



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



TESIS

Estudio de la viabilidad de producción de biomasa equivalente a proteína unicelular utilizando *Saccharomyces cerevisiae* sobre desechos de producción de café

Para obtener el título de licenciado en:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

PRESENTA

Karina Ríos García

Asesor: Q.F.B. TELLITUD HILARIO SOSA RUIZ

Grado Académico: Licenciatura en Químico Farmacobiología

Co-Asesor: Q.F.B. FELIPE DE JESÚS TENORIO GUZMÁN

MORELIA, MICHOACÁN

Abril 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a:

Mis padres Armando y Natalia, por la grande confianza que depositaron en mí y el enorme apoyo que me han brindado durante toda mi vida, si ellos no hubiera podido llegar tan lejos.

A mis hermanos por sus palabras de aliento y apoyo en todos los momentos difíciles.

Este agradecimiento es especial y va dedicado a mi esposo Carlos Quiroz Aparicio, la persona más maravillosa para mí, quiero agradecerle toda la paciencia que tuvo conmigo en este proceso de tesis y sobre todo gracias por guiarme hacia un futuro de superación y estudio.

Le quiero agradecer a la maestra Sandra María Suárez Moreno por todo el apoyo brindado en el proceso microbiológico llevado a cabo en su laboratorio (Laboratorios Dipromi).

Uno de los agradecimientos más importantes es para mí asesor, el maestro Tellitud Hilario Sosa Ruiz por confiar en mí y en este proyecto, por brindarme su apoyo en los momentos que otros me negaron su ayuda, muchas gracias por la gran paciencia que siempre tuvo y por todos los grandes consejos que me brindo, si él no hubiese podido consolidar esta tesis.

Índice

Índice	3
Índice de gráficas.....	4
Índice de figuras	5
Índice de Mapas	5
Índice de Tablas.....	5
1. Abreviaturas	6
2. Resumen.....	7
3. Abstrac	8
4. Introducción	9
4.1 Información general del café	10
4.2 Historia del café en México	11
4.3 La caficultura en México	11
4.4 Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café.....	12
4.5 La Pulpa del café.....	13
4.6 Datos de Toxicidad de la cafeína.....	14
4.7 La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
4.8 Importancia de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> en las fermentaciones industriales	16
5. Planteamiento del problema	18
6. Justificación	19
7. Hipótesis.....	20
8. Objetivos	20
7.1 General.....	20
7.2Específicos	20
9. Materiales y métodos	21
8.1 Métodos	21
8.2 Muestreo	21
8.2.1 Selección de muestra	21
8.2.2 Criterio de inclusión	22
8.2.3 Criterio de exclusión.....	22

8.2.4	Tamaño de la muestra.....	22
8.2.5	Transporte	23
8.2.6	Verificación de la viabilidad de la materia prima como sustrato.....	23
8.2.7	Análisis bromatológico del Sustrato.....	23
8.3	Determinación de la carga microbiana y elección del microorganismo	23
8.3.1	Fermentaciones.....	23
8.3.2	Determinación matemática de la viabilidad de producción de proteína	24
8.4	Técnicas detinción	24
8.4.1	Tinción de Gram	24
8.4.2	Hidróxido de potasio	24
8.4.3	Azul de metileno.....	25
8.5	Método para determinación de proteína	25
8.5.1	Método de Biuret	25
8.6	Método de Lowry	26
8.7	Diagrama	27
9	Resultados	28
10	Discusión de Resultados.....	38
11	Conclusiones.....	39
12	Futuras líneas de investigación	40
13	Bibliografía	41

Índice de gráficas

Gráfica 1.	Curva patrón de Albúmina Sérica Bovina para determinación de Proteína por el método de Biuret.....	34
------------	--	----

Índice de figuras

Figura 1, fuente Karina Ríos García, tinción de Gram, azul de metileno e hidróxido de potasio	24
Figura2. Diagrama general del proceso de investigación.	27
Figura 4. Terreno de cultivo donde fue tomada de forma aleatoria la muestra.	28
Figura 5. Método por el cual se sometió la muestra a una reducción de partícula.....	28
Figura 3. Toma de muestra de forma aleatoria del proceso de desecho de la pulpa de café.	28
Figura6. Izquierda. Medio de Agar Sangre y Agar Chocolate, con crecimiento de <i>Escherichia coli</i> , contaminación microbiana. Centro. Medio de Agar Saboraud, con crecimiento levaduriforme, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tomado de la cepa de referencia. Derecha. Matraces con pulpa de café, preparadas para proceso fermentativo.	29
Figura 7. Tubos de caldo Lauril Sulfato de Sodio, que definirá el tiempo de esterilización por radiación UV.	29
Figura 8. Incubadora en la cual se colocaron las muestras para su posterior fermentación.	30
Figura 9. Cama ultravioleta, la cual fue utilizada para la esterilización del sustrato.	30

Índice de Mapas

Mapa 1. Zona del sembradío tomado como área para la selección de la muestra. Municipio de Jilotepec Veracruz. Fuente: Google Maps.....	22
--	----

