



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS  
PROTEÍNAS DE LOS RESIDUOS DEL CAFÉ”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MIGUEL ANGEL LÓPEZ RICO**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>Profesor:</b> Francisca Aida Iturbe Chiñas
<b>VOCAL:</b>	<b>Profesor:</b> Hermilo Leal Lara
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Profesor:</b> Hilda Elizabeth Calderón Villagómez
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>Profesor:</b> Inés Miranda Martínez
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>Profesor:</b> Bertha Julieta Sandoval Guillén

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 322 y 323 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Edificio "E", Facultad de Química, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

M. en C. Francisca Aida Iturbe Chiñas

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Q.F.B. Bertha Julieta Sandoval Guillén

**SUSTENTANTE (S):**

Miguel Angel López Rico

## ÍNDICE.

ÍNDICE.....	3
INTRODUCCIÓN.....	6
OBJETIVOS.....	8
Objetivo General. ....	8
Objetivos particulares. ....	8
ANTECEDENTES.....	9
Café. ....	9
Proteínas. ....	10
Estructura de las proteínas. ....	12
Aminoácidos.....	18
Aminoácidos esenciales. ....	19
Clasificación de los aminoácidos.....	20
Determinación de aminoácidos. ....	22
Propiedades funcionales.....	23
Solubilidad.....	25
Capacidad de retención de agua.....	27
Capacidad de emulsificación.....	29
Factores que afectan la emulsificación.....	29
Capacidad de retención de aceite.....	30
Capacidad de espumado.....	31
Estabilidad de la espuma.....	33
Caracterización de proteínas.....	33
Método Osborne y Mendel.....	33
Extracción de proteínas.....	33
Extracción alcalina.....	34
Unión de colorantes (Método de Bradford). ....	34
METODOLOGÍA.....	37
Análisis composicional. ....	38
Pre tratamiento de la muestra.....	38
Extracción de grasa. ....	38
Obtención del aislado proteico.....	38

1. Molienda .....	38
Tamización.....	39
2. Método Osborne y Mendel .....	39
3. Extracción alcalina.....	39
Caracterización proteínica. ....	40
Solubilidad.....	40
Cuantificación de proteína. Método Biuret (Nielsen, 1998). ....	40
Cuantificación de proteína. Método Unión de colorantes. ....	40
Perfil de aminoácidos. Cromatografía en capa fina. ....	41
Evaluación de propiedades funcionales.....	42
Capacidad de retención de agua ( <i>Robertson et al, 2000</i> ). ....	43
Capacidad de retención de aceite ( <i>Robertson et al, 2000</i> ). ....	43
Capacidad de emulsificación ( <i>Fennema, 1996</i> ).....	43
Capacidad de Emulsificación. Método espectrofotométrico ( <i>Nielsen, 1998</i> ).....	44
Capacidad de espumado ( <i>Ahmedna et al, 1999</i> ). ....	44
Estabilidad de la espuma.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
Análisis composicional. ....	45
Obtención de un aislado proteínico.....	46
Método de Osborne y Mendel.....	46
Extracción alcalina.....	47
Molienda y tamizado.....	48
Caracterización.....	51
Solubilidad.....	51
Cromatografía en capa fina.....	54
Unión de colorantes.....	58
Evaluación de propiedades funcionales.....	60
Selección de la muestra para evaluar propiedades funcionales.....	61
Capacidad de retención de agua.....	61
Capacidad de retención de aceite.....	64
Capacidad de emulsificación ( <i>Chau et al, 1997</i> ). ....	66
Capacidad de emulsificación ( <i>Kinsella, 1976</i> ). ....	69

Capacidad de espumado.....	71
CONCLUSIONES.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	76

## **INTRODUCCIÓN.**

Las proteínas son macromoléculas formadas por la polimerización de monómeros llamados aminoácidos mediante reacciones de condensación por deshidratación. Las proteínas tienen una gran importancia en la industria alimentaria, dada su función estructural y catalizadora, son fuente de aminoácidos esenciales y por sus propiedades funcionales son utilizadas para la obtención de alimentos con características sensoriales altamente apreciadas.

Existen diversas dificultades para predecir el comportamiento funcional de las proteínas, para la obtención de un aislado proteico las principales dificultades son la naturaleza de las proteínas, el medio que las rodea, la complejidad de los sistemas alimenticios, entre muchos otros factores, por esta razón la finalidad de este trabajo tiene como objetivo la caracterización de las proteínas aisladas y un análisis de propiedades funcionales para poder predecir su comportamiento en un sistema alimenticio, y con esto plantear una posible utilización con base en las propiedades que presenten.

El objetivo general de este trabajo fue el de evaluar las propiedades funcionales de los residuos del procesamiento del café y las de un aislado proteínico para proponer su uso en la producción de alimentos. El aprovechamiento de nuevas fuentes de alimentos y/o la utilización de residuos de la industria alimentaria, hace necesario evaluar una gran cantidad de atributos de materias primas, en cuanto a proteínas alimenticias, en la industria alimenticia se sigue con una constante búsqueda de nuevas fuentes de proteínas para su uso como ingredientes funcionales y suplementos alimenticios.

Se eligieron los residuos de café ya que en la industria solamente se utiliza el 9.5% del peso del fruto fresco en la preparación de la bebida, y los residuos representan más del 70% del peso del grano de café. El café cuenta con proteínas tanto solubles como insolubles, en la fracción soluble principalmente se encuentra albúmina que es la responsable de la formación de espuma en la bebida, y la

fracción insoluble es la que se encuentra en la fracción llamada borra, la cuál fue el objeto de estudio.

Evaluar las propiedades funcionales de las proteínas insolubles que se encuentran en los residuos del café permitirá contar con un ingrediente que, adicionalmente aporta fibra y antioxidantes, y que pueda ser utilizado para mejorar las características sensoriales de los alimentos.



## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo General.**

- Evaluar las propiedades funcionales de los residuos del procesamiento del café y de las proteínas aisladas de estos residuos con la finalidad de proponer su uso en la producción de alimentos.

### **Objetivos particulares.**

- Obtener un aislado proteínico que sea viable para la industria alimenticia.
- Obtener fracciones ricas en proteína de los residuos del procesamiento del café con el fin de identificar de que manera podrían ser utilizados.
- Caracterizar la fracción insoluble de las proteínas del café para comprender el comportamiento de estas proteínas.
- Proponer un uso de los residuos del café con el fin de encontrar una nueva fuente de recursos para la industria alimenticia.

## ANTECEDENTES.

### Café.

Existen diferentes especies de *Coffea*, la planta del café, arbusto de hoja perenne perteneciente a la familia botánica de las Rubiáceas. La *Arábica* (Figura 1), representa el 59% de la producción mundial de café, la otra especie es la *robusta*. El grano de café es la semilla de la planta, que se encuentra en el interior de la baya. En cuanto a la composición química, está condicionada por la variedad de la especie, principalmente se compone por agua y materia seca, la materia seca de los granos del café está constituida por minerales y por sustancias orgánicas que son los carbohidratos, lípidos, proteínas, alcaloides, como la cafeína y la trigonelina, así como, por ácidos carboxílicos y fenólicos, y por compuestos volátiles que dan el aroma tan característico del café.



Figura 1. *Coffea arabica*.

En lo que se refiere a proteínas están presentes en el café en gran parte como enzimas libres en el citoplasma o unidas a los polisacáridos de las paredes celulares. Su contenido puede oscilar entre 8-15% en base seca, los principales aminoácidos son arginina, ácido aspártico, histidina y cisteína, su presencia tiende a disminuir durante la maduración y ejercen un papel importante en la formación de compuestos aromáticos durante el tostado. Además en dicho proceso, se produce una degradación proteínica que depende del grado del tueste y que da lugar a fracciones de menor peso molecular.

Actualmente, no se dispone de mucha información sobre el contenido de proteínas en la infusión de café recién preparado; se piensa que este contenido debe ser bajo, ya que al desnaturalizarse las proteínas, su solubilidad disminuye. En el café instantáneo según algunos estudios indican que el contenido de proteína oscila entre 0.5-5.5% en base seca, en esta cantidad se encuentran principalmente las proteínas de la fracción soluble y algunos aminoácidos libres (*Belitz, 1997*). Por otro lado, cabe mencionar que no existe información acerca del comportamiento ni caracterización de las proteínas insolubles de los residuos del café (*Figura 2*).



Figura 2. Residuos del procesamiento de café.

La degradación y disminución del contenido de proteínas en el grano de café tostado dependen del grado de tueste. Los aminoácidos reaccionan y generan compuestos del aroma del café tostado, así, en la reacción de *Strecker* se transforman en aldehídos,  $\text{CO}_2$  y amoníaco, y en la reacción de Maillard reaccionan con los azúcares reductores y producen las melanoidinas y diversos compuestos volátiles nitrogenados y azufrados.

### **Proteínas.**

Las proteínas son macromoléculas formadas por la polimerización de monómeros llamados aminoácidos (existen veinte) mediante reacciones de condensación por deshidratación (*Cheftel, 1992*). Estos biopolímeros están constituidos por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y la mayoría de las veces azufre. Todas las propiedades físicas y químicas de las proteínas dependen completamente del tipo, concentración y de la secuencia de unión de los monómeros constituyentes.

Estas sustancias desempeñan funciones biológicas en el organismo humano, entre las que se cuenta principalmente la regeneración y la formación de tejidos, la síntesis de enzimas, anticuerpos y hormonas, y como constituyente de la sangre, entre otras; forman parte del tejido conectivo muscular de los animales y de otros sistemas rígidos estructurales. Los órganos del hombre están compuestos fundamentalmente por proteínas y se calcula que existen aproximadamente 5 millones de tipos cada una con propiedades y características muy específicas.

Las proteínas son responsables en gran medida de la textura y de las características reológicas de muchos alimentos, y las alteraciones indeseables físicas o químicas que estos sufren dan como resultado una calidad sensorial y nutricional pobre, que muchas veces lleva consigo al rechazo del producto (*Badui, 1994*). Por este motivo es de gran importancia un manejo adecuado de métodos físicos y químicos en el procesamiento de los alimentos para que las proteínas no sufran este tipo de alteraciones indeseables.

En cuanto a solubilidad las proteínas se dividen en albuminas, globulinas, histonas, glutelinas, prolaminas y escleroproteínas. La solubilidad depende del tipo de aminoácidos que contenga, de tal forma que el polipéptido que tenga muchos residuos hidrófobos tenderá a ser menos soluble en agua que el que tenga un elevado número de grupos hidrófilos. El proceso de la solubilización implica que las moléculas de proteína estén separadas y dispersas en el disolvente y además que ejerzan una máxima interacción con el líquido que las rodea.

- **Albúminas:** Solubles en soluciones salinas diluidas y en agua, precipitan en sulfato de amonio al 50%.
- **Globulinas:** Son prácticamente insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas diluidas.
- **Histonas:** Se caracterizan por su elevado contenido de aminoácidos básicos y por ser solubles en ácidos y en agua, debido a sus escasas son de poca importancia en la tecnología de alimentos.
- **Glutelinas:** Son insolubles en agua, en etanol y en soluciones salinas y solo solubilizan en ácidos (pH 2) o en álcalis (pH 12); junto con las

prolaminas constituyen la mayoría de las proteínas que se encuentran en algunos granos como el trigo y el maíz.

- **Prolaminas:** Solo solubilizan en etanol 50-80%.
- **Escleroproteínas:** Por tener estructura fibrosa son insolubles prácticamente en todos los disolventes, presentan cierto grado de cristalinidad y son muy resistentes a la acción de la mayoría de los agentes químicos y enzimáticos.

### ***Estructura de las proteínas.***

La organización de las proteínas viene definida por cuatro niveles estructurales denominados: estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria.

**Estructura primaria:** Se considera como estructura primaria a la secuencia lineal específica (sin ramificaciones) de aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico. El enlace peptídico es la unión del grupo  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido y del grupo amina del aminoácido mediante condensación y la eliminación de una molécula de agua (*Figura 3*). La importancia desde el punto de vista químico de la estructura primaria, radica en la secuencia de los grupos laterales de los aminoácidos (cadenas laterales, R) dado que es el componente variable de la molécula que proporciona la identidad a la cadena.

Por otra parte, el significado biológico de esta secuencia se basa en el control que ella ejerce en la organización de los niveles de complejidad superiores de la estructura proteica ya que esta determinará en última instancia su actividad biológica, es decir, la secuencia de aminoácidos tiene la información necesaria para que la molécula adopte una conformación tridimensional adecuada. El grado de tolerancia a los cambios depende del grado de alteración de la geometría que presente la estructura proteica, así como del comportamiento químico que tiene la cadena lateral del aminoácido sustituido (polar, no polar, básico o ácido). Cabe resaltar que todas las proteínas sin importar su nivel de organización se originan de una estructura primaria que posteriormente adopta una conformación tridimensional específica (*Voet y Voet, 2006*).

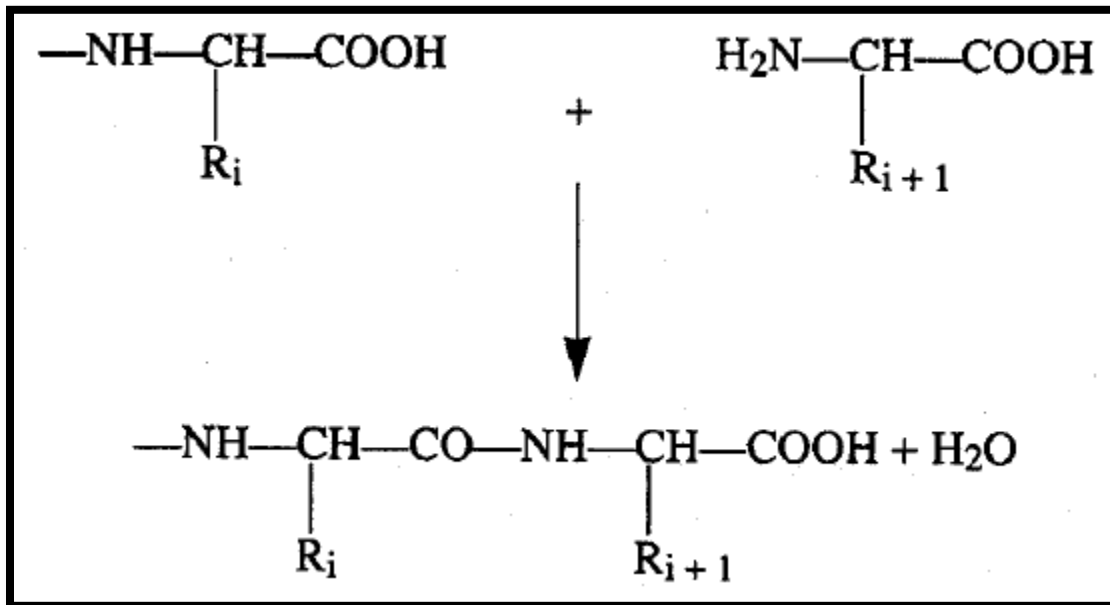


Figura 3. Formación de enlace peptídico mediante condensación de dos aminoácidos.

**Estructura secundaria:** Consiste en el enrollamiento de la cadena peptídica sobre su propio eje para formar una hélice o alguna otra estructura tridimensional específica. La estructura secundaria más común es la  $\alpha$ -hélice, la cual se caracteriza por formar una estructura geométrica en espiral, muy uniforme, en la que cada vuelta está constituida por 3,6 aminoácidos.

La hélice se mantiene mediante puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del grupo amino del enlace peptídico de un aminoácido y el grupo carboxilo del enlace peptídico de otro. Dentro de este grupo se pueden mencionar proteínas como el colágeno, la queratina y la elastina (*Figura 4*).

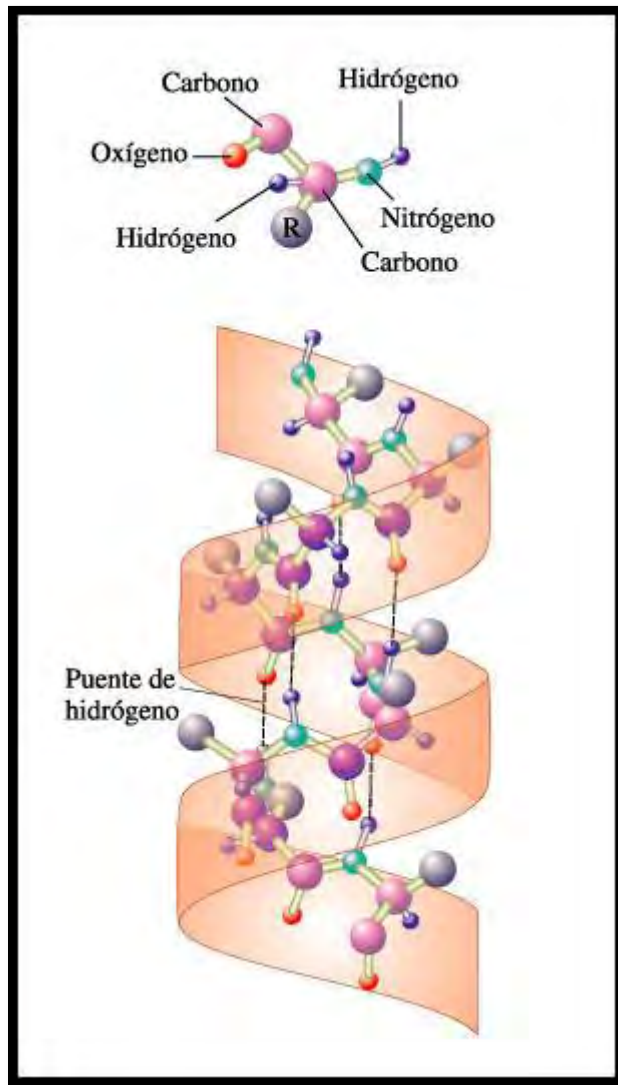


Figura 4. Estructura secundaria con orientación  $\alpha$ -hélice, dicha estructura se mantiene mediante puentes de hidrogeno entre los hidrógenos del grupo carboxilo de un enlace peptídico y el hidrogeno del grupo amino de otro enlace peptídico.

Otro tipo común de estructura secundaria es la hoja  $\beta$  plegada, que se caracteriza por presentarse de forma aplanada y extendida, además posee un máximo de enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos. Esta estructura consta de varias cadenas peptídicas que permanecen enfrentadas y se mantienen juntas con enlaces de hidrógeno en un arreglo a manera de zigzag. La estructura laminar formada le confiere flexibilidad más no elasticidad (*Figura 5*). Debido a que toda cadena poli peptídica tiene un extremo C-terminal en una dirección y un extremo

N- terminal en la otra, dos cadenas enlazadas con hidrógeno y una al lado de la otra pueden correr en la misma dirección, paralelas, o en dirección opuesta, anti paralela. Un ejemplo de estas proteínas es la fibroína de la seda.

