarrojo de los aislados proteicos obtenidos de las materias primas desgrasadas con diferentes métodos. Todas las muestras presentaron la huella de la estructura secundaria de una proteína (1500-500 cm⁻¹). Esto denotado principalmente por la vibración de los enlaces C=O de los enlaces peptídicos en la región amida I (a 1650cm⁻¹) y los enlaces N-H en la región amida II (1550cm⁻¹).

Las muestras obtenidas en material desgrasado por el método Bligh, mostraron picos de mayor intensidad en todo el rango de longitudes de onda estudiadas a comparación de Soxhlet y muestras control.

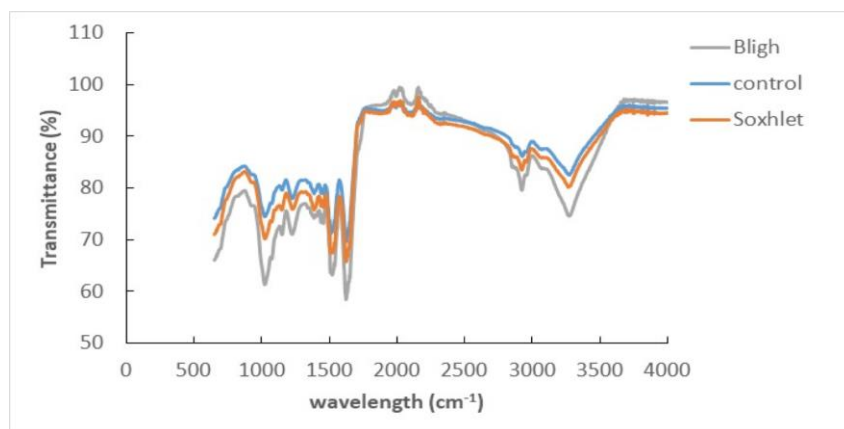


Figura 1: Espectrograma (FTIR) de proteína aislada de *Spirulina platensis* sin extracción previa de lípidos (control) y tras utilizar método Bligh & Dyer y Soxhlet para la extracción de lípidos.

Estos cambios conformacionales pueden mostrar diferencias estructurales en la proteína nativa e incluso una menor pureza. En el caso de la muestra control, el contenido lipídico pudo interferir ligeramente en la intensidad de la banda espectral y para Soxhlet la polaridad del solvente y el calentamiento pudo haber afectado la estructura de la proteína.

Solubilidad.

La solubilidad de los aislados proteicos aumentó a valores de pH más básico y disminuyó en cuanto se acercaban al punto isoelectrico (**Figura 2**). La mejor solubilidad a todos los rangos de pH la obtuvo la proteína del material desgrasado por el método Bligh seguida por Soxhlet y muestra control. Este comportamiento puede estar relacionado con los datos estructurales mencionados anteriormente. Los valores de solubilidad fueron relativamente bajos en comparación a los reportados en la literatura para *Chlorella vulgaris* (Bleakley & Hayes, 2017). Algunos estudios han demostrado que el proceso de liofilización expone los residuos hidrofóbicos en la superficie proteína, disminuyendo su solubilidad (Jakobek, 2015).

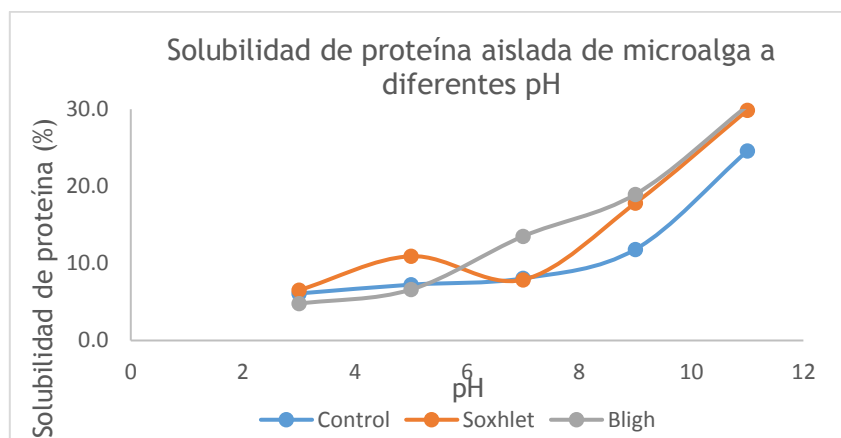


Figura 2: Solubilidad (%) de proteína aislada de *Spirulina platensis* en pH 3, 5, 7, 9 y 11 sin extracción previa de lípidos (control) y al utilizar método Bligh & Dyer y Soxhlet para la extracción de lípidos.

CONCLUSIÓN

La microalga *Spirulina platensis* puede ser considerada como una fuente importante y sustentable de proteínas. Sin embargo, la extracción de lípidos previa al aislamiento de proteínas afectó la pureza y la solubilidad del aislado. El método Bligh & Dyer mejoró la solubilidad del aislado a pH neutro, lo cual podría estar relacionado con una extracción mayor de lípidos y a una mayor pureza de la estructura proteica, comparado con otros métodos o sin la extracción de lípidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aluko, R. E., & Yada, R. Y. 1995. Structure-function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 53(3), 259-265.
- AOAC. 1997. Official Methods of Analysis. Washington (DC).
- Bleakley, S. & Hayes, M. 2017. Algal Proteins, Extraction, Application, and Challenges concerning Production. *Foods*. 6 (5), 33.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- FAO. (2017) El futuro de la alimentación y la agricultura: Tendencias y desafíos.
- Jakobek, L. 2015. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556–567.
- Marrez, D., Naguib, M., Sultan, Y. & Higazy, A. 2014. Evaluation of Chemical Composition for *Spirulina platensis* in Different Culture Media. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 5, 1161.
- Moukette, B. & Biapa, P. 2016. Chemical Composition of *Spirulina platensis* of Nomayos-Yaounde (Cameroon). *Annals. Food Science and Technology*. 17 (2), 524-528.
- ONU. (2015) World Population Prospects: 2015 revisions.
- Ranjith Kumar, R., Hanumantha Rao, P., & Arumugam, M. 2015. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. *Frontiers in Energy Research*, 2, 61.
- Sari, Y. W., Syafitri, U., Sanders, J. P., & Bruins, M. E. 2015. How biomass composition determines protein extractability. *Industrial Crops and Products*, 70, 125-133.
- Ursu, A., Marcato, A., Sayd, T., Sante, V., Djelveh, G., Michaud, P. 2014. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the micro-algae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 157,