Índice de Tablas

Tabla 1. absorbancias de glucosa por el método de Trinder.	31
Tabla 2. Tabla inicial de absorbancia con resultado de determinación porcentual de glucosa.	32
Tabla 3. muestra final, absorbancia y concentración final de glucosa.	32
Tabla 4. Muestra inicial, absorbancia (promedio de los tres procedimientos de fermentación).....	32
Tabla 5. Muestra final. Absorbancia (promedio de los tres procedimientos fermentativos).....	32
Tabla 6. Determinación de absorbancia por método de Biuret.	33
Tabla 7. Absorbancia obtenida en muestra de producto fermentado luego de 24 horas de incubación. Método de Biuret.	33
Tabla 8. Resultados obtenidos en la curva patrón y convirtiéndola a mg/ml de muestra.	34
Tabla 9. Procedimiento de cálculo de la pendiente y el intercepto a fin de obtener la ecuación de regresión lineal.....	35
Tabla 10. Concentración de BSA contra Absorbancia en curva patrón de BSA para técnica de Determinación de proteína por el método de Biuret.	36
Tabla 11. Tabla de resultados de absorbancias, concentración de BSA y Concentración final de proteína obtenida por el método de Biuret. Fuente; Karina Ríos. Investigación sobre café.....	36

1. Abreviaturas

Terminología	Abreviatura
mililitro	ml
gramo	g
miligramo	mg
miligramo/mililitro	mg/ml
microlitro	μl

2. Resumen

Estudio de la viabilidad de producción de biomasa equivalente a proteína unicelular utilizando *Saccharomyces Cerevisiae* sobre desechos de producción de café

En el proceso de producción industrial de café (*coffea Arabica*), 35% de un grano normal constituirá, al término de dicho proceso, un subproducto de desecho, cuya utilidad es prácticamente nula, quedando reducido su aprovechamiento y en cantidades mínimas para la alimentación animal y para la lombricultura, siendo el resto una fuente de contaminación y daños ecológicos graves en las regiones donde se cultiva y procesa. En nuestro país, son desechados aproximadamente ciento treinta mil toneladas de pulpa de café al año, y las empresas simplemente las abandonan en espacios donde se integran al subsuelo y alcanzan los mantos freáticos, contaminando las aguas de consumo humano.

Esta pulpa de café, por la forma en que se desecha, se convierte en una materia prima importante, a un costo muy bajo, para su aprovechamiento en la obtención de nuevos productos a través de diversos procesos; es por ello que se realizó este trabajo, en donde, a partir de procesos fermentativos, se analizó la viabilidad para degradar los nutrientes de la pulpa de café para la obtener biomasa equivalente a proteína unicelular, que pudiera convertirse en proteína para suplementos alimenticios en la alimentación humana, disminuyendo también los desechos.

Mediante esta investigación se pretende verificar la viabilidad para obtener biomasa equivalente a proteína unicelular, a partir de un proceso fermentativo utilizando al microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*, sobre pulpa de café.

Para la realización de este trabajo se realizó una serie de ensayos microbiológicos rigurosos, para obtener un microorganismo que se desarrollara idealmente en el sustrato, sin que fuera necesario añadir nutrientes adicionales, siendo finalmente la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, propia de muchos procesos fermentativos de tipo industrial. A lo que siguió encontrar las mejores condiciones para obtener un aumento significativo de la biomasa, analizando factores como la concentración de sustrato en la solución acuosa, el tratamiento previo del sustrato para garantizar su esterilidad, la temperatura de fermentación, la agitación y el tiempo total de fermentación, a través de los cuales se han logrado desarrollar una técnica adecuada para conducir dicho proceso fermentativo y una vez finalizado, se realizó la determinación cuantitativa de proteína a través de métodos espectrofotométricos.

Palabras clave: Lombricultura, desecho, biomasa, proteína, unicelular

3. Abstrac

Feasibility study of biomass production of single cell protein equivalent *Saccharomyces cerevisiae* waste using on coffee production

In the process of industrial production of coffee (Coffee Arabica), 35% of a normal grain constitute, at the end of this process it's a byproduct of waste, whose usefulness is negligible, being reduced its use and in small quantities for animal feed and vermiculture, the remainder being a source of pollution and serious ecological damage in regions where it is grown and processed. In Mexico, they are disposed approximately one hundred thirty thousand tons of coffee pulp per year, and companies simply abandon them in spaces where they are integrated underground and reach groundwater, contaminating drinking water.

This coffee pulp, by way of discarding, becomes an important raw material, at a very low cost, for use in obtaining new products through various processes; that is why this work, where, from fermentative processes, viability was analyzed to degrade nutrients from coffee pulp to obtain equivalent biomass unicellular protein, which could become protein for food supplements was made the food, also reducing waste.

Through this research is to test the feasibility for single-cell protein equivalent of biomass from a fermentation process using the *Saccharomyces cerevisiae* microorganism on coffee pulp.

To carry out this work a series of rigorous microbiological testing was performed to obtain a microorganism developed ideally in the substrate, without the need to add additional nutrients, eventually being the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, typical of many fermentation processes of type industrial. To which he continued to find the best conditions for a significant increase in biomass, analyzing factors such as substrate concentration in the aqueous solution, pretreatment of the substrate to ensure sterility, the fermentation temperature, agitation and total time fermentation, through which they have managed to develop a suitable technique for driving said fermentative process and once completed, the quantitative determination of protein was performed by spectrophotometric methods.

4. Introducción

En la actualidad, la población humana en el planeta ronda los siete mil doscientos millones de habitantes, de los cuales tres quintos corresponden a la población asiática, mientras que el resto se distribuye de forma relativamente equitativa en el resto del planeta, siendo América Latina una región con un particular crecimiento demográfico. *A su vez, en estos países cuentan con una enorme cantidad de terrenos de cultivo, que, sin embargo, al ser aprovechados por la agricultura y la ganadería, generan deforestación, desertificación y alteraciones al equilibrio ecológico de la región, coadyuvando, aún más, con los daños ligados al calentamiento global y la actividad humana en el planeta*(FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015).

Sin embargo, el problema se intensifica si consideramos que existen también graves y grandes problemas en la alimentación humana y de pobreza extrema en estas regiones del planeta, de las cuales México no es una excepción, de forma que poder establecer una fuente de alimentación económica y accesible para la población de escasos recursos se vuelve fundamental para el abatimiento del hambre no solo en nuestro país, sino también a nivel mundial.