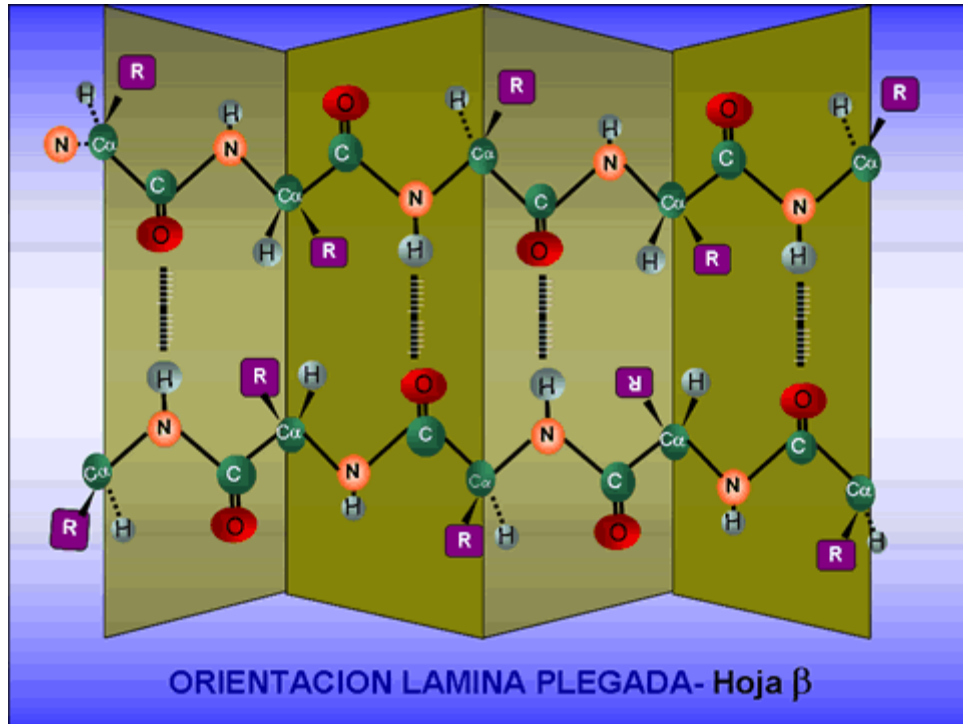


Figura 5. Estructura secundaria con orientación  $\beta$ -plegada.

**Estructura terciaria:** Es raro para una proteína entera permanecer con la estructura de  $\alpha$ -hélice u hoja  $\beta$ -plegada. La mayoría de ellas adquieren formas tridimensionales complejas denominadas estructuras terciarias, debido a que mientras la estructura secundaria trata fundamentalmente de la conformación de los aminoácidos adyacentes de la cadena poli peptídica, la estructura terciaria describe la conformación definitiva y específica de la proteína. Durante el enrollamiento de la cadena peptídica, para dar origen a la estructura terciaria, los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas e hidrofóbicas entre una parte de la cadena y otra son las fuerzas que mantienen los pliegues en posición espacial correcta. Por otra parte, los puentes disulfuro (-S-S-) que se forman entre los aminoácidos de cisteína pueden acercar partes que se hayan distantes en una proteína, de hecho algunos sitios activos de enzimas están constituidos por ellos.



Además, en la proteína también se forman algunos otros enlaces covalentes para mantener su estructura terciaria que por lo general es globular. Con respecto a la estructura terciaria de cadenas poli peptídicas largas, cabe destacar la presencia de regiones compactas semiindependientes denominadas dominios, que se caracterizan por poseer una geometría casi esférica específica con un interior hidrofóbico y un exterior polar. El carácter independiente del dominio es evidente cuando al separarlo de la cadena, su estructura primaria es capaz de plegarse sobre sí misma para adoptar la conformación nativa. Una proteína puede presentar más de un dominio, a menudo interconectados por un segmento poli peptídico carente de estructura secundaria regular (*Figura 6*) y alternativamente estar separados por una hendidura o una región menos densa en la estructura terciaria de la proteína. Los diferentes dominios de una proteína pueden gozar de movimiento relativo que está asociado con una función.

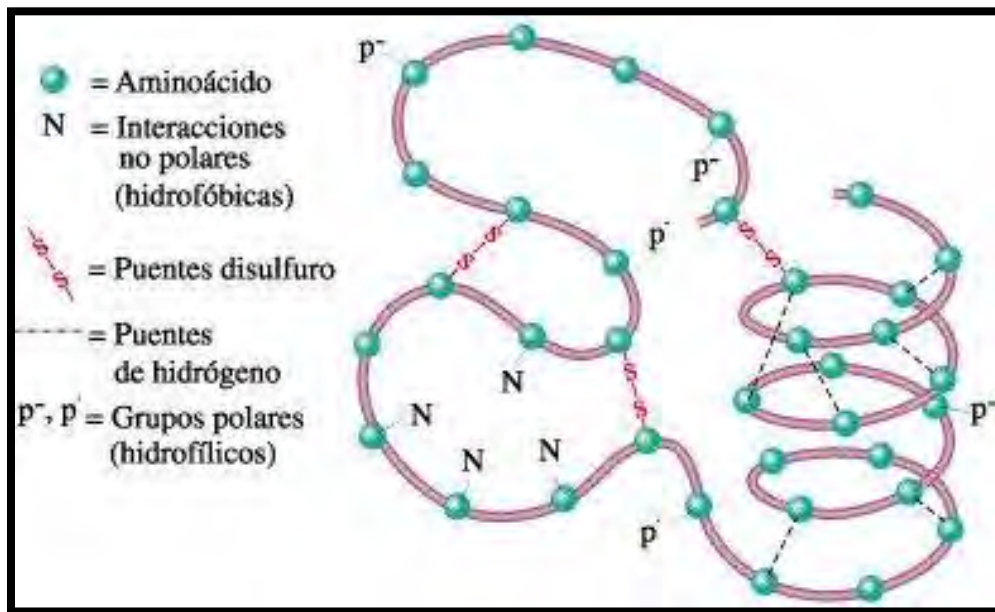


Figura 6. Conformación de una proteína con estructura terciaria, donde se observan sus diferentes dominios y sus interacciones.

**Estructura cuaternaria:** Como se mencionó anteriormente muchas proteínas tienen dos o más cadenas plegadas de poli péptidos (subunidades) para formar su estructura terciaria. En la estructura cuaternaria se consideran moléculas proteicas superiores a los 50 mil Dalton en donde las subunidades constitutivas pueden ser idénticas o diferentes y se asocian para formar dímeros, trímeros y tetrameros (*Figura 7*). En algunos casos las cadenas aisladas son inactivas, pero en otros pueden cumplir la misma función que el complejo, aunque con diferente cinética. El ejemplo más conocido es la hemoglobina en donde las interacciones hidrofóbicas, los enlaces de hidrógeno y los enlaces iónicos ayudan a mantener las cuatro subunidades juntas para formar una molécula funcional, así cada subunidad de hemoglobina se pliega de manera similar a la estructura terciaria de mioglobina. Dado que la hemoglobina dentro de los glóbulos rojos está constituida por dos cadenas alfa y dos cadenas beta que permiten tomar una molécula de oxígeno, para "atrapar" moléculas adicionales de oxígeno, las cuatro subunidades cambian ligeramente su conformación y los enlaces iónicos se rompen para exponer las cadenas y facilitar esta función. Esto indica que las asociaciones estrechas de las cadenas de poli péptidos dentro de la misma proteína proporcionan un tipo de comunicación entre las unidades y se puede entender que en las cadenas de aminoácidos existen dos tipos de información: uno que genera la conformación adecuada de las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias y otro que permite la reactividad correcta de las moléculas.

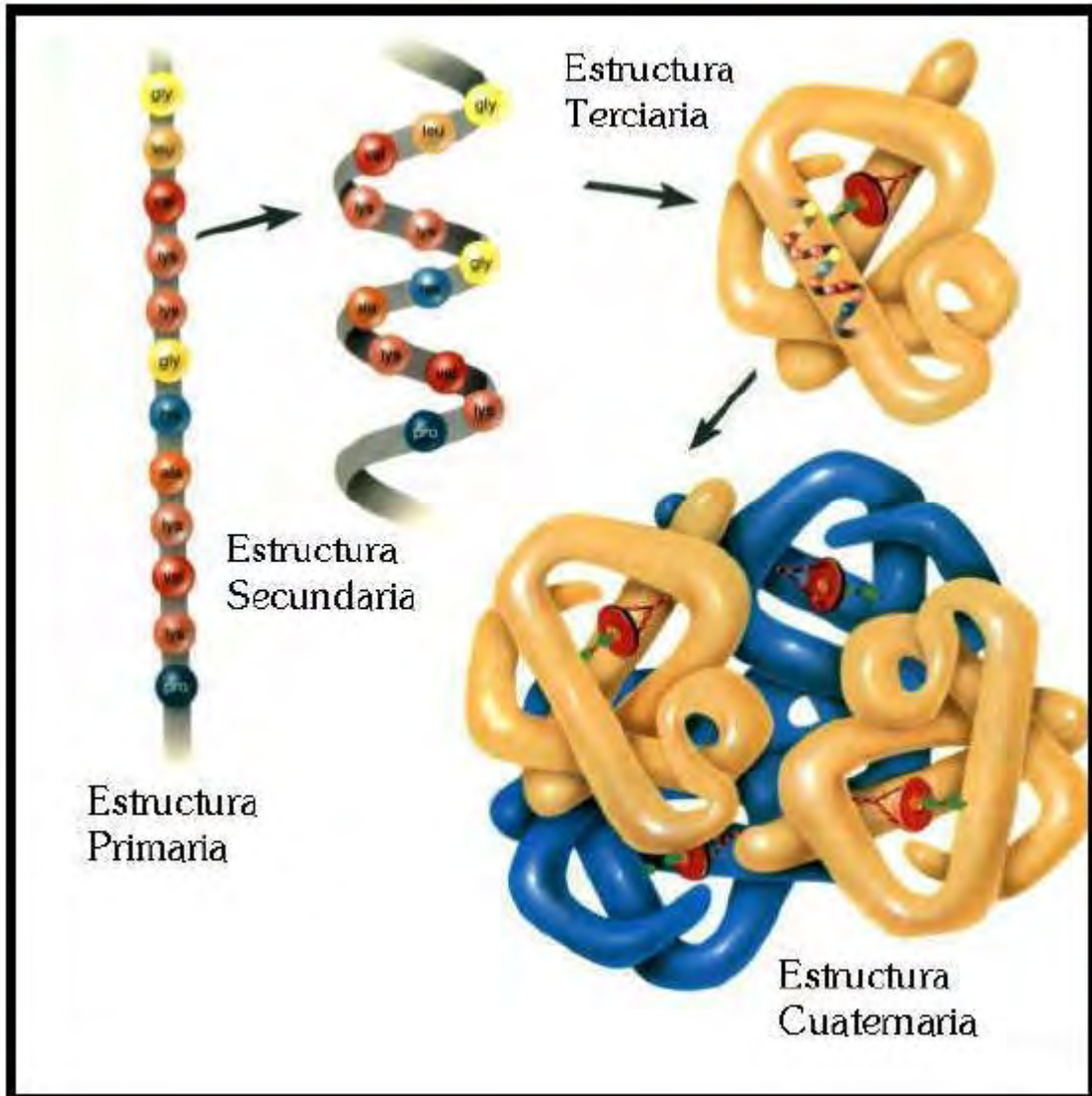


Figura 7. Secuencia de conformación de una estructura cuaternaria (hemoglobina).

### Aminoácidos.

Los aminoácidos son las unidades estructurales de las proteínas. Están constituidas por un grupo amino primario ( $-NH_2$ ), un grupo de ácido carboxílico ( $-COOH$ ) y una cadena lateral ( $-R$ ) que es la característica fundamental de cada aminoácido y hace que se diferencien. En la mayoría de los aminoácidos el grupo amino se encuentra unido al átomo de carbono  $\alpha$ , el cuál es el átomo más próximo al grupo carbonilo, debido a esto son denominados  $\alpha$ -aminoácidos (*Figura 8*). (Wade, 2004).

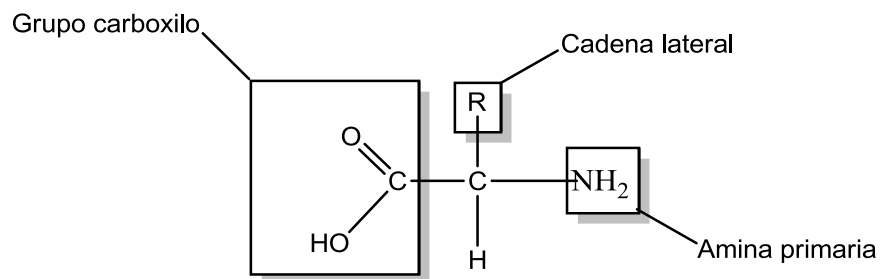


Figura 8. Estructura general de los aminoácidos.

Las propiedades físico-químicas como la carga neta, la solubilidad, la reactividad química y las posibilidades de establecer enlaces de hidrógeno de los aminoácidos dependen de la naturaleza química de la cadena lateral.

Las propiedades de los aminoácidos en conjunto se ven reflejadas en las características de las proteínas: por ejemplo si un polímero estuviera constituido por un porcentaje elevado de aminoácidos hidrófobos, se podría pensar que sería poco soluble en agua, etc.

### ***Aminoácidos esenciales.***

El ser humano necesita un total de veinte aminoácidos, de los cuales, 11 de ellos nuestro propio organismo los sintetiza y no se necesitan adquirirlos de la dieta, éstos son llamados no esenciales o dispensables. Los nueve restantes no pueden ser sintetizados por el hombre y deben ser aportados por la dieta. Los aminoácidos que adquirimos obligatoriamente de la dieta son los denominados aminoácidos esenciales, o actualmente llamados indispensables, a saber: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina (y cisteína), fenilalanina (y tirosina), treonina, triptófano, y valina. Ya que la metionina es un precursor de la cisteína y la fenilalanina de la tirosina, estos aminoácidos se consideran normalmente en parejas. Si falta uno solo de ellos no será posible sintetizar ninguna de las proteínas en la que sea requerido dicho aminoácido (FAO, 1991). Esto puede dar lugar a diferentes tipos de desnutrición, según cuál sea el aminoácido limitante, es decir, el aminoácido que no se encuentra en la proteína alimentaria y por tanto, no contribuye a la síntesis de nuevas proteínas (*Figura 9*).

### ***Clasificación de los aminoácidos.***

Los aminoácidos se pueden clasificar basándose en el grado de interacción de las cadenas laterales con el agua. Los aminoácidos con cadenas alifáticas y aromáticas son hidrófobos por lo cual su solubilidad es limitada en agua, mientras que los aminoácidos polares son bastante solubles en agua y pueden estar cargados o no. Tanto los aminoácidos ácidos como los básicos son fuertemente hidrófilos. La carga neta de una proteína, en condiciones fisiológicas, depende del número de aminoácidos ácidos y básicos que contenga.

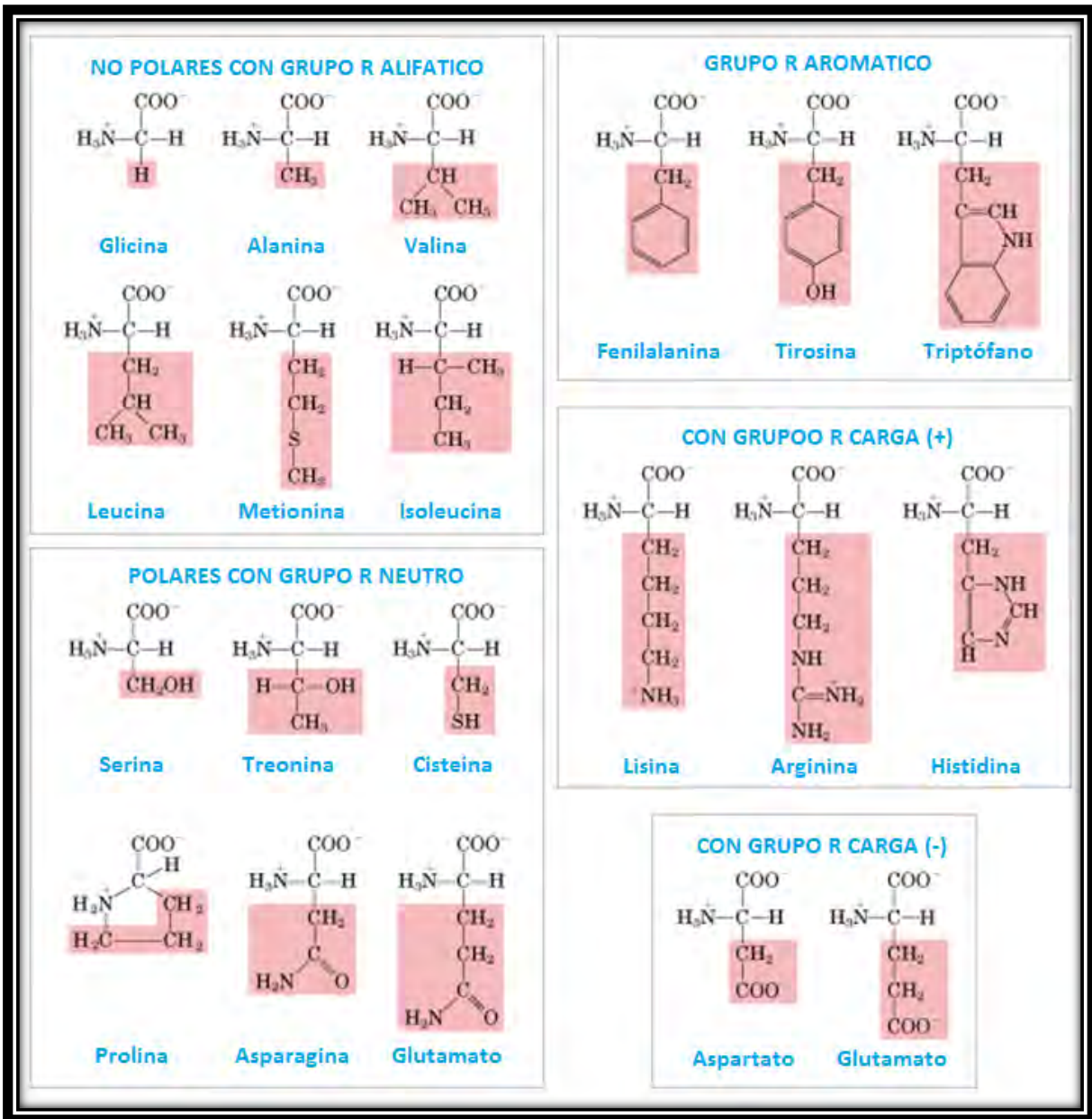


Figura 9. Clasificación de los 20 aminoácidos más importantes (Lehninger, 2006)

### **Determinación de aminoácidos.**

Los métodos colorimétricos de determinación de aminoácidos se basan en la reacción específica de éstos con ninhidrina, dando como resultado derivados con color particular (morado). La formación de color se toma como resultado positivo e indica su presencia, mientras que el no desarrollo de color es indicativo de que no está presente.