A lo largo de los siglos, desde la conquista Española en nuestro país, una gran cantidad de productos han conseguido llegar y establecerse en terrenos de cultivo e industrias ligadas a estos terrenos, de forma tal, que a lo largo de tantos años, el nivel de contaminación que se ha provocado en mantos acuíferos y el subsuelo es importante. Uno de los principales productos traídos a México es el café, uno de los productos alimenticios más importantes del siglo XX y XXI en el mundo (FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015).

México ocupa el sexto lugar de la producción mundial de café, con 246 millones de toneladas de café al año(FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015). *Los residuos y subproductos del café constituyen una fuente de grave contaminación y problemas ambientales. Por ese motivo, desde mediados del siglo pasado se ha tratado de inventar métodos para utilizarlos como materia prima en la producción de piensos, bebidas, vinagre, biogás, cafeína, pectina, enzimas pépticas, proteína, y abono. El uso de la pulpa de café fresca o procesada ha sido tema de muchos estudios en los que, en general, se llega a la conclusión de que los residuos y subproductos del café pueden usarse de varias maneras*(Rathinavelu & Graziosi , 2005).

Actualmente existe una amplia gama de productos que son utilizados en la industria alimentaria en general, desde los carbohidratos más simples hasta polímeros complejos. Manejados ampliamente para la alimentación humana y animal, y que están colaborando en el mejoramiento y saneamiento del estado nutricional de los mismos, e incluso, son ampliamente usados en la alimentación animal, pero además, contribuyen a disminuir el impacto ambiental provocado por los residuos orgánicos en general.

Es por ello que el aprovechamiento de algunos subproductos metabólicos de estos procesos, en su enorme mayoría de carácter fermentativo son utilizados para producir proteína unicelular, juegan un papel fundamental en el desarrollo de la biotecnología en la actualidad, y el aprovechamiento de estos a muy bajo costo debe de ser prioridad fundamental de la investigación y el desarrollo de nuevos métodos y técnicas que permitan disminuir, aún más, los costes de la alimentación humana (Daqui. L. E. 1974).

La finalidad de la presente investigación es obtener proteína unicelular a partir de residuos de la agroindustria cafetalera, específicamente de la pulpa del café, mediante el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y procesos fermentativos. La obtención de la proteína da la pauta para futuras investigaciones, que busquen la innovación y producción de nuevos productos alimenticios que sirvan para la alimentación humana y a su vez generen valor agregado al sector cafetalero, además de contribuir a la reducción de la contaminación ambiental.

4.1 Información general del café

La palabra café proviene del turco “kahwe” que significa “lo que maravilla y da vuelo al pensamiento”. El cafeto pertenece a la familia de las rubiáceas, al género Coffea que fue descrito por primera vez por el botánico Linneo, en 1753. El Coffea comprende alrededor de sesenta especies, de las cuales veinticinco son las más conocidas. El Coffea Arábica es el más cultivado y el más apreciado comercialmente (Roux, 1984)

La semilla es el mismo grano de café, el cual se siembra bajo sombra en viveros y una vez fuerte se trasplanta a las plantaciones en las cordilleras cafetaleras. La zona ideal para sembrar es entre los trópicos de Capricornio y Cáncer.

La *Coffea arábica* requiere de una temperatura no inferior a los 18°C y con un promedio de precipitación pluvial entre 1016 y 1524 mm; el arbusto mide entre 2 y 6 m de altura en la

madurez, en estado silvestre puede alcanzar los 10m de altura; las raíces alcanzan hasta 1.50m de longitud.

Las hojas son elípticas, brillantes y de color verde oscuro cuando se desarrollan plenamente, los jóvenes son verde claro y las recién brotadas son amarillo bronce, lo cual da tres tonalidades diferentes al follaje. De las axilas a las hojas brotan de 8 a 15 glomérulos de flores blancas con 5 pétalos, que están sostenidos por cortos pedunculillos y exhalan una deliciosa y suave fragancia.

La flor es efímera, apenas vive unos pocos días y al desaparecer deja una pequeña baya conocida como ojo de cangrejo. Durante los seis, siete y ocho meses después de florecer, ese fruto se transforma, cambiando de color verde ligero al rojo y al carmesí profundo cuando está listo para la cosecha.

El fruto maduro crece en racimos asociados al miembro por vástagos muy cortos y generalmente contiene dos semillas rodeadas por una pulpa dulce. El cafeto da su primera cosecha plena cuando tiene alrededor de 5 años de edad, después produce constantemente para fines comerciales, durante quince o veinte años.

4.2 Historia del café en México

Villaseñor L.A. (1982), aporta que en 1796 se introduce a México por tres regiones diferentes desde la Isla de Cuba a Córdoba, Veracruz, en 1823 proveniente de Moka, Arabia a Uruapan, Michoacán y por último en 1847 de Guatemala a Tuxtla Chico, Chiapas. La primera exportación consistió en 272 quintales, se realizó por el año 1802; a partir de esa fecha, en forma ininterrumpida el país ha continuado la producción y comercialización del grano.

Desde su llegada a nuestro país los estados más importantes en la producción del grano han sido siempre Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla donde se concentra el 94% de la producción nacional.

4.3 La caficultura en México

En nuestro país, actualmente, el café se produce en quince estados, destacando Chiapas, Oaxaca y Veracruz, entidades de donde proviene más de la mitad de la producción nacional, los nombres a nivel mayorista son Coatepec, Córdoba, Jalapa, Hamburgo, Huatusco, Oaxaca, Orizaba, Pluma y Tapachula. El cultivo del café representa el segundo producto de importancia en la generación de divisas dentro del mercado internacional de nuestro país, solamente por debajo del petróleo, en el mercado internacional el café se encuentra dentro de los diez primeros productos con mayor valor.

Actualmente se producen alrededor de once millones, doscientas mil toneladas de café al año en los países de Centroamérica y México. A nivel internacional, nuestro país, ocupa el quinto lugar como productor de café, después de Brasil, Colombia, Indonesia y Vietnam igualmente el quinto por la superficie de cultivo, con alrededor de setecientos cincuenta mil (750 mil) hectáreas, el noveno lugar por su rendimiento y el primer lugar en la producción de café orgánico certificado. (FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015)

La posición de México como primer productor en el grupo de los cafés suaves y la importancia del Tratado de Libre Comercio con nuestro principal socio comercial, que es al mismo tiempo el primer consumidor del mundo, colocan a México en una posición de relativa ventaja frente a los demás países, especialmente con quienes compite de manera más cercana en Centroamérica y Colombia.

Sin embargo el sector cafetalero también ha tenido numerosos problemas originados dentro y fuera de las fronteras nacionales. Entre ellos, la caída de los precios internacionales del grano, condiciones sociales adversas, la disminución del apoyo gubernamental a la caficultura, etc. La sobreproducción de café generada en países como Vietnam y Brasil colapsa hoy día a muchos de los mercados internacionales pues este fenómeno provoca la paulatina baja de los precios gestando el origen de una nueva crisis mundial del aromático. Esta crisis, aseguran los expertos es originada por el exceso de oferta mundial que desencadena fluctuaciones e inestabilidad de los precios, ha provocado el surgimiento de nuevas áreas de producción, así como el traslado de áreas productivas a lugares con menores ventajas climáticas.

En el estado de Veracruz la situación se asemeja al contexto mundial, ya que el impacto económico de esta crisis ocasionando, anualmente, pérdidas en la actividad cafetalera, pobreza extrema en de los productores de fincas marginales, el abandono de las mismas y el imparable fomento de la migración en busca de mejores condiciones de vida. La producción estatal representa alrededor del 28% a nivel nacional lo que lo ubica en segundo lugar de los estados productores. Para el municipio de Jilotepec, la cafeticultura ha representado una actividad primordial.

4.4 Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café

En los países productores de café, los residuos y sub-productos del café constituyen una fuente de grave contaminación y problemas ambientales. Por ese motivo, desde mediados del siglo pasado se ha tratado de inventar métodos de utilizarlos como materia prima para la producción de

piensos, bebidas, vinagre, cafeína, pectina, enzimas pépticos, proteína, y abono. El uso de la pulpa de café fresca o procesada ha sido tema de muchos estudios en los que, en general, se llega a la conclusión de que los residuos y sub-productos del café pueden usarse de varias maneras, (Rathinavelu y Graziosi, 2005).

México ocupa el quinto lugar en el ámbito mundial como productor de café. A través del beneficio para la obtención del grano se producen más de un millón de toneladas anuales de desechos orgánicos conocidos como pulpa de café. A pesar de un alto contenido de hidratos de carbono y proteínas, la presencia de cafeína, taninos y polifenoles representa un problema para su uso como materia prima (Martínez *et al.*, 1984; Zuluaga, 1989; Consejo Mexicano del Café, 2000).

4.5 La Pulpa del café

Según cifras internacionales, la pulpa del café es un material de desecho que procede de la industria del café. Se llega a la conclusión de que la pulpa del café puede reemplazar hasta un 20% de los concentrados comerciales en la alimentación del ganado lechero, sin efectos perjudiciales y con un ahorro del 30%. Los resultados generales de los estudios de alimentación realizados con cerdos indicaron que el grano de cereales puede ser sustituido por pulpa deshidratada de café en hasta un 16% de la ración total, sin ningún efecto perjudicial con respecto al aumento de peso o a la conversión del pienso. Eso significa que al final del período establecido, cada cerdo criado ha dejado cerca de 50 kg de grano de cereales disponible para consumo humano u otros usos alternativos.

Además de hacerse con cerdos, los experimentos de alimentación con pulpa de café se hicieron con peces, pollos, corderos y conejos. En esos experimentos de alimentación se determinó el aumento diario del peso corporal y se midieron la toma diaria de materia seca y la eficiencia de conversión de la alimentación. En los cerdos alimentados con raciones que contenían hasta un 15% de pulpa de café ensilada con un 5% de melaza se observó un aumento de peso igual o mejor que en los alimentados con concentrados comerciales. El ensilaje de la pulpa de café es una alternativa válida a la de manipular y almacenar las enormes cantidades de pulpa de café que se producen en las fábricas de todo el mundo que procesan el fruto del café. La inclusión de ensilaje de pulpa de café en el régimen alimenticio de algunos animales de granja podría contribuir a reducir los costos de producción de leche y carne, especialmente en los países en desarrollo, (Graziosi, 2005).

4.6 Datos de Toxicidad de la cafeína

El uso y consumo de cafeína, tal vez data desde la era paleolítica, ya que está ampliamente distribuida en diferentes plantas, entre las cuales se encuentran varias de Sudamérica como la guaraná, cola, yoco y ate. Apparently la planta de café fue cultivada en Etiopia (Abisinia) siendo el fruto ingerido como tal, después se le fermento y finalmente se tuvo como una bebida caliente, llamándola “gahwa” o kahveh en turco, para transformarse posteriormente en café en español y francés y kaffe en alemán (Roberts y Barone 1983)

El mayor uso de la cafeína es como parte de la formulación de las bebidas carbonatadas de “cola”, así como en panificación, derivados lácteos, pudines, y confitería (Lapedes, 1977). Otros usos están relacionados al tratamiento terapéutico de apnea infantil (suspensión de la respiración), estimulante bronquial y cardiaco, tratamiento de acné, así como el tratamiento de la migraña.