De todos los métodos colorimétricos, el más general y utilizado es el de la reacción con la ninhidrina. La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) reacciona con aminoácidos que tengan el grupo amino libre, dando lugar a la formación de amoniaco y anhídrido carbónico, con reducción del reactivo (ninhidrina) a hidrindantina (*Figura 10*).

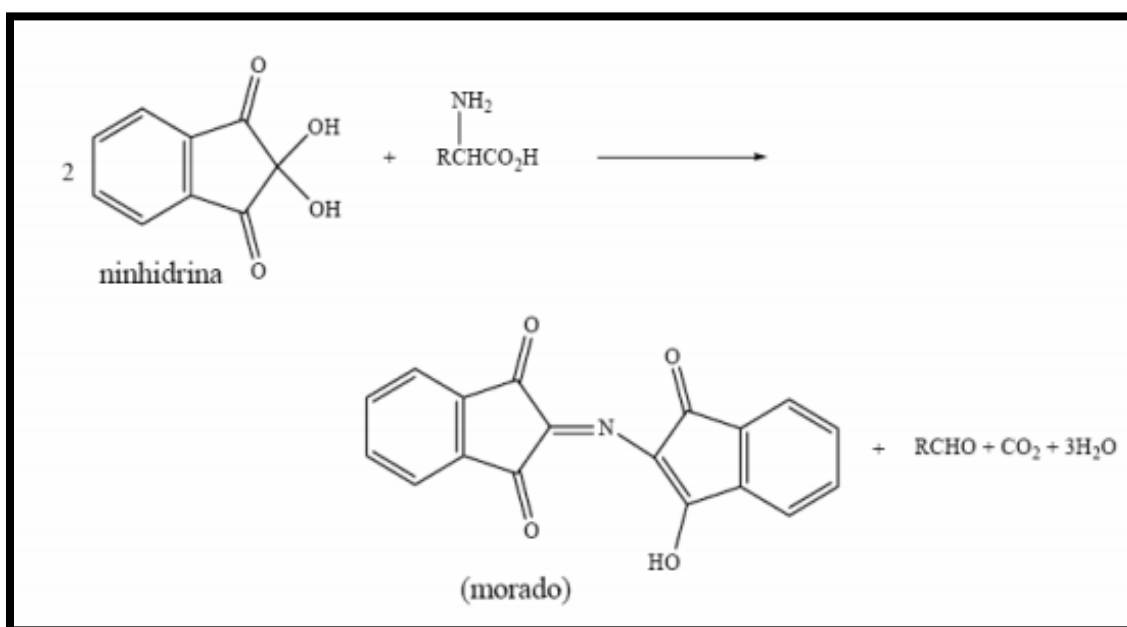


Figura 10. Reacción de aminoácidos con ninhidrina. (*White y Hart, 1992*)

La hidrindantina reacciona a su vez con el amoniaco y otra molécula de ninhidrina para dar un compuesto de adición doble que presenta una coloración azul-púrpura, con la excepción de la prolina que da una coloración amarillenta recordando que en la prolina el grupo amino esta sustituido. La reacción se lleva a cabo en caliente y a valores de pH comprendidos entre 4 y 8. Las aminas primarias ( $\text{R-CH}_2\text{-NH}_2$ ) dan también positiva la prueba de la ninhidrina, aunque en este caso

no se libera CO<sub>2</sub>. La técnica es muy sensible, por lo que es ideal para detectar concentraciones bajas de aminoácidos, utilizándose para revelar su presencia en cromatogramas y fracciones procedentes de otras técnicas de separación. La presencia de aldehídos resultantes de la degradación de la ninhidrina por reacción con los aminoácidos modifica, bajo ciertas condiciones, el color formado, lo que sirve para identificar el tipo de aminoácido (*Bermúdez et al.*, 2014).

La reacción de la ninhidrina con los aminoácidos es muy sensible, con los aminoácidos primarios forma un complejo morado (morado de Ruhemann) que absorbe a una  $\lambda$  de 570nm, y con los aminoácidos secundarios, forma un complejo amarillo que absorbe a 440nm. Cuando empieza a oxidarse el reactivo, su color no se desarrolla bien a 570nm pero la absorción a 440nm permanece constante (*Wetson, Brown*, 1997).

### **Propiedades funcionales.**

Las propiedades funcionales se definen como cualquier propiedad fisicoquímica de los polímeros que afecta y modifica algunas características deseables de un alimento esto a su vez contribuye a la calidad final del producto; éstas dependen fundamentalmente de factores intrínsecos propios de la molécula (conformación, relación de los aminoácidos, hidrofobicidad, forma, peso molecular, etc.), así como de factores extrínsecos del medio que los rodea, y que en ocasiones pueden modificarse (pH, temperatura, etc.). La “funcionalidad” de las proteínas alimentarias se define como “aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de las proteínas de los sistemas alimenticios durante el procesado.

Las propiedades de los productos alimenticios juegan un importante rol en la aceptación del consumidor. La apariencia, tamaño, forma, textura, consistencia y viscosidad son algunas de las características físicas importantes en varios productos alimenticios. Así mismo, un atributo considerado deseable en un alimento puede ser indeseable en otro. Por ejemplo, una alta viscosidad es



deseable en una sopa, pero no lo es en una bebida. El procesador selecciona sus ingredientes y los procesa para obtener las propiedades deseables en el producto terminado. La habilidad de un ingrediente alimenticio para interactuar con otros e impartir propiedades deseables a un sistema de alimentos es conocido como funcionalidad (*Wijeratne, 2005*).

Los alimentos son sistemas complejos que están formados por varios componentes como lo son las proteínas, grasas, carbohidratos y sales minerales los cuales influyen en las propiedades funcionales. Por lo que la funcionalidad total de un ingrediente no puede ser considerada independiente de otros. Más bien, los efectos funcionales observados son el resultado de la interacción entre los ingredientes. Esto ha hecho del estudio de la funcionalidad un ejercicio difícil. Las proteínas de origen vegetal (soya, leguminosas, suero de leche etc.) son usadas en un grado muy limitado en los alimentos convencionales ya que no se comportan tan bien como las proteínas de origen animal en cuanto a funcionalidad, esto complica aún más el uso de proteínas de origen vegetal en los sistemas alimenticios.

Aunque existe información considerable del tema, ésta no está bien definida ni organizada para un sistema tan complejo como lo es un alimento. Las pocas técnicas aceptadas universalmente para la determinación de las propiedades funcionales y descripción de terminología estandarizada, complica aún más este asunto. Sin embargo, algunos estudios de la funcionalidad de ingredientes individuales en sistemas simples son útiles para predecir, controlar y algunas veces para impartir características deseables a sistemas de alimentos reales.

Si bien es cierto que es mucho lo que se sabe sobre propiedades físico-químicas de varias proteínas alimentarias, no es posible predecir fiablemente las propiedades funcionales a partir de sus propiedades moleculares, se han establecido unas cuantas correlaciones empíricas entre propiedades moleculares y ciertas propiedades funcionales en sistemas modelos (no reales), sin embargo el comportamiento no siempre es el mismo que un sistema real como un alimento, lo que en parte es atribuible a la desnaturalización de las proteínas durante la

fabricación del alimento. Este grado de desnaturalización se debe a factores como pH, temperatura, condiciones de procesado, así como determinadas características del producto. Además, en los alimentos reales las proteínas interactúan con otros componentes como lípidos, azúcares, polisacáridos, y algunos otros componentes minoritarios que modifican el comportamiento funcional.

Las propiedades funcionales de las proteínas dependen de tres tipos de interacciones:

- Interacción proteína-agua (solubilidad).
- Interacción proteína-lípido (emulsiones).
- Interacción proteína-proteína (viscosidad).

### ***Solubilidad.***

Los datos sobre las características de solubilidad son muy útiles para poder determinar las condiciones óptimas de extracción y purificación de las proteínas, a partir de fuerzas naturales, así como la separación de fracciones proteínicas. Esto se debe a que el grado de insolubilidad es, probablemente, la medida más práctica de la desnaturalización-agregación proteínica ya que las proteínas que existen al comienzo en un estado desnaturalizado, parcialmente agregado, muestran frecuentemente un descenso de capacidad de emulsión o formación de espumas (*Cheftel*, 1989).

Desde el punto de vista termodinámico, la solubilización corresponde a la separación de moléculas de disolvente, la separación de moléculas de proteína y la dispersión de estas últimas en el disolvente con la máxima interacción entre la proteína y el disolvente.

De acuerdo a la tabla 1 una proteína debe ser capaz de interactuar lo más posible con el disolvente.

Tabla 1. Clasificación de proteínas con base en su solubilidad.

Nombre	Solubilidad	Ejemplos
Albúminas	Solubles en agua a pH de 6.6	Albumina de suero, albumina de huevo.
Globulinas	Solubles en soluciones salinas diluidas, pH 7	Beta-lactoglobulina, glicina en la soya
Prolaminas	Solubles en etanol al 70%	Zeína del maíz y gliadina del trigo
Gluteinas	Insolubles en los anteriores y solubles en ácidos (pH 2) ó álcalis (pH 12)	Gluteína del trigo, oryzenina en el arroz
Escleroproteínas	Proteínas insolubles	Colágeno o la alfa-queratina

La solubilidad proteínica depende básicamente de factores controlables como son; temperatura, polaridad, fuerza iónica y el pH.

**Temperatura.** Cuando la temperatura es elevada aumenta la energía cinética de las moléculas con lo que se desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas, y se desnaturalizan. Así mismo, un aumento de la temperatura destruye las interacciones débiles y desorganiza la estructura de la proteína, de forma que el interior hidrofóbico interacciona con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada.

**Polaridad.** La polaridad del disolvente disminuye cuando se le añaden sustancias menos polares que el agua como el etanol o la acetona. Con ello disminuye el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la molécula proteica, provocando la agregación y precipitación. Los disolventes orgánicos interaccionan con el interior hidrofóbico de las proteínas y desorganizan la estructura terciaria, provocando su desnaturalización y precipitación. La acción de los detergentes es similar a la de los disolventes orgánicos.

**Fuerza iónica.** Un aumento de la fuerza iónica del medio (por adición de sulfato amónico, urea por ejemplo) también provoca una disminución en el grado de

hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que estos solutos (1) compiten por el agua y (2) rompen los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan. En muchos casos, la precipitación provocada por el aumento de la fuerza iónica es reversible. Mediante una simple diálisis se puede eliminar el exceso de soluto y recuperar tanto la estructura como la función original. A veces es una disminución en la fuerza iónica la que provoca la precipitación. Así, las proteínas que se disuelven en medios salinos pueden desnaturalizarse al dializarlas frente a agua destilada, y se re naturalizan cuando se restaura la fuerza iónica original.

**pH.** Los iones  $H^+$  y  $OH^-$  del agua provocan efectos parecidos, pero además de afectar a la envoltura acuosa de las proteínas también afectan a la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y a menudo provoca su precipitación. La solubilidad de una proteína es mínima en su punto isoeléctrico, ya que su carga neta es cero y desaparece cualquier fuerza de repulsión electrostática que pudiera dificultar la formación de agregados.

En valores de pH diferentes al punto isoeléctrico de una proteína se sabe que la proteína se puede cargar positiva o negativamente de esta manera las moléculas de agua pueden interactuar con estas cargas contribuyendo así a la solubilización de las proteínas en agua (*VanMegan.*, 1974).

### ***Capacidad de retención de agua.***

El agua es un constituyente esencial de los alimentos. Las propiedades reológicas y estructurales de los alimentos dependen de la interacción del agua con otros constituyentes, especialmente con macromoléculas, como las proteínas y los polisacáridos. Por ejemplo, en los alimentos pobres en agua o de contenido en agua intermedio, como los productos horneados y ciertos productos cárnicos, la capacidad de las proteínas de fijar agua es fundamental para la aceptabilidad de los mismos.

En los alimentos, la capacidad de retención de agua de los preparados proteicos es más importante que la fijación. La capacidad de retención de agua se refiere a la resistencia opuesta por una matriz proteica (como un gel, la carne o el pescado) a perder, bajo la acción de una fuerza externa (presión o más comúnmente centrifugado), el agua inmovilizada, que es la suma del agua ligada, el agua hidrodinámica y el agua físicamente atrapada. La contribución del agua físicamente atrapada al total de la retenida es muy superior a la del agua ligada y a la del agua hidrodinámica. Sin embargo, se ha demostrado que la “capacidad de retención de agua” de las proteínas esta positivamente correlacionada con la de fijación de agua. El atrapamiento de agua por las proteínas juega un papel importante en la jugosidad y la blandura de los productos cárnicos picados y en la textura deseable de diversos productos de panadería y de los geles alimenticios.

La capacidad de fijación de agua a las proteínas se define en términos de gramos de agua fijados por gramo de proteína. La capacidad de retención de agua de las proteínas se ve influida por varios factores ambientales (como el pH, la fuerza iónica, el tipo de sales, la temperatura) y por la conformación proteica

En este método se mide el agua ligada (agua de hidratación, no congelable) como el agua capilar, retenida físicamente entre las moléculas proteicas. La concentración proteica, el pH, la temperatura, el tiempo, la fuerza iónica y la presencia de otros componentes afectan a las fuerzas que toman parte en las interacciones proteína-proteína y proteína-agua.

Las moléculas de agua se fijan a varios grupos de las proteínas, entre los que se incluyen los cargados (interacciones ión-dipolo), los grupos peptídicos del esqueleto, los grupos amida de Asn y Gln, los grupos hidroxilo de los restos de Ser, Thr y Tyr (interacciones dipolo dipolo, todas ellas), y los restos apolares (interacciones dipolo inducido-dipolo, hidratación hidrofóbica). A nivel macroscópico, la fijación de agua por las proteínas tiene lugar en un proceso por etapas. Los grupos iónicos con gran afinidad por el agua son los primeros en solvatare, a actividad de agua baja; luego se solvatan los grupos polares y apolares.

### **Capacidad de emulsificación.**

La capacidad de las proteínas para actuar como emulsificantes depende de su habilidad para adsorberse en una interfase agua-aceite. Las emulsiones son dispersiones de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se encuentra bajo la forma de pequeñas gotitas dispersas en el otro líquido que constituye la fase continua dispersante (*Cheftel, 1989*).

Las proteínas se adsorben en la interfase entre las gotas de aceite disperso y la fase acuosa continua, y aportan propiedades físicas y reológicas (viscosidad, elasticidad, rigidez, etc) que determinan la resistencia de las gotas a la coalescencia. Así mismo, según el pH, se puede producir la ionización de las cadenas laterales de los aminoácidos y esto aporta fuerzas de repulsión electrostática que favorece la estabilidad de la emulsión (*Damodaran, 1997*).

La función de las proteínas como agentes emulsificantes se mide por diferentes parámetros:

- La estabilidad de una emulsión (ES), es el mantenimiento de una estructura y textura homogéneas del sistema. Esto debido a la presencia de una capa interfase estable, constituida por una película de proteínas adsorbidas, que se oponen físicamente a la coalescencia de las gotas de aceite.
- Índice de actividad emulsificante (IAE), se expresa como el área de la interfase estabilizada por unidad de peso de proteína.
- Actividad de emulsificación (AE), es el área superficial total de una emulsión.
- Capacidad de emulsificación (CE), es la máxima cantidad de lípido emulsificado en una dispersión proteica (*Díaz y Maldonado, 2000*).

### **Factores que afectan la emulsificación.**

Las emulsiones son mezclas termodinámicamente inestables de sustancias inmiscibles. Cuando el agua y un lípido se mezclan existe una fuerte repulsión que limita su contacto y ocurre una separación de fases.

Las proteínas estabilizan emulsiones. Cuando los grupos hidrofóbicos se ponen en contacto mínimo con el agua para dar un estado energéticamente favorable, se origina una estructuración ordenada de moléculas de agua, lo que resulta en la formación de pequeñas gotas (*Puppo et al, 2005*).

Se cree que la adsorción de las proteínas en la interfase ocurre en tres fases:

La proteína nativa se difunde a la región de contacto donde penetra a la interfase y resulta una desnaturalización de superficie.

La proteína adsorbida se re-arregla para formar el estado de menor energía insertando grupos hidrofóbicos en la fase oleosa.

Se forma una capa de proteína alrededor de los glóbulos de grasa.

La adsorción de proteínas en la interfase puede variar por factores como flexibilidad conformacional, hidrofobicidad y la viscoelasticidad en la capa interfasial (*Yasumatsu et al, 1972*).

Los cambios de pH y fuerza iónica pueden afectar las propiedades de hidrofobicidad, alterando la conformación proteica.

Un grupo numeroso de productos alimenticios está constituido por emulsiones, tales como la leche, crema, helado, mantequilla, queso fundido, mayonesa, aderezos, embutidos, etc., donde los constituyentes proteínicos tienen frecuentemente un papel preponderante en la estabilización de estos sistemas coloidales , un ejemplo es la emulsión natural de la leche, donde se estabiliza la membrana de glóbulos grasos formada por capas sucesivas adsorbidas de triglicéridos, fosfolípidos, lipoproteínas insolubles y proteínas solubles (*McWatters y Cherry, 1977*).

### ***Capacidad de retención de aceite.***

La capacidad de retención de aceite presenta el mismo fundamento que la capacidad de retención de agua, solo que se utiliza aceite vegetal en lugar de agua, y se definiría como la capacidad de la proteína de retener aceite. Las

proteínas promueven la absorción y retención de grasa. El mecanismo de grasa ligada a la proteína no ha sido completamente entendido, sin embargo, es de suponer que involucra a los residuos no polares de la molécula.

### ***Capacidad de espumado.***

Las espumas son sistemas coloidales en el cual pequeñas burbujas de aire son dispersas en una fase acuosa. Muchos alimentos procesados tales como crema batida, helado, pastel, merengues y malvaviscos son productos obtenidos aplicando la propiedad funcional de formación de espuma. En esos productos las proteínas son los agentes principalmente estabilizadores de la fase gaseosa dispersa.

Generalmente, las espumas se forman por burbujeo, agitación o batido de la solución de proteína. Las propiedades de espumado consideran 2 aspectos.

La habilidad de producir un área en la interfase tal que una gran cantidad de gas puede incorporarse en el líquido (comúnmente referido como espumado o capacidad de espumado).

La habilidad de formar una película determinada que pueda contrarrestar las fuerzas internas y externas.

La formación de espumas ocurre cuando las moléculas de agua tienen que rodear burbujas de aire. Las moléculas de agua son forzadas al contacto con aire relativamente no polar, tienden a ordenarse, lo que resulta en una alta tensión superficial y una alta energía en la superficie. Las proteínas disminuyen esta energía al interactuar con ambos componentes; agua y aire (*Díaz Maldonado, 2000*).