También se le encuentra en productos farmacéuticos de patente como: analgésicos, diuréticos, control de peso, estimulantes (Roberts y Barone 1983).

Una taza de café instantáneo contiene aproximadamente 74 mg de cafeína con un rango estimado de 93-169 mg. Sin embargo, una taza de café percolado posee 83 mg (intervalo 64-124 mg).

La cafeína es un polvo blanco, con sabor amargo siendo sublimado sin que se descomponga térmicamente, soluble en agua con hidrofobicidad suficiente para atravesar membranas biológicas. Estas características facilitan que sea absorbida rápidamente en el tracto gastrointestinal, distribuyéndose en todo el organismo, incluyendo cerebro, testículos, y tejidos fetales. Existe una alta retención de la cafeína ingerida debido a que no es excretada por el riñón, sin embargo esta se elimina por medio de sus derivados por tres rutas de biotransformación:

1. Oxidación de los grupos metilo dando metilxantinas (teofilina, teobromina o paraxantina)
2. Oxidación en la posición de 8 de la purina dando como producto al ácido 1, 3, 7 trimetilurico.
3. Ruptura hidrolítica de la purina entre la posición 8 y 9 produciendo 6-amino-5 (N-formil-metilamino)- 1, 3 dimetiluracil

Sin embargo en humanos 70% de la cafeína sigue la ruta de biotransformación a la paraxantina, la cual puede ser posteriormente demetilada. Como es de suponerse, las madres que ingieren café justo antes del parto, hacen que la cafeína sea transferida al recién nacido, el cual debe tardar hasta una semana en eliminarla

Resalta el hecho que la feotina y la paraxantina aparentemente son más activas farmacológicamente que la cafeína, mientras que la teobromina es la de menor potencia. Una taza de café puede retardar el tiempo requerido para que un individuo se duerma, así como servir de estímulo durante los estados de aburrimiento o fatiga, aparentemente también, facilita la realización de tareas rutinarias (Li-chen, et al 1979).

Al aumentarse el consumo de cafeína se pasa a un estado de ansiedad, con efectos cardiovasculares, diuresis y aumento en la secreción gástrica. La toxicidad aguda de la cafeína se observa a niveles de 150 a 200 M en plasma, con síntomas de inquietud, excitación, delirios ligeros, tensión muscular, temblores, y disturbios cardiovasculares (taquicardia). Concentraciones letales son de 0,5 a 1 ml, lo que equivaldría aproximadamente a 75 tazas de café consumidas en un periodo de 30 minutos (von Borstel, 1983).

Por los efectos que causa el consumo actual de cafeína existe una tendencia, para que esta sea eliminada de la lista de compuestos generalmente reconocidos como seguros (GRAS “generally Recognized as safe”). Según la legislación de Estados Unidos de América (Miles, 1983) no está considerado como un aditivo en bebidas carbonatadas, ya que se parte generalmente de un extracto de las semillas de la planta de cola. La planta de cola prácticamente contiene una concentración doble que el café (Lapedes, 1977). Por otro lado, se sabe que una gran proporción de los consumidores de estas bebidas son niños y jóvenes, a los cuales se les debe formar conciencia del riesgo que representa el consumo de cafeína, ya que es precisamente esta edad donde se encuentra reportado el mayor consumo de este estimulante.

4.7 La levadura *Saccharomyces cerevisiae*

*Desde la antigüedad las levaduras de la especie de *Saccharomyces cerevisiae* han sido empleadas en numerosos procesos fermentativos. Dentro de la industria alimentaria se ha utilizado en la producción de alimentos como el pan, y en bebidas fermentadas como el vino, cerveza y sake. Recientemente ciertas cepas de *S. cerevisiae* están siendo utilizadas como complemento alimenticio (debido a su contenido en vitaminas, minerales y proteínas) y como agentes prebióticos en el tratamiento de diarreas crónicas.*

**S. cerevisiae*, es considerada como el modelo eucariota unicelular por excelencia. Su facilidad para cultivarla, manipularla y el amplio conocimiento de sus características biológicas y genéticas ha hecho de esta levadura una herramienta fundamental en el campo de la biotecnología.*

*También se utilizan cepas de *S. Cerevisiae* para la producción de combustibles alternativos como el bioetanol. Sin embargo algunas cepas resultan patógenas oportunistas asociadas a enfermedades en pacientes inmunocomprometidos (piarroux et al, 1999).*

4.8 Importancia de *Saccharomyces Cerevisiae* en las fermentaciones industriales

*Desde el inicio de la civilización humana, existe una relación estrecha entre el hombre y la actividad fermentativa de los microorganismos. Aunque las bacterias y los hongos filamentosos participan en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, en una fermentación alcohólica las levaduras son los microorganismos predominantes. Por ejemplo, la fermentación vínica es un proceso en el que está involucrada una sucesión de diferentes especies de levaduras. Las primeras evidencias de producción de vino se remontan a VI milenio AC en la antigua Mesopotamia. Durante milenios, el proceso de vinificación se consideró una propiedad intrínseca del mosto, hasta que en 1863 Louis Pasteur demostró su dependencia de la levadura. *S. Cerevisiae* es prácticamente la única especie de la microflora presente en el mosto capaz de finalizar la fermentación vínica. Debido a la baja representación de esta especie en el mosto inicial, el proceso puede demorar varios días en comenzar o en algunos casos el inóculo no se produce. Por esta razón se introdujo el concepto de inocular cultivos puros de levadura para iniciar la fermentación vínica (Pretorius, 2000).*

La levadura es un nombre genérico que agrupa una variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. De hecho, las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociados al progreso y bienestar de la humanidad. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y bebidas alcohólicas.