Las espumas inicialmente contienen un gran número de celdas pequeñas de aire separadas por una capa interfasial adsorbidas y de zonas de solución acuosa. Cuando la espuma transcurre, la fase acuosa se drena y las celdas de aire se acercan unas a otras, sin embargo, la presencia de la capa interfasial continua otorgando estabilidad aun después de un drenado considerable.



Durante el batido las regiones hidrofóbicas de la proteína interactúan con el aire causando el desdoblamiento y exposición de los grupos hidrofóbicos escondidos. Esto disminuye la tensión superficial, lo que permite la creación de más burbujas.

Las burbujas de gas pueden variar mucho de tamaño, oscilando de un diámetro de 1 nm a algunos centímetros, a causa de numerosos factores tales como la tensión superficial y viscosidad de la fase líquida, el aporte de energía, etc. Normalmente, una distribución uniforme de burbujas pequeñas, da al alimento suavidad y ligereza, así como un aumento de la dispersión y perceptibilidad de aromas (*McWatters y Cherry, 1977*).

Para estabilizar las espumas son tres los factores más importantes que intervienen:

- Una baja tensión entre fases.
- Una alta viscosidad de la fase líquida.
- La presencia de películas de proteínas adsorbidas resistentes y elásticas.

La proteína espumante ideal debe poseer gran superficie hidrofóbica, buena solubilidad y baja carga neta al pH del producto alimenticio. Debe ser también fácil de desnaturalizar.

Las sales pueden influenciar en la solubilidad, viscosidad, desdoblamiento y agregación de las proteínas, por lo que pueden alterar las propiedades espumantes. Esto se debe, probablemente, a un descenso de la viscosidad de la solución proteínica. Los iones  $\text{Ca}^{++}$  pueden mejorar la estabilidad al formar puentes iónicos entre los grupos carboxílicos de la proteína (*Fennema, 1996*).

La sacarosa y otros azúcares reducen la expansión de la espuma pero mejoran su estabilidad, porque aumentan la viscosidad global de las espumas. Con concentraciones mínimas de lípidos contaminantes se alteran fuertemente las propiedades espumantes de las proteínas.

### ***Estabilidad de la espuma.***

Se requieren condiciones independientes para la formación de la espuma:

La formación de una película proteínica espesa, cohesiva, elástica, continua e impermeable al aire, en torno a cada burbuja de gas.

Para la formación de estas películas estables, tiene que asociarse entre sí, en la interfase, varias capas de proteínas parcialmente desdobladas, mediante interacciones hidrofóbicas o posiblemente por interacciones de puentes de hidrogeno o electrostáticas.

La proteína debe adsorberse fuertemente en la interfase aire/agua mediante interacciones hidrofóbicas, para evitar la dispersión de la proteína y, por tanto, la pérdida de líquido.

Se necesita una flexibilidad y movilidad de las moléculas proteínicas que sea suficiente para contrarrestar las fuerzas de deformación y la extensión de la interfase.

Las proteínas deben ser capaces de emigrar de una región de tensión interfasial baja hacia otra región de tensión interfasial elevada, englobando entre ellas las moléculas de agua (*Sorgentini y Wagner, 2002*).

### **Caracterización de proteínas.**

#### ***Método Osborne y Mendel.***

El método se fundamenta en la relación estructura-solubilidad de las proteínas. Es importante notar que la mayoría de nitrógeno proveniente de proteínas es soluble en alcohol y en disoluciones alcalinas. Las globulinas, las albuminas y prolaminas son solubles en disoluciones alcalinas diluidas (*Osborne y Mendel, 1914*).

#### ***Extracción de proteínas.***

Debido a la composición en aminoácidos de la proteína, los radicales libres pueden existir en tres formas dependiendo del pH del medio: catiónicos, neutros y aniónicos. Cualquier proteína tendría una carga neta positiva si se encuentra en

un medio lo suficientemente ácido debido a que los grupos  $\text{-COOH}$  de los aminoácidos aspártico y glutámico estarían en su forma neutra pero los grupos amino de Arginina y lisina estarían protonados ( $\text{-NH}_3^+$ ). De igual forma si la proteína se encuentra en un medio con un pH muy alto estaría cargada negativamente ya que en este caso los grupos carboxilo estarían desprotonados ( $\text{-COO}^-$ ) y los grupos amino estarían en su forma neutra ( $\text{-NH}_2$ ).

De lo anterior se deduce que las proteínas tienen un pH característico al cual su carga neta es cero. A este pH se le denomina punto isoeléctrico (pI). En el punto isoeléctrico (pI), se encuentran en el equilibrio las cargas positivas y negativas por lo que la proteína presenta su máxima posibilidad para ser precipitada al disminuir su solubilidad y facilitar su agregación. Esta medida de la agregación puede visualizarse por espectrofotometría de absorción a 640 nm.

### ***Extracción alcalina.***

El fundamento aplicado es que las proteínas tienen una estructura nativa que está directamente relacionada con la interacción con los grupos del entorno en el que se encuentra. Debido a que las proteínas son sumamente sensibles a los cambios de pH, fuerza iónica, temperatura, disolventes, etc. Se pueden lograr cambios en su estructura aplicando alguna de ellas.

El método se basa en la separación de proteínas mediante un tratamiento alcalino que modifica el pH de la solución donde se encuentran contenidas dichas proteínas y de acuerdo a su punto isoeléctrico se logrará su precipitación.

El proceso de obtención supone una serie de etapas encaminadas a eliminar o disminuir los componentes no proteínicos para lograr un producto final con el 80-90% de proteína.

### ***Unión de colorantes (Método de Bradford).***

El fundamento del método está basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un

cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomassie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul (*Figura 11*). La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Experimentalmente se mide la diferencia de Absorbancias entre 595 y 465 nm (595-465nm) (*Bradford, 1976*).

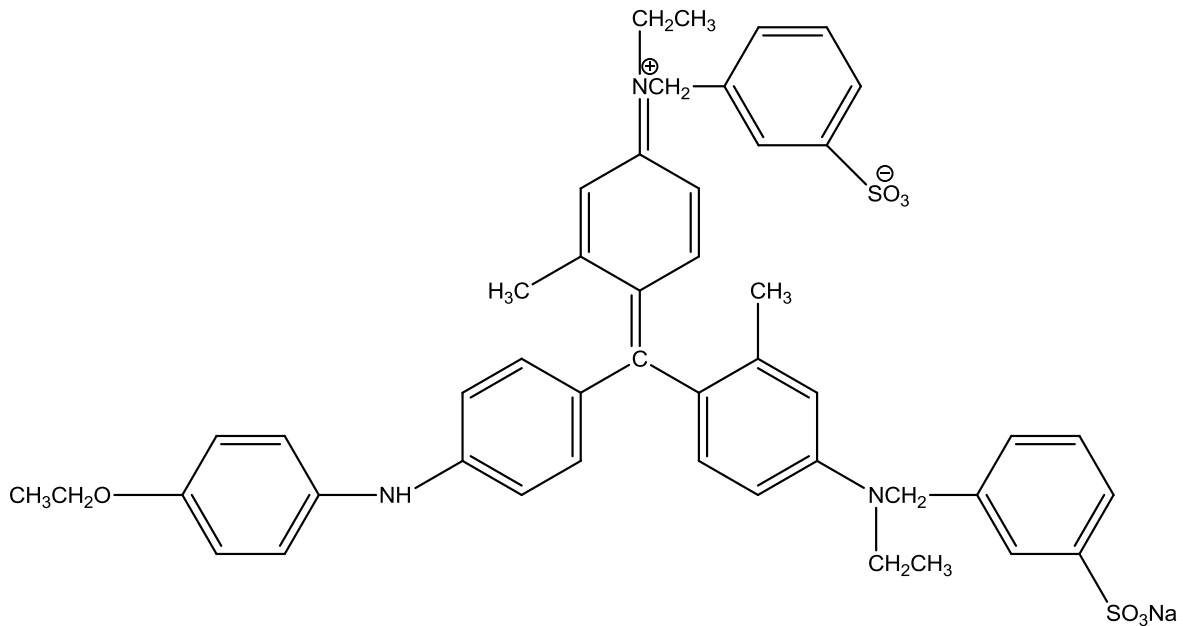


Figura 11. Estructura química del colorante Coomassie brilliant blue G-250.

Ventajas y/o desventajas del método:

- La intensidad de absorción depende del contenido de aminoácidos básicos y aromáticos.
- El complejo colorante-proteína tiene un alto coeficiente de extinción lo cual es imprescindible para aumentar la sensibilidad en la medición de proteínas.
- La unión colorante-proteína es un proceso muy rápido (2-5min) y el complejo permanece estable durante un tiempo relativamente largo, una hora. Haciendo de este un proceso muy rápido, y que no requiere un tiempo crítico para el ensayo.

- Se pueden utilizar un gran número de muestras (muy reproducible) y es adaptable a la automatización.
- Las interferencias o no existen o son mínimas por cationes tanto sodio como potasio y carbohidratos como la sacarosa. Otras sustancias que interfieren en el ensayo son los agentes fuertemente alcalinos (de fácil solución con la adición de buffers).

## METODOLOGÍA.

La figura 12 muestra el diagrama de bloques de la experimentación que se siguió.

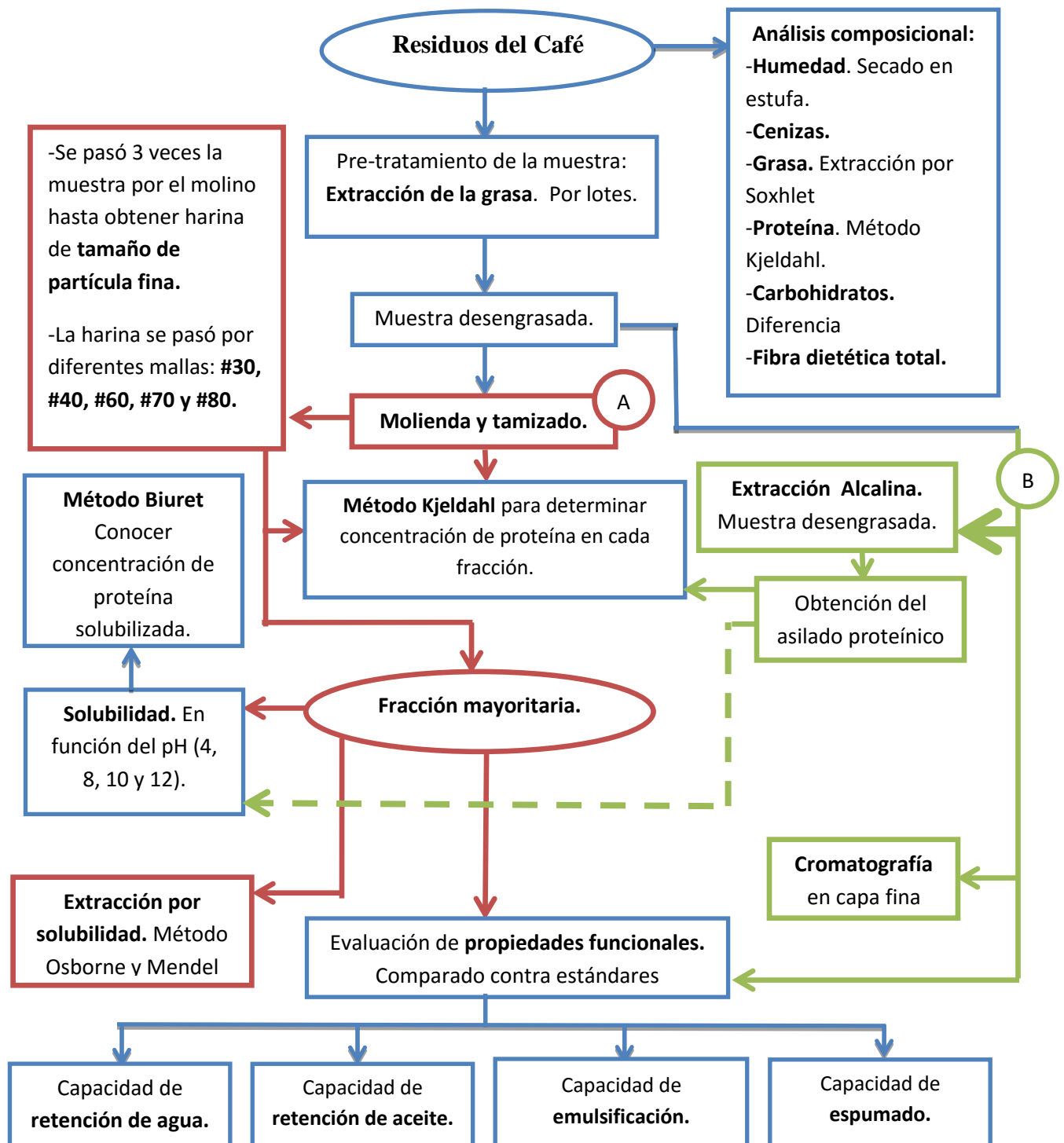


Figura 12. Diagrama de proceso de investigación realizado.

### **Análisis composicional.**

Se utilizaron residuos de café de la marca “illy” de la especie *Arabica*. A estos residuos se les realizó un análisis composicional para cuantificar la cantidad de sus componentes, llevándose a cabo las siguientes determinaciones.

- Determinación de humedad, secado en estufa (AOAC, 925.10 *Moisture in flour*).
- Determinación de cenizas, incineración en mufla (AOAC, 923.03 *Ash of flour*).
- Determinación de grasa, por Soxhlet (AOAC, 920.85 *Fat or ether extract in flour*).
- Determinación de proteína, por Kjeldahl (AOAC, 981.10 *Crude protein.*).
- Determinación de carbohidratos, el cálculo se realizó por diferencia (AOAC, 992.16 *Total dietary fiber*).

### **Pre tratamiento de la muestra.**

#### **Extracción de grasa.**

Los residuos del café se desengrasaron dos veces por el método de Lotes (Hoffman, 1989). Se usó como disolvente diclorometano durante 4 horas de extracción, se recuperó el disolvente; después la harina se dejó a temperatura ambiente para evaporar el exceso de disolvente, por aproximadamente 24 horas.

#### **Obtención del aislado proteico.**

Se probaron tres procedimientos para obtener un concentrado proteínico, por molienda y separación de fracciones, por solubilidad siguiendo el método de Osborne y Mendel y por extracción alcalina. A continuación se describirán dichos procedimientos.

##### **1. Molienda.**

Esta operación se realizó en un molino con rotor de martillo (Marca IKA®, modelo MF 10), pasando los residuos de café tres veces con el objetivo de obtener una harina con un tamaño de partícula pequeño.

### ***Tamización.***

Esta operación se hizo con el propósito de obtener una fracción rica en proteína y no solo esto, sino también que fuera una fracción mayoritaria en proporción, para ello se requirió un tamizador fijo, las mallas seleccionadas para esta operación fueron; <sup>1</sup>N° 30, N° 40, N° 60, N° 70 y N° 90.

<sup>1</sup> Cada malla es representada por un número que indica la cantidad de hilos cruzados por cada pulgada cuadrada, por ejemplo: la malla número 30 tiene 30 hilos verticales 30 hilos horizontales formando una cuadrícula por cada pulgada cuadrada (*Shigley et al., 1998*).

### ***2. Método Osborne y Mendel.***

Se realizó la extracción para proteínas con base en su solubilidad por este método, donde se preparan diferentes soluciones para extraer: Prolaminas, Gluteinas y en el residuo Escleroproteínas. Seguido de una liofilización para concentrar las proteínas y finalmente una cuantificación de nitrógeno proteínico (*Osborne y Mendel, 1914*).

### ***3. Extracción alcalina.***

En este caso la precipitación alcalina ocurre tanto por la formación de regiones con cargas iguales que tienden a repelerse sobre la superficie de la proteína, como por el rompimiento de las fuerzas de atracción que le dan la conformación a la proteína. En este caso también será necesario determinar la estabilidad a pH de la proteína deseada.

Existen varios métodos, sin embargo se utilizó la extracción alcalina con una consecuente precipitación isoeléctrica. Una descripción detallada acerca de en qué consiste esta técnica es la siguiente:

En primera instancia se solubilizaron 930g en total de la harina desengrasada en donde por cada 60g de harina se utilizó 500 mL de hidróxido de sodio 0.02N, logrando así la extracción de las proteínas. De esta manera se evita en gran parte su deterioro. Después se filtró la suspensión para remover los componentes que no hayan solubilizado (hidratos de carbono, celulosas, ligninas, etc.) Posteriormente se centrifugó para obtener el sobrenadante donde se encuentran



las proteínas y por último se ajustó el pH a 2, 3, 4, y 5 con HCl 0.5N. Esto se hace para conocer el punto isoeléctrico de la proteína, el cual se observó en el pH de 2 para nuestra porción proteínica, ya que a este pH la proteína precipitó por completo, a diferencia con los demás pH en donde la proteína se mostraba aún más soluble.

Una vez obtenido el aislado proteínico se llevó a cabo nuevamente la determinación del porcentaje de proteína presente por el método del Kjeldahl.

Se realizó el método de Kjeldahl para conocer la concentración de proteína de cada harina obtenida de las distintas mallas, la muestra desengrasada y el aislado proteínico, recibiendo el nitrógeno amoniacal en ácido bórico.

### **Caracterización proteínica.**

Una vez obtenida la fracción rica en proteína se caracterizó por medio de los siguientes parámetros.

### ***Solubilidad.***

Se evaluó la solubilidad de la fracción proteínica seleccionada para el estudio en función del pH, para lo cual, se prepararon soluciones amortiguadoras Buffer de acetatos 0.2 M pH 4 y soluciones amortiguadoras de buffer de fosfatos 0.2 M de diferentes pH (8, 10, y 12) y se prepararon soluciones al 1% (p/V) de la harina seleccionada y en la muestra seca y desengrasada.

### ***Cuantificación de proteína. Método Biuret (Nielsen, 1998).***

A las soluciones proteínicas de distintos pH (4, 8, 10 y 12) se les determinó proteína por el método Biuret para conocer la cantidad de proteína que solubilizó a los diferentes pH. La concentración de proteína se obtuvo con una curva de calibración preparada con albúmina bovina sérica con concentraciones de 1 a 10 mg/mL considerando cinco puntos.

### ***Cuantificación de proteína. Método Unión de colorantes.***

Se realizó el método de Bradford para medir esta propiedad, en donde primeramente se solubilizó 1g de Azul de Coomasie R-250 en 300 ml de Metanol,

100 mL de Ácido Acético y 650ml de Agua destilada (solución madre). De la solución madre se tomaron alícuotas de 1, 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2 mL y se aforaron en 50 mL con agua destilada. Posteriormente se obtuvo el espectro del azul de coomasie.

Una vez obtenido el espectro y la absorbancia correspondiente (590 nm), se realizó la medición en el espectro de la muestra desengrasada y de la zeína (para tener un estándar de comparación de la muestra).

Las muestra desengrasada y la zeína se prepararon a tres concentraciones diferentes; 0.5, 1 y 1.5% en la solución de 0.6mL de solución madre en 50 mL.