Dentro del género *Saccharomyces* la especie *cerevisiae* constituye la levadura y el microorganismo eucarionte. Este organismo se conoce también como levadura de panadería, ya que es necesario agregarla a la masa que se utiliza para elaborar el pan.

El término levadura proviene del latín, *levare*, que significa levantar. Se han reconocido algunas de las ventajas que ofrece el uso de la levadura de pan, *Saccharomyces cerevisiae*, como modelo biológico de la investigación: por un lado, la facilidad con la que se obtienen grandes cantidades de este microorganismo.

Una levadura haploide contiene 16 cromosomas variando en tamaño de 200 a 220 Kb, en los cuales como resultado del análisis de la secuencia del genoma.

Ciclo de vida vegetativo

Uno de los aspectos más relevantes de la biología de *S. cerevisiae*, es su ciclo de vida. Durante la fase vegetativa, la levadura se divide por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre, posteriormente ocurre la división nuclear, la síntesis de la pared y finalmente la separación de las dos células. Este ciclo puede ocurrir en cultivos de células diploides o haploides, y por lo tanto se puede experimentar con cultivos estables diploides o haploides.

Desde el punto de vista genéticos, el ciclo de la vida vegetativo permite el aislamiento de mutantes recesivos en un fondo haploide, y el estudio de complementación de fenotipos de cepas diploides. Es decir, debido a que un organismo haploide solamente posee una dosis de cromosomas, los efectos de dominancia-recursividad generalmente no obscurecen la expresión genética, y por tanto el fenotipo es en reflejo directo del genotipo. Por otro lado, si nos interesa estudiar las relaciones de dominancia y recesividad entre dos alelos, mediante pruebas de complementación, fácilmente se puede construir la cepa diploide apropiada.

Durante muchos años se consideró que a diferencia de los hongos denominados filamentosos, *S. cerevisiae* era incapaz de formar hifas o filamentos y que su crecimiento vegetativo, a través de la gemación, únicamente resultaba en la formación de células esféricas denominadas levaduras. Recientemente se encontró un fenómeno que sorprendió a la comunidad científica dedicada al estudio de esa levadura: *Saccharomyces*, el organismo levaduriforme por antonomasia, era capaz de formar hifas (pseudohifas).

Existen hongos como *Mucor rouxii*, capaces de crecer formando filamentos o formando células levaduriformes, la posibilidad de cambiar y mantener cada uno de los dos tipos de crecimiento.

Por medio de receptores anclados a la membrana celular, las levaduras pueden responder a la presencia de moléculas que actúan como señales en una condición fisiológica determinada, estas señales se traducen por un sistema de señalización en el que participan cinasas denominadas “protein-cinasas mitogenicamente activadas” (MAPK) (17). Por ejemplo, si un cultivo de levaduras se expone a alta o baja molaridad, la presencia de una alta o baja concentración sal en el medio de cultivo constituye una señal, que al interactuar con un receptor específico, pasa a través de una serie de moléculas intermediarias hasta modificar un determinado regulador transcripcional,

que ahora es capaz de activar o reprimir la expresión de un gen o grupos de genes (17). Esto le permite a la célula transcribir de manera selectiva un grupo de genes específicos, cuya traducción resultara en la síntesis de los productos que le permiten contener de manera eficiente con la condición fisiológica en la que se encuentra, por tanto mantener la viabilidad, esporular, crecer en forma de filamentos, etc. así se han descrito en *S. Cerevisiae* distintas cascadas que responden a estímulos ambientales diferentes y específicos. El hallazgo del crecimiento pseudohifal de *S. cerevisiae* resulto en el estudio de una cascada de señalización cuyo funcionamiento determina el crecimiento levaduriforme o pseudohifal, los resultados obtenidos al estudiar la cascada de *S. cerevisiae* permitieron una mejor comprensión de los sistemas que operan en hongos di mórficos.

5. Planteamiento del problema

En la década de los años 70, una parte importante de los biotecnólogos de todo el mundo enfocaron sus investigaciones hacia la utilización y aprovechamiento de los residuos agroindustriales para la producción de compuestos útiles como insumos de otros procesos industriales; los primeros años la prioridad se enfocó a la generación de productos con valor agregado, años más tarde se sumó la prioridad de utilizar los residuos para reducir el impacto ambiental que ocasiona su disposición, y a partir del presente siglo la prioridad está enfocada a la producción de bioenergéticos y a la elaboración de nuevas formulaciones de alimentos para animales (Saval, 2012).

Los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social. El problema al que se enfrentan los residuos agroindustriales es que no existe una clara conciencia ambiental para su manejo, además de que falta capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final, así como una legislación específica para promover la gestión de este tipo de residuos, que asegure un buen manejo desde su generación hasta su disposición final. Aún en nuestros días, esta problemática prevalece a nivel mundial. (Saval, 2012).

A nivel mundial, la preocupación por el aprovechamiento de residuos ha tomado gran fuerza entre la comunidad científica y sobre todo a nivel industrial, en donde los procesos de transformación generan subproductos que pueden ser útiles en otras actividades. De hecho, estudios recientes

han demostrado que las cáscaras de frutas como la naranja contienen antioxidantes que podrían tener un efecto benéfico en la salud humana. Sin embargo, los residuos generados en las transformaciones agroindustriales y por las pérdidas postcosecha aún no han sido aprovechados eficientemente, en parte, porque su valor es aún desconocido y, sobretodo, por la falta de métodos apropiados para la preparación y caracterización de sustancias con la suficiente calidad e inocuidad como para ser usadas en los procesos de mayor valor agregado (Saval, 2012).