Posteriormente se comparó la absorbancia de la solución 0.6ml/50mL con las absorbancias de las muestras y se midió la diferencia de absorbancias, para conocer el grado en que el azul de Coomasie interactúa con las proteínas de la muestra.

#### ***Perfil de aminoácidos. Cromatografía en capa fina.***

Para realizar el perfil de aminoácidos, se utilizó la muestra seca y desengrasada y se hidrolizó la proteína empleando la metodología descrita a continuación:

- Pesar de 2-5 mg de la muestra en un vial pequeño.
- Colocar los tubos en el vial para que se lleve a cabo la hidrólisis.
- Adicionar 200  $\mu$ L de la solución HCl/Fenol (6N HCl con 1% fenol).
- Colocar el vial en el equipo PICO.TAG para generar una atmosfera inerte.
- Prender la bomba.
- Abrir la llave del gas N<sub>2</sub>.
- Colocar el vial y poner el botón verde del vial hacia adentro y ajustar a la entrada.
- Abrir la llave del vacío, contar 30 segundos y cerrar.
- Abrir la llave del N<sub>2</sub>, contar 5 segundos y cerrar.
- Repetir 3 veces.
- Colocar el botón rojo hacia adentro para cerrar el vial.

- Colocar el vial en la entrada donde se genera el calor. (Temperatura de 150°C durante una hora).
- Se saca y se coloca en la campana liberando el vacío.

### **Cromatografía en Capa Fina. Preparación de soluciones:**

- De los distintos aminoácidos y de la muestra (harina desengrasada) se preparan soluciones al 1%. 0.1 g de Aminoácido o muestra 5mL de alcohol isopropílico y lo demás de agua destilada en matraz de 10 mL.
- Solución de hidróxido amónico al 34%.
- Solución eluyente (etanol: hidróxido amónico 34% [7:3]).
- Solución reveladora (se prepara el día del uso): Ninhidrina 0.2 g en 100 de agua.
- Sobre una placa de silica gel de 20 cm se traza con lápiz una línea recta paralela a uno de los bordes y a una distancia de 2cm.
- Sobre esta línea se pone un punto por cada muestra que se colocará.
- En cada punto se colocan 10 gotas de la solución de aminoácidos y muestra (sol 1), para colocar las 10 gotas, tenemos que colocar una a una, esperando que se seque la inyección antes de inyectar la siguiente y así hasta terminar de colocar todas.
- Se añade al tanque cromatográfico eluyente hasta una altura aproximadamente 1 cm.
- Se mete la placa y se tapa y se deja eluir hasta 1 cm antes de llegar al tope. (4-6 horas)
- Se saca la placa y se deja secar dentro de la campana y se rocía con un pulverizador que contenga la solución reveladora de ninhidrina.

### **Evaluación de propiedades funcionales.**

Se evaluaron las siguientes propiedades funcionales; capacidad de retención de agua y aceite, capacidad de emulsificación y capacidad de espumado para las muestras; malla#70 (fracción mayoritaria), la muestra obtenida de la extracción

alcalina y para proteínas estándar las cuales fueron; Gluten de maíz, proteínas del suero de la leche y zeína.

**Capacidad de retención de agua (*Robertson et al, 2000*).**

Se pesó 1 g de muestra y se colocó en un tubo de centrifuga, se adicionaron 30 mL de agua destilada, se agitó y se dejó en reposo por 18 horas. Después de este tiempo se centrifugó a 3000rpm  $\times$  g por 20 min. Se decantó el sobrenadante y se pesó el residuo rehidratado, posteriormente se dejó secar y nuevamente se pesó. La capacidad de retención de agua se expresa como la cantidad de agua retenida por gramo de muestra seca. Se realizó por triplicado para la muestra y para las proteínas estándar.

**Capacidad de retención de aceite (*Robertson et al, 2000*).**

Se pesó 1 g de muestra y se colocó en un tubo de centrifuga, se adicionaron 30 mL de aceite vegetal de canola, se agitó y se dejó en reposo por 18 horas. Después de este tiempo se centrifugó a 3000rpm  $\times$  g por 20 min. Se decantó el sobrenadante y se pesó el residuo con aceite absorbido, posteriormente se dejó secar y nuevamente se pesó. La capacidad de retención de aceite se expresa como la cantidad de aceite retenido por gramo de muestra seca. Se realizó por triplicado para la muestra y para las proteínas estándar.

**Capacidad de emulsificación (*Fennema, 1996*).**

Se prepararon 20mL de solución al 1% de proteína en agua ( $V_{pi}$ ), se agitó la solución durante 2 min con el mezclador (cappuccino mixer), se le adicionaron 20mL de aceite vegetal de canola a la solución ( $V_{ai}$ ) y se agitó nuevamente por 2 min. Se vació la solución a un tubo de centrifuga graduado y se centrifugó a 2000rpm por 10min. Se colocó el tubo en una gradilla, evitando movimientos bruscos, posteriormente se midió el volumen de aceite ( $V_{af}$ ), el volumen de emulsión y el volumen de solución de proteína ( $V_{pf}$ ). De acuerdo con el volumen de solución de proteína que no formó la emulsión ( $V_{pf}$ ), se calculó la cantidad de proteína en la emulsión. Considerando el volumen de aceite utilizado, se calculó la cantidad de aceite que se encuentra en la emulsión y finalmente se calcula la capacidad de emulsificación.

**Capacidad de Emulsificación. Método espectrofotométrico (Nielsen, 1998).**

Se prepararon soluciones de la muestra seca y desengrasada, de la fracción y las proteínas estándar (al 1, 0.5 y 0.1% p/v), cada solución se agitó durante 1 minuto (cappuccino mixer), se le añadió 30 mL de aceite y se homogenizó (cappuccino mixer) hasta formar la emulsión, se tomó una alícuota (1mL) y se diluyó en agua hasta 0.1%, se agitó la solución en vortex e inmediatamente se colocó en la celda para una lectura a 500 nm.

**Capacidad de espumado (Ahmedna et al, 1999).**

Se prepararon 20 mL (Vi) de soluciones al 1% (p/v) proteína de cada una de las proteínas estándar y de la muestra en un vaso de precipitados de 100-125 mL con graduaciones de 10 mL, se batió la solución en un vaso de pp por 3 minutos usando un mezclador (cappuccino mixer) e inmediatamente se registró el volumen total, incluyendo la espuma (Vf). Se calculó la capacidad de espumado con la siguiente formula.

$$CE = \frac{\text{Vol. espuma} - \text{Vol. líquido inicial}}{\text{Vol. líquido inicial}} \times 100$$

**Estabilidad de la espuma.**

Inmediatamente después de medir el volumen de espuma, medir el volumen de líquido drenado cada 3 minutos, durante 20 min.

$$\text{Estabilidad de la espuma} = \frac{\text{Vol. inicial} - \text{Vol. drenado}}{\text{Vol. inicial}} \times 100$$

Donde: Vol. inicial = volumen de la espuma al t<sub>0</sub>

Vol. drenado= volumen de líquido drenado en cada tiempo

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se utilizaron residuos de café de la marca “illy” de la especie *Arábica*. A estos residuos se les realizó un análisis composicional para cuantificar la cantidad de sus componentes y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

### Análisis composicional.

Tabla 2. Resultados del análisis composicional de la muestra original y en base seca.

Determinación	*Base húmeda (%)	Base seca (%)
Humedad	59.40 ± 0.42	-
Cenizas	0.70 ± 0.06	1.74
Proteína	4.52 ± 0.39	11.13
Grasa	7.05 ± 0.53	17.38
FDT	23.46 ± 0.21	57.78
Carbohidratos digeribles	4.87	11.97

\*Los valores de CV para las determinaciones en muestra original menores a 3.05%.

Se observa en la tabla 2 que la fibra dietética total se encuentra en mayor proporción debido a que esta se encuentra presente en alimentos de origen vegetal, la piel plateada que cubre al grano del café es rica en fibra (alrededor del 80% de FDT del grano entero), seguido de la grasa que contiene principalmente compuestos fenólicos (ácido cafeico, felúrico, y ácido dimetoxicinámico) responsables del aroma del café que además, actúan como antioxidantes (*Iwai et al., 2004*). También contiene carbohidratos digeribles los cuales actúan en la unión del aroma, la estabilización de la espuma, aumento de sedimentación y aumento de viscosidad. (*Belitz, 1997*). Por último se encuentran las proteínas de origen insoluble que probablemente son de origen estructural.

El residuo obtenido se secó y se desengrasó. Se cuantificó nuevamente la proteína y se obtuvo **13.89% ± 0.39**, lo que hace al residuo un buen candidato como ingrediente proteínico.

## Obtención de un aislado proteínico.

### ***Método de Osborne y Mendel.***

A la muestra seca y desengrasada se le realizó el método de extracción de proteínas con base en el esquema propuesto por Osborne y Mendel en 1914, donde se fundamenta la solubilidad de las proteínas en soluciones alcohólicas y alcalinas diluidas.

En la fracción que se utilizó lo que se encuentra principalmente son proteínas insolubles, se descartó la extracción de albuminas y globulinas ya que teóricamente al ser proteínas solubles en agua estas “tuvieron que haberse solubilizado en la bebida del café” en caso de haber estado presentes en la muestra. La extracción se realizó entonces para prolaminas y gluteinas y en el residuo escleroproteínas.

- **Prolaminas:** Solución de etanol 70%-acetato de sodio 0.5%.
- **Gluteinas:** Solución de etanol 70%-acetato de sodio 0.5%-Mercaptoetanol 0.1M.

Para corroborar que las fracciones fueron extraídas exitosamente se determinó proteína por el método Kjeldahl, lo cual indicó si valía la pena o no liofilizar las soluciones. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Contenido de proteína en las soluciones para extracción.

<b>Solución</b>	<b>Contenido proteína en solución. (g proteína/100g muestra)</b>
Prolaminas	0.76 ± 0.08
Gluteinas	0.48 ± 0.09
Residuo final de la muestra (Posibles escleroproteínas)	13.66 ± 0.37

Como se puede apreciar en la tabla 3, la extracción de proteínas por el método de Osborne y Mendel resulta ser ineficiente en los residuos del café ya que la

cantidad de proteína extraída en las soluciones de prolaminas y gluteinas es muy baja, como se observa, en la solución de prolaminas solo se extrajo un 0.76% de proteína total y en la solución de gluteinas solo un 0.48% de proteína total, finalmente en los residuos de la extracción se obtuvo un **13.66%**. Podría pensarse que las proteínas presentes en el último residuo deberían ser exclusivamente escleroproteínas, lo cual no se puede asegurar debido no existe información clara acerca de la composición de las proteínas insolubles de los residuos del café.

En resumen casi toda la proteína se queda en el residuo, lo que indicó que posiblemente su composición mayoritaria sean escleroproteínas que acorde a la literatura son proteínas de origen estructural, son resistentes a la degradación de métodos químicos y enzimáticos lo cual dificulta su estudio, este método se descarta para la obtención de un “aislado proteínico”.

### ***Extracción alcalina.***

Debido a que el primer método de extracción resultó ser ineficiente se optó por realizar otro método que permitiera obtener un aislado proteínico con las características necesarias para su estudio y se empleó el método de “extracción alcalina”. A la muestra desengrasada y seca se le adicionó hidróxido de sodio con el fin de solubilizar a las proteínas en un medio alcalino. Posteriormente se filtró el sobrenadante con el fin de remover todas las partículas que no solubilizaron en el medio alcalino (Ligninas, celulosas, fibra, etc.).

Una vez obtenido el sobrenadante se aplicaron soluciones de HCL 0.5N a diferentes valores de pH (2, 3, 4 y 5) con la finalidad de conocer el punto isoeléctrico de las proteínas. Se observó que a pH 2 es donde precipitan las proteínas insolubles de los residuos del café, ya que a los demás valores de pH de (3, 4, 5) la proteína no precipitaba en su totalidad, y conforme menos ácida era la solución, menor precipitación había.

Se obtuvo una cantidad de **8.1269 g**, a este aislado se le determinó proteína por el método Kjeldhal dando un resultado de **15.46%**, lo que indica que el aislado



obtenido por este método sigue presentando un alto grado de impurezas, no puede considerarse un aislado proteico ya que para considerarlos así se debe obtener una concentración mayor a 85% de proteína, por lo que este método resultó ser ineficiente en la obtención de un “aislado proteico”.

Para conocer si el método es útil para este estudio se calculó el % de rendimiento:

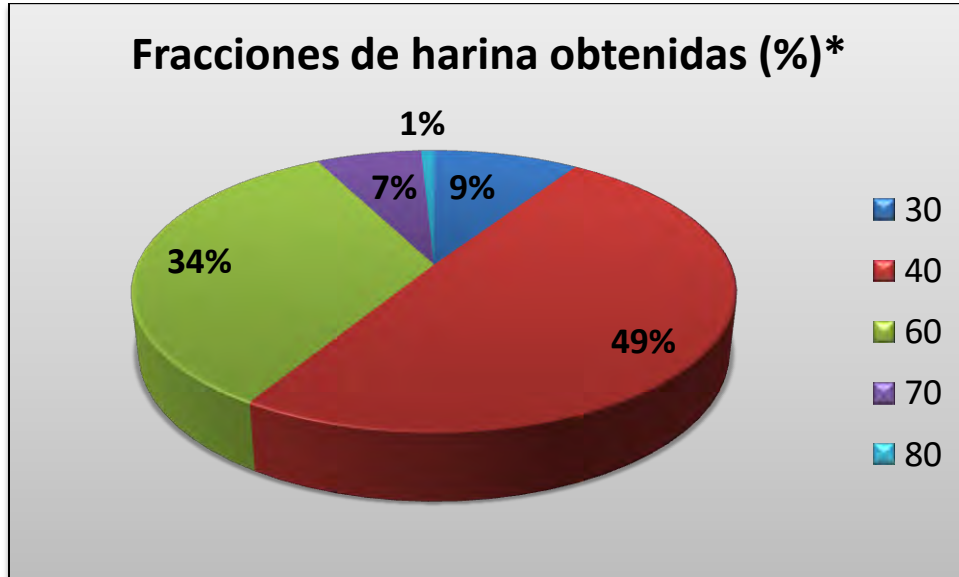
$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{8.1269\text{g}}{930 \text{ g}} \times 100 = 0.87\%$$

De acuerdo al porcentaje de rendimiento obtenido se observa que el método es de poca utilidad, no solo por la escasa cantidad de proteína extraída sino por la cantidad de residuos que se generan de NaOH, si se hace la relación que por cada 60 g de muestra se gastaron 500 mL de NaOH 0.02 N da como resultado 7800 mL de NaOH por los 930 g de muestra utilizados (8 L aproximadamente).

De igual manera se puede decir que este tratamiento no es necesario ya que la concentración de proteína obtenida por este método (15.49%) no aumentó de una forma significativa con relación a la muestra sin tratamiento (13.89%).

### ***Molienda y tamizado.***

La operación de molienda se realizó en la muestra seca y desengrasada con la finalidad de reducir el tamaño de partícula de la muestra, la cual se pasó por el molino 3 veces para que se asegurara la reducción del tamaño de partícula, a esta harina obtenida se le realizó la operación de tamizado en un tamizador fijo (con mallas; N° 40, N° 60, N° 70 y N° 90) donde la finalidad fue seleccionar una harina rica en proteínas con cualidades para evaluar posteriormente sus propiedades funcionales, los resultados se muestran en la gráfica 1.

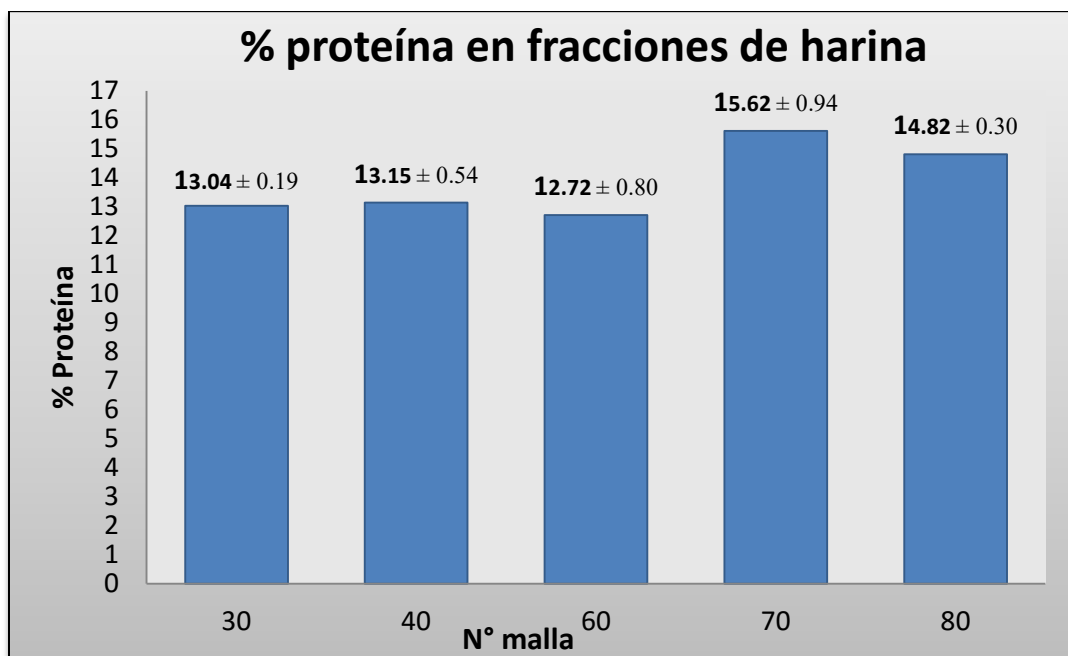


Gráfica 1. Fracciones de harina obtenidas después del tamizado.

\*Los porcentajes reportados en la gráfica 1 representan las fracciones obtenidas del molido total de la muestra seca y desengrasada.

En la gráfica 1 se aprecia la cantidad en porcentaje de las fracciones obtenidas a partir de la molienda y el tamizado en función del N° de malla realizada a la muestra seca y desengrasada. Como se observa, la fracción que está en mayor proporción es la obtenida en la malla N° 40 con un 49% del peso inicial, seguida de la fracción de la malla N° 60 con un 34%, la fracción de la malla N° 30 con un 9%, la fracción de la malla N° 70 con un 7% y al final la fracción de la malla N° 80 con 1%. Para conocer la distribución proteínica en cada una de las fracciones se realizó la cuantificación de proteínas en cada una de las fracciones obtenidas mediante una determinación de Kjeldahl, los resultados obtenidos se aprecian en la gráfica 2.x]

Gráfica 2. Porcentaje de Proteína en las fracciones de harina.



\*Los datos presentados en la gráfica presentan CV menores a 6.33%.