En la agroindustria del café solamente se utiliza el 9,5 por ciento del peso total del fruto en la preparación de bebidas y el 90.5% son subproductos resultantes del beneficio los cuales son vertidos a los cuerpos de aguas contaminándolas y disminuyendo la posibilidad de vida de los ecosistemas, o se realiza un almacenamiento en la época de recolección y luego son retirados de estas instalaciones entrando a contaminar el suelo, se calcula que aproximadamente son vertidos a campo abierto dos millones y medio de toneladas de pulpa y 420.000 toneladas de mucilagos que bien podrían incrementar la cadena de valor en los sistemas productivos y no seguir contaminando el medio ambiente. Se ha tratado de adoptar métodos de utilización como materia prima en la producción de concentrados para las industrias porcícolas y ganaderas, en preparación de bebidas, vinagre, biogás, cafeína, pectinas, enzimas pépticas, proteínas y abonos. (Suarez, 2012).

Otro de los mayores problemas que enfrentan los gobiernos a nivel mundial es la alimentación de la población. De acuerdo con el análisis "Perspectivas de la Población Mundial de la Organización de las Naciones Unidas (ONU)", la población mundial alcanzará los 7 200 millones de habitantes al finalizar el este año. El continuo crecimiento poblacional creará escenarios más difíciles para la alimentación. Por ejemplo, se considera que para el año 2050 habrá alrededor de 9 600 millones de habitantes en el planeta. Si ese escenario se cumple, muchos sectores de la población no contarán con alimentos.

6. Justificación

La obtención de productos metabólicos diversos y metabolitos secundarios a partir de rutas fermentativas, sirve para la producción de biomasa, que puede ser utilizada como proteína unicelular. Mediante la presente investigación se busca el aprovechamiento de los residuos de la agroindustria cafetalera, con el objetivo de transformar la pulpa del café en proteína unicelular, propiciando la reducción de problemas ambientales ocasionados por el beneficiado del café,

además, de usarse como fuente alimentaria accesible económicamente a la población en general. De esta manera se logrará generar un valor agregado al producto café, además de reducir la contaminación del agua y suelo. Con la producción de proteína unicelular se promoverá la seguridad alimentaria del país, al contar con una nueva fuente de alimentación de origen orgánico.

7. Hipótesis

La producción de biomasa equivalente a proteína unicelular a partir de los desechos obtenidos de la producción comercial de café (denominada pulpa de café), utilizando una ruta fermentativa, empleando a la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***, es un proceso viable que genera rendimientos más adecuados que el uso de algún otro nutriente que es utilizado para consumo humano.

8. Objetivos

7.1 General

Producir biomasa equivalente a proteína unicelular a partir de pulpa de café, mediante un proceso fermentativo utilizando ***Saccharomyces cerevisiae***, con la finalidad de aprovechar los residuos de la agroindustria cafetalera y contribuir al desarrollo de los sectores económico, ambiental y social en México.

7.2 Específicos

- Obtener las muestras de pulpa de café y esterilizarlas.
- Producir biomasa a partir de una fermentación alcohólica.
- Verificar la existencia de proteína unicelular a partir de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** mediante los métodos de Buret y Lowry.
- Verificar si existen subproductos adicionales a la proteína unicelular.

9. Materiales y métodos

8.1 Métodos

Tipo de estudio: descriptivo, de incidencia, longitudinal, experimental, prospectivo.

Tiempo de duración del estudio: Siete meses, los dos primeros de identificación microbiológica y de procesos cualitativos, los últimos cinco de determinaciones cuantitativas y determinaciones matemáticas.

8.2 Muestreo

Posterior al despulpado del café, la pulpa se tira al aire libre. Se toma una muestra al azar de aproximadamente 1.5 kilogramos. Cabe señalar que esta muestra es obtenida en promedio de 3 días después de haber sido desechada y se encontraba bajo las condiciones climatológicas propias de la región a 1250 metros sobre el nivel del mar, en condiciones de humedad baja pero lluvia constante durante el periodo en que se recolectó la muestra.

Se ha decidido trabajar el método de muestreo (por cuarteo) debido a que no se cuenta con el financiamiento adecuado y además existe una limitación en el tiempo, ya que está limitado al periodo de cosecha, además era necesario obtener información adecuada en este corto tiempo. El muestreo elegido se aplica de esta forma debido a que la muestra de pulpa de café es homogénea en el contexto de la cascara pero altamente heterogénea en su composición interna a tal grado que puede cambiar de una región del sembradío y otra.

8.2.1 Selección de muestra

La muestra se constituye como aquella pulpa de café, obtenida como desecho después del proceso de despulpado de café de variedades arábicas cultivadas en el municipio de Jilotepec, Veracruz. Esta muestra se obtendrá a partir del método de cuarteo, con objeto de darle el valor estadístico correspondiente.



Mapa 1. Zona del sembradío tomado como área para la selección de la muestra. Municipio de Jilotepec Veracruz. Fuente: Google Maps.

Se marca con un marcador (en rojo) el sitio exacto de la zona de recolección, en las coordenadas geográficas 19.612034 de Latitud Norte y 96.957940 de Longitud Oeste.

8.2.2 Criterio de inclusión

- Muestras de pulpa de café obtenidas de uno a siete días después de ser desechadas.
- Sin proceso fermentativo de las mismas.
- Sin tratamientos químicos previos.

8.2.3 Criterio de exclusión

- Muestras mayores de siete días de haber sido desechadas.
- En estado de descomposición evidente.