Como se puede observar en el gráfico 2, la harina obtenida en la malla de N° 70 es la que presenta un valor más alto en % de proteína, esto puede explicarse por la operación previa que se le dio a la muestra, pasándola por el molino, donde la fracción de la malla N° 70 tiene un tamaño de partícula más pequeña comparada con las muestras de mallas con tamaño de partícula más grande (30, 40, y 60) por esta razón la fracción de la malla N°70 expone con mayor facilidad a las proteínas.

La reducción de tamaño es aquella operación en la que el tamaño medio de los alimentos sólidos es reducido por la aplicación de fuerzas de impacto, compresión o abrasión, la cantidad de energía absorbida por un alimento antes de romperse se halla determinada por su grado de dureza y su tendencia a la rotura que depende a su vez de su estructura. El tamizado es un método de separación de partículas que se basa solamente en la diferencia de tamaño. En el tamizado industrial se vierten los sólidos sobre una superficie perforada o tamiz, que deja pasar las partículas pequeñas, o “finos”, y retiene las de tamaños superiores. Un tamiz puede efectuar solamente una separación en dos fracciones (*Peters, 1999*).

No existe información sobre el comportamiento de las proteínas insolubles de los residuos del café, no podría explicarse a ciencia cierta el comportamiento que se presentó en la distribución de éstas en las fracciones, el comportamiento que se observa es que en la malla N°70 las proteínas se distribuyen en mayor concentración ya que posiblemente en esta fracción la acción mecánica sobre la muestra expuso tanto las proteínas como los restos laterales (aminoácidos) de la muestra en una mayor concentración.

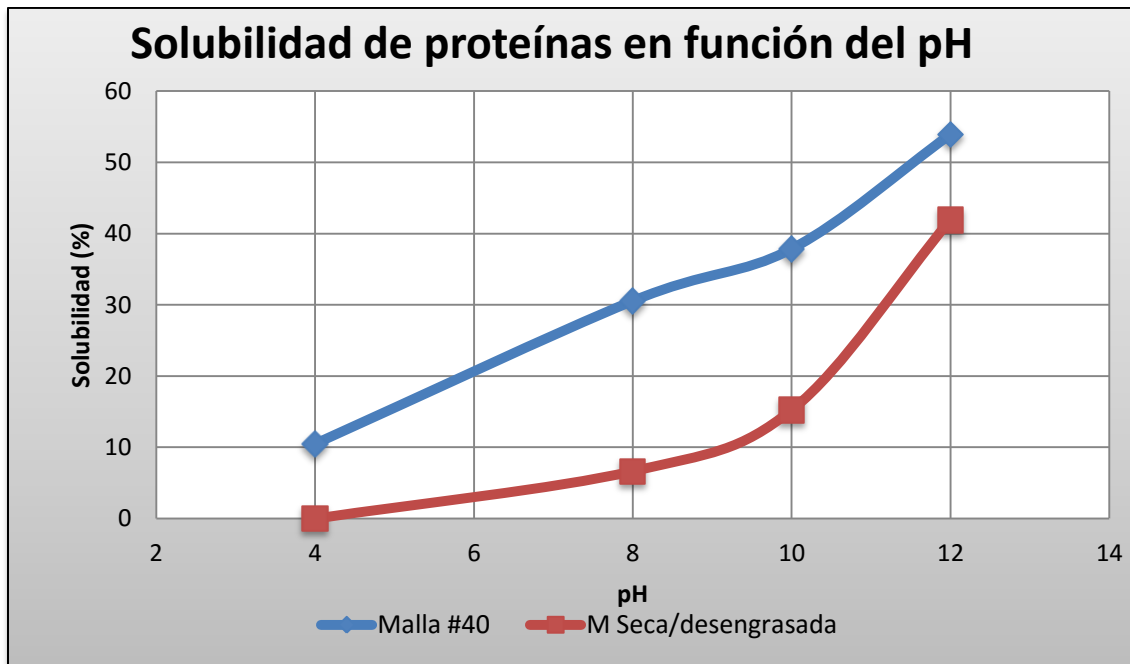
### **Caracterización.**

Los métodos de caracterización de proteínas se realizaron con la finalidad de conocer a grandes rasgos la posible estructura y el comportamiento de las proteínas de los residuos de café.

### ***Solubilidad.***

La solubilidad se evaluó con la finalidad de conocer la influencia del pH en la capacidad de solubilizar proteínas, se midió la concentración de las proteínas solubilizada a diferentes pH y se analizó la tendencia.

A las fracciones seleccionadas evaluó la solubilidad en función del pH con el fin de conocer a que valor de pH la cantidad de proteína solubiliza mejor y se les midió proteína soluble por el método Biuret. Este mismo tratamiento se realizó a la muestra seca y desengrasada.



Gráfica 3. Solubilidad de proteína en las muestras en función del pH.

En la gráfica 3 se muestra el efecto del pH en la solubilidad de las proteínas en las dos muestras. Conforme el pH aumenta (básico) las proteínas se alejan de su punto isoeléctrico y se vuelven más solubles en las soluciones donde se observa el comportamiento lineal decreciente en cuanto al contenido de proteína solubilizado (%). Conforme aumenta el pH las proteínas se solubilizan en mayor cantidad lo que indica que las proteínas de esta fracción de los residuos del café requieren de un medio alcalino para solubilizarse. Si la proteína se encuentra en un medio con un pH muy alto estaría cargada negativamente ya que en este caso los grupos carboxilo estarían desprotonados ( $-\text{COO}^-$ ) y los grupos amino estarían en su forma neutra ( $-\text{NH}_2$ ).

De igual manera puede observarse que la fracción de la malla #40 solubiliza en mayor cantidad sus proteínas conforme aumenta el pH, aunque presenta el mismo comportamiento que la muestra seca y desengrasada, las solubiliza en mayor cantidad.

Para conocer si existe diferencia significativa en el grado de solubilización de las muestras se realizó una ANOVA (*Tabla 4*).

Tabla 4. Valores de F obtenidos a partir del análisis de varianza ANOVA con un  $\alpha=5\%$ .

<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
1.789963959	5.987377584

Como F calculada es menos a F crítica no existe diferencia significativa en el porcentaje de solubilización en medio alcalino entre la fracción de malla N°40 y la muestra seca y desengrasada, por lo que se pueden utilizar ambas para medir solubilidad en medio alcalino.

La estructura que adopta una proteína en presencia del disolvente acuoso es la que le permite llevar a cabo su función y se denomina estructura nativa. Cualquier alteración de la estructura nativa que modifique su interacción con el disolvente y que provoque su precipitación dará lugar a una estructura desnaturalizada. Se llama desnaturalización de las proteínas a la pérdida total o parcial de las estructuras de orden superior (secundaria, terciaria o cuaternaria), quedando la cadena polipeptídica reducida a un polímero sin una estructura tridimensional fija, pero que conserva la estructura primaria. (*Lehninger, 2006*)

Los agentes que provocan la desnaturalización de una proteína se llaman agentes desnaturalizantes. Se distinguen:

- Agentes físicos (calor y las radiaciones ionizantes)
- Agentes químicos (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica)

En este caso se ve el efecto de un agente químico (pH) sobre la solubilidad de las proteínas. Los iones  $H^+$  y  $OH^-$  del agua provocan efectos parecidos, pero además de afectar a la envoltura acuosa de las proteínas también afectan a la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y a menudo provoca su precipitación. La solubilidad de una proteína es mínima en su punto

isoeléctrico, ya que su carga neta es cero y desaparece cualquier fuerza de repulsión electrostática que pudiera dificultar la formación de agregados.

Cuando el pH es bajo, los grupos ionizables están protonados, y la carga neta de la proteína es de signo positivo. Cuando el pH es alto, los grupos ionizables están desprotonados, y la carga neta es de signo negativo. Entre ambas zonas, habrá un pH en el que la carga neta de la proteína es nula y se denomina punto isoeléctrico (pI), y es característico de cada proteína. Por tanto:

Cuando el pH del medio es igual al pI, la solubilidad de una proteína es mínima ya que, al no haber carga neta, desaparecen las repulsiones electrostáticas que podrían impedir la agregación y precipitación de las moléculas de proteína. Entonces con esto se puede decir que las proteínas de los residuos del café están alejadas de su punto isoeléctricas a pH alcalino, por lo tanto su solubilidad aumenta.

### ***Cromatografía en capa fina.***

Esta técnica se realizó con la finalidad de conocer la posible composición de aminoácidos que conforman la estructura de las proteínas de los residuos de café.

La técnica es muy sensible y selectiva específicamente para aminoácidos, por lo que es ideal para detectar concentraciones bajas de aminoácidos, utilizándose para revelar su presencia en cromatogramas y fracciones procedentes de otras técnicas de separación. La presencia de aldehídos resultantes de la degradación de la ninhidrina por reacción con los aminoácidos modifica, bajo ciertas condiciones, el color formado, lo que sirve para identificar el tipo de aminoácido. (*Bermúdez et al, 2011*)

Para la realización del perfil de aminoácidos, se utilizó la muestra seca y desengrasada comparada con 10 aminoácidos estándares, (soluciones al 1%), utilizando como eluyente una solución de etanol: hidróxido amónico 34% [7:3] y como revelador (Ninhidrina 0.2%), los resultados obtenidos de la cromatoplaque se observan en la *figura 13*.

Actualmente, no se dispone de mucha información sobre el contenido de proteínas ni la composición de aminoácidos en los residuos del café, se piensa que este contenido debe ser bajo, ya que al desnaturalizarse las proteínas, su solubilidad disminuye (*Belitz, 1997*).

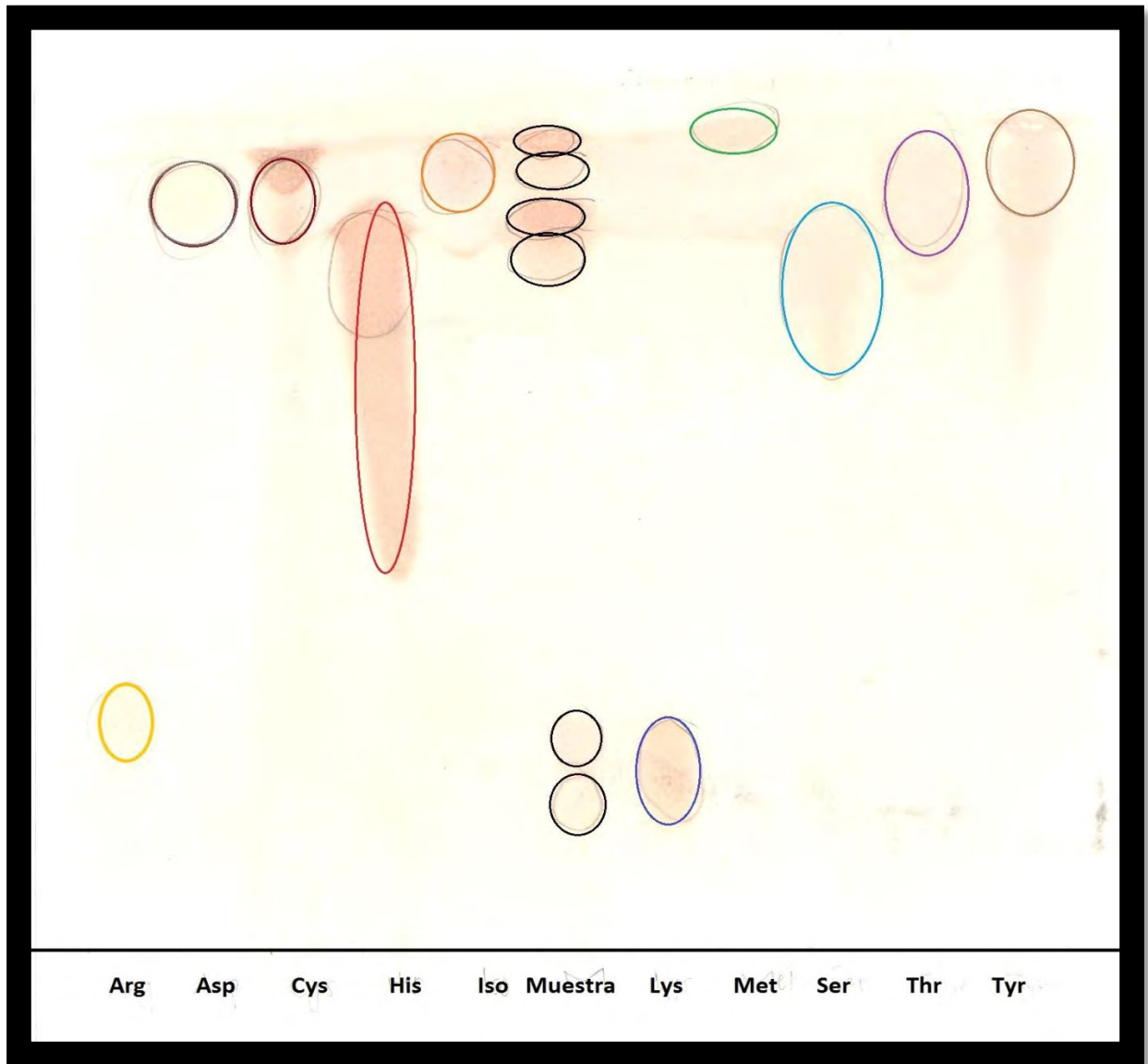


Figura 13. Cromatoplaqueta del perfil de aminoácidos. Arg-Arginina, Asp-Ácido aspártico, Cys-Cisteína, His-Histidina, Iso-Isoleucina, Lys-Lisina, Met-Metionina, Ser-Serina, Thr-Treonina, Tyr-Tirosina. Solución eluyente etanol: hidróxido amónico 34% [7:3] y como revelador (Ninhidrina 0.2%)



Los métodos colorimétricos de determinación de aminoácidos se basan en la reacción específica de éstos con determinados compuestos, dando derivados coloridos. La formación de color se toma como resultado positivo e indica su presencia, mientras que el no desarrollo de color es indicativo de que no está presente. En el presente trabajo solo se llevó a cabo la determinación cualitativa de aminoácidos (ausencia o presencia de dichos compuestos).

Posteriormente se calculó el Rf de la cromatoplaca con el objetivo de identificarlos y poder compararlos con los aminoácidos estándar que se aplicaron, los resultados se muestran en la tabla 5, esta información se utilizó para comprender más a fondo el comportamiento de las proteínas insolubles.

Tabla 5. Análisis de aminoácidos en CCF en un sistema (etanol: hidróxido amónico 34% [7:3]).

N° de carril (izquierda a derecha)	Muestra	Rf
1	Arginina	0.26
2	Asparagina	0.86
3	Cisteína	0.89
4	Histidina	0.83
5	Isoleucina	0.90
6	<i>Muestra seca y desengrasada</i>	0.18, 0.25, 0.80, 0.86, 0.89, 0.92
7	Lisina	0.20
8	Metionina	0.93
9	Serina	0.78
10	Treonina	0.86
11	Tirosina	0.92

Los principales aminoácidos presentes en el grano del café son arginina, ácido aspártico, histidina y cisteína, en menor cantidad también están presentes alanina, arginina, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, lisina, prolina, serina, tirosina,

treonina y valina, su presencia tiende a disminuir durante la maduración y ejercen un papel importante en la formación de compuestos aromáticos durante el tostado. Además en dicho proceso, se produce una degradación proteínica que depende del grado del tueste y que da lugar a fracciones de menor peso molecular por lo cual algunos de estos aminoácidos llegan a desaparecer en dicho proceso (*González et al, 2007*).

Con base en la solubilidad en agua de los aminoácidos se espera encontrar mayoritariamente aminoácidos de carácter insoluble, en este caso se identificó la posible presencia de tirosina, metionina e isoleucina.

Por otra parte se encontró la posible presencia de aminoácidos hidrófilos los cuales no se pueden identificar con certeza ya que no se están evaluando los 20 aminoácidos.

En la tabla 5 se puede observar que la muestra presenta 6 marcas características de aminoácidos, comparando los registros que presentó la muestra seca y desengrasada, puede observarse que coincide con algunos de los estándares. Primeramente se observó el registro en 0.18 el cuál se acercó al registro de la lisina que fue de 0.20 y con ayuda del color similar que presentaron ambos se relacionan, en segundo lugar se observó un registro en 0.25 el cuál se acercó al registro de la arginina en 0.26 y se confirmó con el color obtenido en ambas aplicaciones, en tercer lugar se observó un registro en 0.80 el cuál no coincide con alguno de los aminoácidos presentes, ya que el registro más parecido fue el de la serina 0.78, pero se comparó con el color y el arrastre y no coinciden por lo cual se descartó que fuera serina, en cuarto lugar se observó un registro en 0.86 el cual coincidió con el registro del ácido aspártico y la treonina, se comparó el color y se le relacionó con la treonina, en quinto lugar se observó el registro en 0.89 el cuál nuevamente coincide con dos aminoácidos, con cisteína en 0.89 e isoleucina en 0.90, el parámetro para medir esta vez fue el color ya que coincide con isoleucina aunque no se descartó del todo la presencia de la cisteína ya que pudo sobreponerse en la muestra, por último se observa el registro en 0.92 que se relacionó con el registro de la tirosina apreciada en igual registro y color.

Con la información anterior se pudo conocer cualitativamente la presencia de algunos de estos aminoácidos, se detectaron aminoácidos como lisina, arginina, treonina, isoleucina tirosina y la posible presencia de cisteína, estos aminoácidos coinciden con lo que cita la literatura a excepción de la tirosina, que logró ser detectada en los análisis realizados. Por otro lado surgió un punto colorido que no coincidió con ninguno de los estándares abriendo la posibilidad a que sea alguno de los aminoácidos citados en la literatura pero que no se analizaron en este sistema.

Además cabe señalar que por esta misma razón podrían estar presentes otros aminoácidos citados en la literatura y que no se analizaron, que se acerquen entre sí en cuanto a Rf que podrían estar sobrepuestos con los que sí fueron analizados.

### ***Unión de colorantes.***

Se realizó el método de Bradford para comprobar la posible existencia de aminoácidos básicos y aromáticos en las proteínas de los residuos del café. En la figura 14 se observa el espectro de absorción del azul de Coomassie con la proteína.

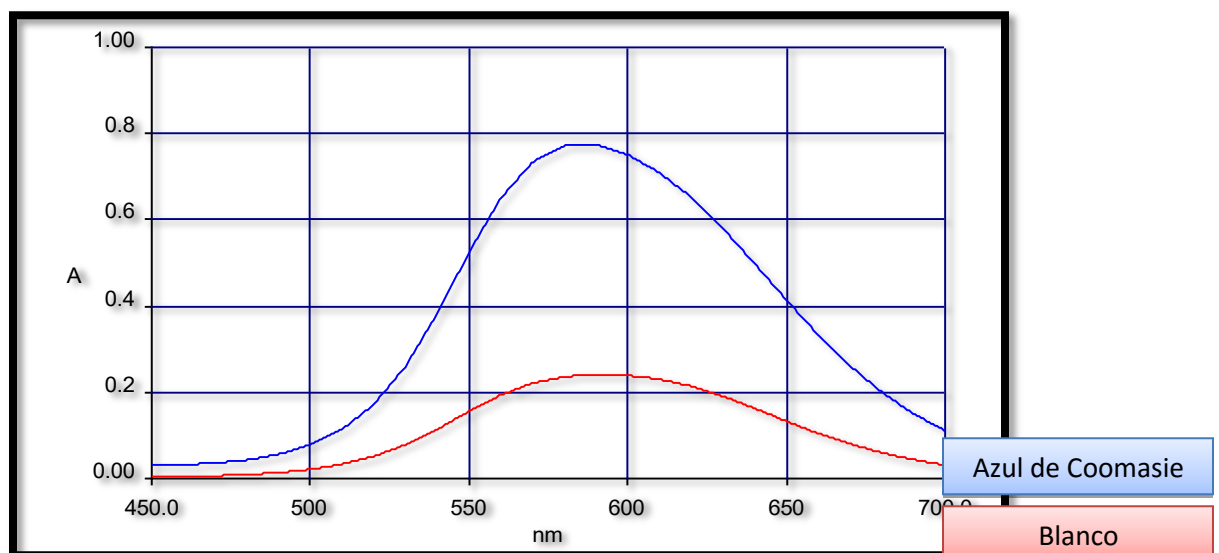
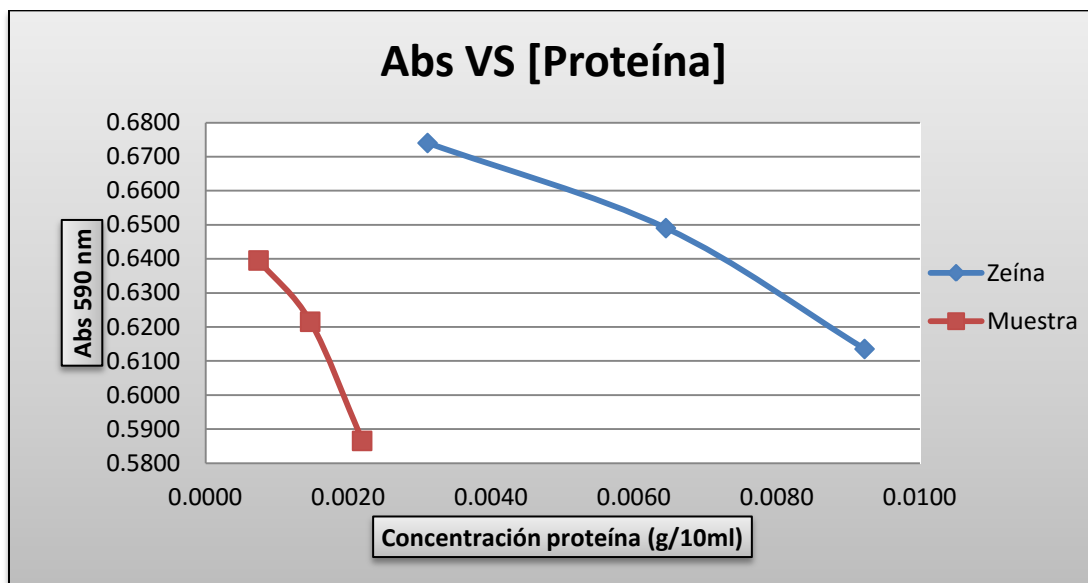


Figura 14. Espectro del azul de coomasie, obtenido de una solución de azul de coomasie 0.6mL de la proteína en 50 mL.

Se prepararon soluciones de zeína (proteína estándar) y de la muestra seca y desengrasada a diferentes concentraciones (0.5, 1 y 1.5% p/v), posteriormente se midieron absorbancias para conocer la concentración de aminoácidos básicos y aromáticos. Se realizó por triplicado y se midieron las diferencias de absorbancias.



Grafica 4. Curva patrón de zeína y muestra.

En la gráfica 4 se puede observar que conforme se aumentó la concentración de proteína en la zeína y en la muestra seca y desengrasada, la absorbancia disminuye, esto quiere decir que conforme se aumenta la concentración hay una mayor cantidad de proteína presente que interactúa con el colorante azul de Coomassie, lo cual fue lo esperado en las lecturas de absorbancia, ya que se forma el complejo proteína-colorante en un tiempo de entre 2 y 5 minutos, y el complejo es relativamente estable al permanecer así alrededor de una hora, por lo que los resultados fueron confiables y reproducibles.

En la gráfica 4 también se observa que la muestra seca y desengrasada aunque presenta un % de proteína menor al de la zeína, las proteínas de la muestra seca y desengrasada formaron en mayor cantidad complejos con el colorante, esto reflejado en las absorbancias que presentan ambas muestras, la zeína presentó absorbancias más altas que la muestra lo que quiere decir que esta proteína interacciona en menor cantidad con el colorante azul de Coomassie por ausencia

de aminoácidos básicos y aromáticos en su estructura. Por lo que se comprende de mejor manera el comportamiento de las proteínas insolubles del café, ya que este colorante forma complejos con aminoácidos aromáticos y básicos (especialmente arginina), este tipo de aminoácidos está presente en la estructura de dichas proteínas.

De acuerdo a las pruebas realizadas para la caracterización de las proteínas de los residuos del café (cromatografía en capa fina, solubilidad y Bradford) se observó que los resultados pueden relacionarse entre sí.

En los resultados obtenidos de solubilidad se observó que las proteínas de los residuos del café solubilizan a valores básicos de pH lo que indica que se encuentran cargadas negativamente, esto se complementa con los resultados obtenidos en el método de Bradford que tiene como fundamento la medición del cambio de coloración del azul de Coomasie en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas con aminoácidos básicos y aromáticos, en el experimento se observó que la muestra seca y desengrasada contiene aminoácidos de perfil básico y aromático. De acuerdo a lo reportado en la literatura se puede concluir que posiblemente las proteínas de los residuos del café contienen los siguientes aminoácidos: arginina, lisina, histidina, fenilalanina y tirosina.

### **Evaluación de propiedades funcionales.**

La “funcionalidad” de las proteínas alimentarias se define como “aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de las proteínas de los sistemas alimenticios durante el procesado, el almacenamiento, la preparación y el consumo. Aunque no solo las proteínas otorgan propiedades funcionales, si juegan un papel mayoritario en cuanto a las propiedades funcionales de los sistemas alimenticios (Wijeratne, 2005).

### ***Selección de la muestra para evaluar propiedades funcionales.***

Para seleccionar la fracción a utilizar para evaluar las propiedades funcionales se consideraron dos aspectos, la fracción mayoritaria obtenida y la fracción más rica en proteína, la fracción de la malla N° 40 resultó en mayor proporción, aunque no fue la más rica en proteína. La fracción más rica en proteína resultó ser la de la malla N° 70, por este motivo se decidió a utilizar las dos fracciones para la evaluación de propiedades funcionales.

Para evaluar las propiedades funcionales no solo se utilizaron las fracciones proteínicas de las mallas N°40 y N°70, sino también se utilizó la muestra seca y desengrasada sin pasarse por el molino, esta muestra fue seleccionada fundamentada en que los métodos de extracción de proteínas fueron poco útiles para obtener un aislado proteico que sirviera de estudio. La comparación de estas muestras tuvo la finalidad de conocer si habría diferencia significativa en estas propiedades y conocer si son útiles y necesarias operaciones como la molienda y tamizado en la muestra. Las propiedades a evaluar fueron; capacidad de retención de agua y aceite, capacidad de emulsificación y capacidad de espumado.

### ***Capacidad de retención de agua.***

La capacidad de retención de agua se determinó para la fracción de la malla N° 40, N° 70, muestra seca y desengrasada y para las proteínas estándar (Gluten, Proteínas del suero de la leche, y zeína) mediante el método de *Robertson et al*, 2000. La capacidad de retención de agua se calculó como la cantidad de agua que se absorbe por gramo de proteína. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Capacidad de retención de agua.

<b>Muestra</b>	<b>CRA (agua absorbida/g muestra)</b>	<b>CRA (agua absorbida/g proteína)</b>
Malla N°40 ( <b>13.15%</b> proteína)	2.78 ± 0.17	21.17 ± 1.36
Malla N°70 ( <b>15.62%</b> proteína)	2.68 ± 0.14	17.21 ± 0.95
Muestra seca y desengrasada ( <b>14.52%</b> proteína)	3.36 ± 0.27	23.16 ± 1.88
Gluten de maíz ( <b>70.97%</b> proteína)	2.32 ± 0.05	3.28 ± 0.08
Zeína ( <b>61%</b> proteína)	2.12 ± 0.11	3.48 ± 0.19
Suero de leche ( <b>90%</b> proteína)	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01

\* Los resultados de capacidad de retención de agua, valores de CV menores a 6.46%.

El término "agua ligada" incluye tanto el agua de constitución como el agua de interfase próxima a las proteínas y el resto de las fracciones se consideran "agua inmovilizada" (en la superficie de las proteínas, en buena medida fijada a sus cargas) (*Flores y Bermell, 1984*). Solamente tratamientos muy severos (deshidratación a altas temperaturas) afectan al agua ligada.

Por tanto en este método se mide tanto el agua ligada (agua de hidratación, no congelable) como el agua capilar, retenida físicamente entre las moléculas proteicas. La concentración proteica, el pH, la temperatura, el tiempo, la fuerza iónica y la presencia de otros componentes afectan a las fuerzas que toman parte en las interacciones proteína-proteína y proteína-agua.

Se observan en la tabla 6 los valores de CRA por gramo de muestra y por gramo de proteína, en cuanto a la CRA por gramo de muestra, se observan valores muy similares para las fracciones seleccionadas y para los estándares. Sin olvidar que estos valores no son solo de absorción de la proteína, sino la muestra de los residuos del café que aún tiene otros componentes en su estructura que pueden intervenir en los resultados como la fibra que tiende a retener agua, así como también los estándares no se encuentran al 100% de pureza, no es la cantidad

real de absorción de agua debido a que se está hablando de una retención por gramo de muestra, por eso se realizó la conversión a cantidad de agua retenida por gramo de proteína para todas las muestras con fines comparativos.

La muestra seca y desengrasada presentan una mayor cantidad de absorción de agua por gramo de proteína (23.16) en comparación de todas las muestras, mientras que en las fracciones obtenidas de la malla N° 40 y 70 se presenta una CRA de 21.17 y de 17.21 respectivamente, la tendencia muestra que el proceso de molienda afecta negativamente a la CRA debido a que posiblemente la cantidad de cadenas polares laterales de las proteínas del café tienden a perderse durante la molienda y posiblemente la pérdida de fibra por el mismo proceso disminuyendo así la CRA de ambas fracciones.

Los estándares seleccionados (zeína y gluten) son insolubles en agua, se manifiesta su poca solubilidad ya que tienden a retener el agua en menor cantidad, en la muestra problema las proteínas que se presentan tienden a retener más agua por la posible presencia de otros componentes.

Se realizó un análisis de varianza para los resultados de CRA (agua absorbida/g proteína) de las diferentes muestras, de acuerdo a lo reportado en la tabla 7 se observa que no hay diferencia significativa en valores de CRA

Tabla 7. Valores de F obtenidos a partir del ANOVA, con un  $\alpha=5\%$ .

<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
3.58	4.84

No hay que olvidar que en la fracción de los residuos del café también se encuentra en gran cantidad fibra que podría intervenir positivamente en la retención de agua, de tal forma que al transformar la CRA por gramo de proteína se ve un incremento importante en este parámetro, que no podría ser atribuido solo a las proteínas presentes en los residuos del café. Para el caso de las proteínas de suero de leche, éstas presentan una capacidad de retención de agua



muy baja, debido a que se solubilizaron casi por completo en el agua reteniendo una cantidad muy baja.

**Capacidad de retención de aceite.**

La capacidad de retención de aceite se determinó para la fracción de la malla N° 40, N° 70, muestra seca y desengrasada y para las proteínas estándar (Gluten, Proteínas del suero de la leche, y zeína) mediante el método de *Robertson et al*, 2000. La capacidad de aceite se determinó como la cantidad de aceite que se absorbe por gramo de proteína. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Capacidad de retención de aceite.

<b>Muestra</b>	<b>CRAA (aceite absorbido/g muestra)</b>	<b>CRAA (aceite absorbido/g proteína)</b>
Malla N°40 ( <b>13.15%</b> proteína)	2.35 ± 0.05	17.94 ± 0.44
Malla N°70 ( <b>15.62%</b> proteína)	2.70 ± 0.05	17.29 ± 0.33
Muestra seca y desengrasada ( <b>14.52%</b> proteína)	2.63 ± 0.20	18.13 ± 1.40
Gluten de maíz ( <b>70.97%</b> proteína)	2.26 ± 0.03	3.19 ± 0.04
Zeína ( <b>61%</b> proteína)	2.04 ± 0.01	3.34 ± 0.02
Suero de leche ( <b>90%</b> proteína)	2.54 ± 0.10	2.84 ± 0.11

\*Los resultados presentan CV menores a 4.04%.

La capacidad de retención de aceite se define como la cantidad de aceite que permanece unido a la proteína después de la aplicación de una fuerza externa (centrifugación) (*McWatters y Cherry*, 1977).

Los resultados que se observaron en cuanto a CRAA se aprecian en la tabla 9 donde los valores presentados de absorción de aceite entre las muestras

seleccionadas y los estándares son muy parecidos, sin embargo, los valores medidos se observaron valores más altos para las muestras comparados contra los estándares, se realizó un análisis de varianza para conocer si existe diferencia significativa entre estos valores.

Tabla 9. Valores de F obtenidos a partir del ANOVA con un  $\alpha=5\%$ .

<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
4.26	4.96

Los valores de F en la tabla 9 muestran que no existe diferencia significativa en los valores de capacidad de retención de aceite por gramo de proteína.

Se observa que en la muestra seca y desengrasada, los valores de capacidad de retención de aceite son más altos comparado con todas las muestras, lo que demuestra que posiblemente el proceso de molienda afecta positivamente la CRAA, también se puede apreciar en la tabla 8 que la capacidad de retención de aceite de la fracción de la malla N° 40 y 70 fue mayor a la de las proteínas estándares, esto está directamente relacionado con el carácter hidrofóbico de las proteínas debido a que la CRAA está relacionada con la cantidad de aminoácidos no polares en las cadenas laterales de la proteína. Posiblemente la operación de molienda expuso los restos hidrófobos de las proteínas presentes en la muestra, este proceso facilita la interacción con el aceite.

Con base en los resultados obtenidos de CRA y CRAA y a los análisis de datos se puede concluir que no es necesario realizar tratamientos como “molienda” a los residuos del café, lo que no solo lo hace más sencillo de manejar, sino que además más rentable en cuanto a tiempo y costos, a excepción que se requiera utilizar el ingrediente en presentación de harina ya que los valores de CRA y CRAA no son diferentes a los de la muestra no sometida a molienda.

Se puede observar que el residuo de la producción de café (borra) presentan valores semejantes a otros ingredientes como zeína y gluten que son utilizados

muy comúnmente en la industria de frituras, con base al contenido de proteína presenta valores altos en la retención de agua y aceite en comparación de los estándares, por lo cual se considera que pueden ser utilizados como ingredientes en la industria alimentaria, en la industria de cereales y de frituras primordialmente, también podría ser de gran utilidad para algún tipo de alimento emulsionado, para ello se preferiría obtener un aislado o concentrado proteínico de estos residuos para una mayor eficiencia.

**Capacidad de emulsificación (Chau et al, 1997).**

La capacidad de emulsificación se determinó mediante el método de *Chau et al, 1997*. Se prepararon soluciones al (1%, 0.5% y 0.1%) de las fracciones seleccionadas, la muestra seca y desengrasada y de las proteínas estándar, los valores de CE se calculan a partir de la fórmula:

$$\text{Capacidad de emulsificación} = \frac{\text{mL de aceite emulsificado}}{\text{mg de proteína emulsificada}}$$

Donde: mL de aceite emulsificado = (Vai – Vaf)

mg proteína emulsificada = (Vpi – Vpf)\*Conc de proteína en solución

La capacidad de emulsificación se define como el volumen de aceite que puede ser emulsificado por cada gramo de proteína.

Las proteínas se adsorben en la interfase entre las gotas de aceite disperso y la fase acuosa continua, y aportan propiedades físicas y reológicas (viscosidad, elasticidad, rigidez, etc) que determinan la resistencia de las gotitas a la coalescencia (*Damodaran, 1997*).

Las proteínas tienen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas dependiendo de su secuencia de aminoácidos, durante la emulsificación, la interfase aceite-agua se vuelve disponible y las moléculas de la interfase se desdoblán y es ahí cuando la región hidrofóbica se asocia con la fase oleosa (aceite vegetal) y la fase hidrofílica se asocia con la fase acuosa (agua). Es por esta razón que las proteínas insolubles de los residuos del café tendrán un comportamiento que tienda a asociarse más con la fase oleosa, por su hidrofobicidad como se observa en la tabla 11, la CE de la zeína y del gluten es mayor a la que presentan las proteínas del suero de la leche debido a que el suero de leche tiende a asociarse más a la fase acuosa, ya que es soluble en agua (hidrofílica), la tendencia es la misma para las tres concentraciones empleadas (1, 0.5 y 0.1%). En cuanto a las proteínas de los residuos del café de la fracción de la malla N° 40, N° 70 y la muestra seca y desengrasada se puede observar que éstas proteínas presentan una CE mayor a las proteínas estándar para todos los casos, esto es lo que se esperaba ya que las proteínas presentes en la muestra son de carácter insolubles y requieren para su ionización pH alcalino para solubilizar, así tienden a asociarse con la fase acuosa en mayor cantidad a pH neutro, esto quiere decir que emulsionan una mayor cantidad de aceite, y de igual manera como ya se había mencionado anteriormente, el comportamiento de la muestra seca y desengrasada en esta propiedad resultó tener la misma tendencia y comportamiento, el cuál fue que a la muestra seca y desengrasada no fue sometida a molienda y presentó mejores valores de capacidad de emulsificación que las muestras de la fracción que si fueron sometidas a molienda, esto se explicó anteriormente debido a que los residuos hidrofóbicos de las proteínas posiblemente se pierden al ser sometidos al proceso de molienda, aunque el análisis de varianza mostró que no existe diferencia significativa.

Tabla 10. Capacidad de emulsificación con solución al 1%, 0.5% y 0.1%.

<b>Muestra</b>	<b>CE (g aceite emulsionado/ g proteína) 1%</b>	<b>CE (g aceite emulsionado/ g proteína) 0.5%</b>	<b>CE (g aceite emulsionado/ g proteína) 0.1%</b>
Malla N°40 ( <b>13.15%</b> proteína)	6.19 ± 0.27	8.77 ± 0.23	42.85 ± 0.85
Malla N°70 ( <b>15.62%</b> proteína)	1.93 ± 0.07	3.69 ± 0.18	103.71 ± 4.96
Muestra seca y desengrasada ( <b>14.52%</b> proteína)	4.18 ± 0.08	10.63 ± 3.45	116.13 ± 10.20
Gluten de maíz ( <b>70.97%</b> proteína)	2.56 ± 0.05	4.81 ± 0.06	21.48 ± 2.36
Zeína ( <b>61%</b> proteína)	3.04 ± 0.02	2.93 ± 0.03	14.44 ± 1.34
Suero de leche ( <b>90%</b> proteína)	2.09 ± 0.02	1.36 ± 0.01	6.55 ± 0.53

Otro comportamiento que se observó es que a medida que la concentración de las soluciones proteínicas disminuye, la capacidad de emulsificación aumenta, esto podría deberse a que hay una saturación a mayores cantidades de muestra empleada, y las proteínas en exceso no logran asociarse en ninguna de las fases. Al estar en menor concentración como se observa en la tabla 10, las proteínas podrían estar más disponibles, tal cantidad que permite una gran interacción con las fases permitiendo que las proteínas en la muestra estén más disponibles e interaccionen en gran cantidad con la fase oleosa debido a su hidrofobicidad y condiciones alcalinas de solubilización.

### **Capacidad de emulsificación (Kinsella, 1976).**

La capacidad de la proteína a estabilizar emulsiones se relaciona con la interfase que puede estar recubierto por la proteína. Para la dispersión de la luz, existe una relación simple entre la turbidez y la interfase de una emulsión. La turbidez se evaluó como un método para medición de las propiedades emulsionantes de las proteínas. Las emulsiones se hicieron por homogeneización de cantidades conocidas de proteínas (1, 0.5 y 0.1%) y aceite. Varios factores intervienen en la capacidad de emulsificación, como el grado de homogeneización, el tipo de homogeneizador, la concentración de proteína, volumen de dispersión, la fracción de volumen de aceite, pH y el tipo de formación de la emulsión de aceite afectado. La relativa actividad emulsionante de las distintas proteínas alimentarias (gluten, zeína, suero de leche) se determinó utilizando una fórmula sencilla basada en la turbidez, el volumen fracción de la fase dispersa y el peso de proteína, se calculó un índice de actividad emulsionante, relacionado con el área interfasial de la emulsión (*Tabla 11*).

La fórmula para calcular la **turbidez** es:

$$T = 2.303 \frac{A}{I}$$

**Donde:**

T=turbiedad

A=Absorbancia a 500nm

I=Longitud de la trayectoria de la celda

La **capacidad de emulsificación** se calcula:

$$CE = \frac{2(T)}{\varnothing C}$$

**Donde:**

CE= Capacidad de emulsificación

Ø= Fracción de aceite (ml)

C= Peso de las proteínas por unidad de volumen de la fase acuosa antes que se forme la emulsión.

Tabla 11. Capacidad de emulsificación. Método turbidimétrico.

<b>Muestra</b>	<b>CE (mL aceite/g proteína) 1%</b>	<b>CE (mL aceite/g proteína) 0.5%</b>	<b>CE (mL aceite/g proteína) 0.1%</b>
Malla N°40 ( <b>13.15%</b> proteína)	1008.31	1288.26	9678.51
Malla N°70 ( <b>15.62%</b> proteína)	877.33	1271.49	9287.03
Muestra seca y desengrasada ( <b>14.52%</b> proteína)	357.05	670.05	4887.55
Gluten de maíz ( <b>70.97%</b> proteína)	108.31	188.61	859.23
Zeína ( <b>61%</b> proteína)	53.34	62.82	946.51
Suero de leche ( <b>90%</b> proteína)	91.59	209.39	749.45

La alta capacidad de emulsificación que presentaron las fracciones seleccionadas y la muestra seca y desengrasada está relacionada con la solubilidad de las proteínas y su resistencia a la desnaturalización. Cabe mencionar que el comportamiento de la capacidad de emulsificación con este método es similar al método empleado por *Chau et al 1977*. Donde se observó que las proteínas estándar presentan valores de emulsificación de aceite menores a los que presentan las fracciones seleccionadas, los dos métodos siguieron el mismo comportamiento, lo mismo sucede con los valores de CE, éste valor aumentó conforme la concentración de la muestra disminuye, a excepción de la muestra seca y desengrasada que presentó valores de CE menores que en todas las muestras. También se observó el mismo comportamiento para las fracciones

seleccionadas y para las proteínas estándar a las diferentes concentraciones, pero como ya se mencionó, debido a las variaciones y complicaciones del método, se decidió por tomar más peso en los resultados que arrojó el método *Chau et al 1977*.

La utilización de una harina mayoritaria, una rica en proteínas, y una muestra seca y desengrasada permitió observar que para el caso de capacidad de emulsificación, resulta de mayor utilidad utilizar la muestra seca y desengrasada sin someterse a molienda, y en una concentración baja para que pueda presentar mejores valores de CE, por lo cual resultará de mayor utilidad en la elaboración de productos emulsionados en la industria alimentaria.

### ***Capacidad de espumado.***

Generalmente, las espumas se forman por burbujeo, agitación o batido de la solución de proteína. Las propiedades de espumado consideran 2 aspectos. a) la habilidad de producir un área en la interfase tal que una gran cantidad de gas puede incorporarse en el líquido (comúnmente referido como espumado o capacidad de espumado) y b) la habilidad de formar una película determinada que pueda contrarrestar las fuerzas internas y externas.

Se calculó la capacidad de espumado con la siguiente fórmula.

$$CE = \frac{\text{Vol. espuma} - \text{Vol. líquido inicial}}{\text{Vol. líquido inicial}} \times 100$$

Se calculó la CE para las proteínas estándar y la muestra y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 12.



Tabla 12. Capacidad de espumado.

Muestra	CE (%)
Malla N°40 ( <b>13.15%</b> proteína)	No formó espuma
Malla N°70 ( <b>15.62%</b> proteína)	No formó espuma
Muestra seca y desengrasada ( <b>14.52%</b> proteína)	No formó espuma
Gluten de maíz ( <b>70.97%</b> proteína)	No formó espuma
Zeína ( <b>61%</b> proteína)	No formó espuma
Suero de leche ( <b>90%</b> proteína)	330 ± 7.0710

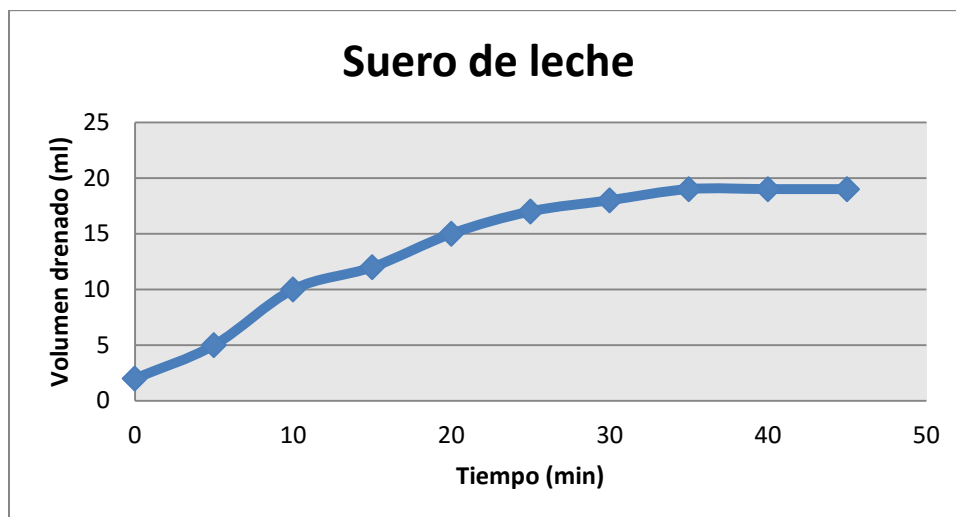
\*Los resultados presentados con CV menor a 2.14%.

Las espumas están formadas por una fase continua acuosa y una fase dispersa gaseosa (aire). Las espumas estabilizadas por proteínas suelen formarse por burbujeo, batido o agitación en una disolución proteica. Las propiedades espumantes de las proteínas derivan de la capacidad de formar una película delgada y tenaz en las interfaces gas-líquido, lo que permite la incorporación y estabilidad de múltiples burbujas de gas. La capacidad espumante de una proteína es al área interracial que puede ser creada por ella.

Como se observa en la tabla 12 la única proteína que formó espuma fue el aislado de las proteínas del suero de leche. Donde se obtuvo un valor de 330% de espuma. Este resultado se atribuye principalmente a la solubilidad de las proteínas del suero de leche, ya que son altamente solubles en agua, la solubilidad mejora la capacidad de espumado debido que requiere cargas netas altas, este factor influye positivamente en la absorción de las proteínas en la interfase agua-aire reduciendo así la tensión superficial. Las moléculas de proteínas deben interactuar unas con otras para formar una película estable, en este momento la interacción no debe ser demasiado fuerte para que la proteína se coagule y rompa la película resultando la ruptura de la espuma (*Kinsella, 1976*).

Por este motivo es que tanto la zeína, como el gluten, la muestra seca y desengrasada y las fracciones seleccionadas no presentan una formación de espuma, al ser totalmente insolubles en agua no pueden interaccionar en la

interfase agua-aire, debido a que no interaccionan en la fase acuosa (las proteínas no pueden desdoblarse en la interfase). Este método se realizó con la finalidad de corroborar que las proteínas evaluadas eran de carácter insoluble.



Gráfica 5. Estabilidad de la espuma del suero de leche.

En la *gráfica 5* se observa la estabilidad de la espuma formada por las proteínas del suero de leche. La espuma de esta proteína se desestabilizó y perdió sus características iniciales conforme pasó el tiempo hasta llegar a los 35 minutos, ya que presenta una mayor facilidad de establecer una partícula interfaseal cohesiva, además de que es capaz de atrapar y retener el aire; pero como se observa no sería capaz de soportar esfuerzos mecánicos.

Esta proteína tiene como función reducir la tensión interfacial orientando sus grupos hidrófilos hacia el exterior de la burbuja en contacto con el agua, y los hidrófobos hacia el interior, con el aire). En este fenómeno influyen muchos factores que al modificar las proteínas alteran la capacidad de espumado: pH, sales, azúcares, lípidos, temperaturas elevadas, viscosidad, grado de ionización, etc.

## CONCLUSIONES.

- Se logró incrementar a 15.5% la concentración de proteína de los residuos del café por medio de extracción alcalina, sin embargo, no se le puede llamar ni concentrado ni aislado proteínico (requiere una concentración mayor a 85% para ser llamado así). Como la extracción de este concentrado proteínico es poca (0.86% p/p), limitó su aplicación para evaluar las propiedades funcionales.
- Mediante el proceso de molienda se obtuvieron fracciones más concentradas en proteína con dos diferentes tamaños de partícula para su estudio (fracción malla N° 40 y malla N°70) que al evaluar propiedades funcionales no presentaron diferencia significativa en comparación con la muestra seca y desengrasada.
- Para caracterizar las proteínas de las muestras seleccionadas (muestra seca y desengrasada, aislado proteico, fracción malla N°40, fracción malla N°70), se utilizaron tres métodos: solubilidad, cromatografía en capa fina y método Bradford, con los resultados obtenidos se concluyó que las proteínas de origen estructural, son solubles a pH básicos y contienen residuos de aminoácidos básicos y aromáticos.
- La muestra seca y desengrasada resultó presentar mejores valores de CRA, CRAA y CE, sin algún tratamiento físico como el de molienda, aunque la diferencia no resultó ser significativa, por lo cual se consideraría la forma en que se quisiera utilizar como ingrediente, en forma de harina o sin más tratamientos.
- La capacidad de retención de agua es mayor para la muestra seca y desengrasada en comparación con los concentrados de la malla N° 40 y

N°70, debido al tratamiento mecánico (molienda), ya que sin tratamiento la fibra afecta positivamente en la retención de agua, aunque al realizar el análisis de varianza no se encontró diferencia significativa entre las tres muestras.

- Para capacidad de emulsificación, no existe diferencia significativa en los valores obtenidos de las muestras seleccionadas en comparación con las proteínas estándar, pero se observó que entre menor sea la concentración utilizada los valores de CE son más altos, por lo que su uso en la industria se propone a una concentración de 0.1%.
- Se confirmó lo esperado en proteínas con carácter insoluble, la no formación de espuma.
- Con las propiedades que se evaluaron y los resultados que se obtuvieron las proteínas insolubles de los residuos del café podrían ser utilizadas en la industria alimentaria, se utilizarían como aditivo en la elaboración de alimentos fritos, barras de cereal, emulsionados y a base de cereales adicionalmente con fibra y antioxidantes principalmente.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W. y Rao R.M., 1999 *Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications*. JAFCA, 47:1340-1345.
2. Badui, D. S., 1994. *Química de alimentos*. Alhambra, pp. 123-150.
3. Belitz, H. D., 1997. *Química de los alimentos*. Acribia, Zaragoza. Pág. 254.
4. Bermúdez A, Bernal J, Espinosa E, Cornejo W, Briceño I, Prieto JC, Arrieta L *Propuesta para un protocolo de diagnóstico de homocistinuria*. 2011. <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v44n3/0023%20propuest a.pdf>, (fecha de consulta: 30/07/2014)
5. Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*. 72: 248-254.
6. Casanueva, E., 2001. *Nutriología médica*, 2da edición, Panamericana, México, pág. 125.
7. Cheftel, J. C., 1992. *Introducción a la bioquímica, tecnología de los alimentos*, Acribia, Zaragoza, vol. 1 y 2.
8. Cheftel, J. C., 1989, *Proteínas alimentarias*. Acribia, Zaragoza, pág. 343.
9. Hernández Gil A. y Ruíz López M., 2010. *Tratado de nutrición; Tomo II. Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. 2ª ed. Médica panamericana, Madrid.
10. Damodaran, S., 1997. *Food proteins: an overview*, In *food proteins and their applications*, Marcel Dekker Inc, USA, pp. 1-24.
11. Díaz, G. K. y Maldonado, B., (2000). *Caracterización electroforética y funcional de las proteínas del salvado de arroz*, Tesis de licenciatura, UNAM, México, D. F., pp. 121-130.
12. FAO/WHO/UNU. 1985. *Protein Quality Evaluation. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation*. WHO Tech. Rep. Ser. No. 724. Geneva, WHO, Rome: FAO Food and Nutrition Paper No. 51, 1991
13. Fennema, O. R., 1996. *Química de los alimentos*, 3ra edición, Marcel Dekker Inc, New York, pp. 255-351.

14. Flores J. & Bermell S., 1984, *Propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares: Capacidad de retención de agua*, *Revista agroquímica de tecnología de alimentos*. 24: 151-158.
15. González Laura, Téllez Alfredo, Sampedro José, y Nájera Hugo., Universidad autónoma del estado de Hidalgo, *Revista Salud Pública y Nutrición*, Volumen 8, N° 2, Abril-Junio, [en línea], Pachuca, 2007, *Las proteínas en la nutrición*. Formato HTML, disponible en línea en: <http://www.respyn.uanl.mx/viii/2/ensayos/proteinas.htm>, [citado: 04/06/2013]
16. Hoffmann, G. 1989; *The chemistry and technology of edible oils and fats and their high fat products*; Academia Press, London.
17. Iwai K., Kishimoto N., Kakino Y., Mochida K., Fujita T., 2004, *In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, pp 4893-4898.
18. Jacques, P. J. y Pierre, D. A., 2000. *Análisis nutricional de los alimentos*, Acribia, Zaragoza, pp. 41-51.
19. James, C. S. *Analytical chemistry of foods*. Second edition. Aspen publishers. New York 1999.
20. Kinsella, J. E., 1976. *Functional properties of proteins in foods: a survey*. *CRC, Critical Review in Food Science and nutrition*, 7: pp. 219-280.
21. Kirk R.S., Sawyer, R y Egan H., 1996, "*Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*". Segunda edición. Editorial CECSA. México.
22. Lehninger, A. 2006. *Principles of Biochemistry*, 4 edition, Worth publishers.
23. McWatters, K. H. y Cherry, J. P., 1977. *Emulsification, foaming and protein solubility properties of defatted soybean, peanut, field, pea and pecan flours*, *Journal Food Science*, 42:1444.
24. Nielsen S. 1998, *Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication*, Gaithersburg, Maryland.
25. Nollet, Leo M. L. 1996; *Handbook of food analysis*; M. Dekker, New York.
26. Osborne, T. B. y Mendel, L. B., 1914. *Amino-acids in nutrition and growth*, *The journal of Biological Chemistry*, vol. XVII, N° 3, pp. 325-349.

27. Osborne, T. B. y Mendel, L. B., 1914. *Nutritive properties of proteins of the maize kernel*, *The journal of biological chemistry*, vol. XVIII, N° 1, pp. 1-16.
28. Pandey, V. N.; Sirvastava, A. K. *Seed protein yield from some Crotalaria spp. and in vitro nutritional quality of that from C. juncea*. *Plant Foods Hum. Nutr.* 1990, 40, 195-200.
29. Pearson. D, 1993. *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*, Acribia, España.
30. Peters, 1999. *Operaciones básicas de ingeniería química*, Barcelona.
31. Puerta, G. I., 2011, *Composición química de una taza de café*, CENICAFE, Colombia.
32. Puppo, M. C., Speroni, F., Chapleau, N., Añon, M.C. y Lambarellie, M., 2005. *Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins*, *Food hydrocolloids*. 19: 289-296.
33. Robertson, J. A., Monrendon, F. D., Dysseler, P., Guillon, F., Amdó, R. y Thibauthl, J. F., 2000. *Hydration properties of dietary fiber and resistant starch: A European Collaboraty Study*, *IWT*, 33:73-79.
34. Robinson, D. S., 1994. *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*, Acribia, Zaragoza. pp. 218-225.
35. Sorgentini, D. A. y Wagner, J.R., 2002, *Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins*, *Food Research International*, 35: 721-729.
36. Shigley J., Mischke C., 1998, *Diseño en ingeniería mecánica, Granulometría*, McGraw-Hill, México.
37. VanMegan W. H., 1974. *Solubility behavior of soybean globulins as a function of pH and ionic strength*. *Journal agriculture Food Chemistry*. 22:126
38. Voet, D. y Voet, J., G., 2006, *Biochemistry*, Wiley, New York, Cap. 7-8.
39. Wade L. G. Jr., 2004, *Química Orgánica*, 5ª edición, Pearson Prentice Hall, Madrid Capítulo 24.

40. White, J. A.; Hart, R. J., 1992, *Derivatization methods for liquid chromatographic separation of aminoacids*. En *Analysis by HPLC*. Nollet, New York, pp53-74.
41. Wijeratne, W. B., 2005. *Propiedades funcionales de las proteínas de soya en un sistema alimenticio*, University of Illinois, Vol. 7, N° 6, pp. 10-18.
42. Yasumatsu, K., K. Sawada, S. Moritaka, M. Nfisaki, J. Toda, T. Wada and K. Ishi, 1972. *Whipping and emulsifying properties of soybean products*. *Agric. Biolog. Chem.*, 36: 719-727.