8.2.4 Tamaño de la muestra

A la muestra obtenida por azar, cuya masa es de un kilogramo, se tritura y homogeniza hasta obtener textura uniforme, se le aplica la técnica por cuarteo que la lleva a una muestra final de 100 gramos para escala laboratorio y 1 gramo para micro escala.

8.2.5 Transporte

Las muestras fueron enviados a la ciudad de Morelia en frascos ámbar, estériles y herméticamente sellados, a temperatura ambiente, y su tiempo de recorrido fue de aproximadamente seis horas, para garantizar la frescura de la muestra, una vez recibida, la muestra se mantuvo en congelación, a -3°C por espacio de 48 horas

8.2.6 Verificación de la viabilidad de la materia prima como sustrato

Para determinar la viabilidad, de forma cualitativa, de poder aplicar la pulpa de café como sustrato para un proceso fermentativo, se realiza un proceso fermentativo previo, triturando este por medios mecánicos y diluyéndolo en agua, para obtener una mezcla que, sin esterilización previa, se inocula con un grano de pulpa de café, incubando a 37°C durante 24hrs.

8.2.7 Análisis bromatológico del Sustrato

Para identificar el tipo y la cantidad de sustratos metabolizables por rutas fermentativas presentes en el sustrato, definido primordialmente por la cantidad de carbohidratos presentes en la misma, se realiza un análisis bromatológico del mismo, para ello se envió una muestra de 200g al Laboratorio del Servicio Extrauniversitario de Análisis de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo el conocimiento de que trabajan bajo los métodos y técnicas autorizados por las Normas Oficiales Mexicanas.

8.3 Determinación de la carga microbiana y elección del microorganismo

8.3.1 Fermentaciones

Para los efectos de realizar los procesos de fermentación de manera controlada se decidió trabajar con una sepa de *Saccharomyces cerevisiae* de referencia, cuyas características se hayan utilizado con anterioridad en procesos fermentativos diversos, siendo la elegida la cepa ATCC 9763.

Con la muestra de pulpa de café debidamente caracterizada se realizaron tres procesos fermentativos de tipo cualitativo con el objeto de determinar lo siguiente:

- Técnica de esterilización
- Concentración del sustrato y posibilidad de añadir nutrientes adicionales
- Condiciones del proceso fermentativo; temperatura, agitación, oxigenación, entre otras.

Además se realizaron tres procesos fermentativos en los que se realizó la determinación cuantitativa de los siguientes parámetros para determinar las condiciones iniciales y finales de la fermentación:

- Concentración final de proteína (equivalente a proteína unicelular por crecimiento microbiano)
- Concentración de glucosa final

8.3.2 Determinación matemática de la viabilidad de producción de proteína

A través de cálculos matemáticos de determinación de proteína utilizando el método de Biuret (entendiendo que es una técnica muy sensible pero también susceptible de errores de precisión) utilizando la técnica de regresión lineal estadística y utilizando como datos los promedios de los procesos fermentativos cuantitativos se determinó la cantidad de proteína presente posterior al proceso de fermentación.

8.4 Técnicas de tinción

8.4.1 Tinción de Gram

La coloración de Gram tiene fundamental importancia en la diferenciación morfológica y



Figura 1, fuente Karina Ríos García, tinción de Gram, azul de metileno e hidróxido de potasio

taxonómica de las bacterias. Las bacterias se clasifican en dos grandes grupos según retengan el colorante o no el colorante de base usado en la tinción, que es violeta de genciana o el cristal violeta

Las bacterias Gram positivas aparecen con el citoplasma teñido uniformemente de color azul o violeta. Las bacterias Gram negativas se tiñen de rojo por el colorante

usado como contrastador (fucsina, safranina). La diferencia entre unas y otras radica en la composición química de la pared celular y su permeabilidad. La pared de las Gram negativas es más delgada y presenta un contenido lipídico diez veces mayor que el de las Gram negativas. Lo cual dificulta la tinción y la retención del colorante en el citoplasma.

8.4.2 Hidróxido de potasio

Es una tinción que se realiza con hidróxido de potasio al 10% que permite ver elementos como los hongos, ya que el hidróxido de potasio digiere parcialmente proteínas, pero no actúa sobre los polisacáridos de la pared celular de los hongos que se ven hinchados y agrandados.

8.4.3 Azul de metileno

Se utiliza para teñir células animales, es equivalente a la tinción por tinta china en donde los microorganismos no son destruidos ni afectados. Los microorganismos no se tiñen quedando marcadas como inclusiones claras en campo oscuro

8.5 Método para determinación de proteína

8.5.1 Método de Biuret

La absorción de luz por parte de una sustancia es una propiedad característica de ella, que puede ser utilizada para su identificación y cuantificación. Todas las sustancias absorben luz en alguna región del espectro electromagnético (VIS, UV, IR). La absorción de luz depende de la estructura química del compuesto absorbente, y en especial de ciertos grupos funcionales, de modo que es posible identificar un compuesto por medio de las características de su espectro de absorción.

Lambert y Beer demostraron que la absorbancia (A), también llamada densidad óptica (D.O.) de una sustancia es directamente proporcional a la concentración (c) de la sustancia absorbente, la longitud del paso de luz (l) (espesor de la solución) y una constante denominada coeficiente de extinción o coeficiente de absorción (a), que es característico para cada sustancia a una longitud de onda determinada (λ).

Para medir la absorbancia de una sustancia se utiliza el espectrofotómetro, instrumento destinado a medir la absorción por especies inorgánicas y orgánicas de luz monocromática en la región ultravioleta/visible del espectro. (bioquímica II, 2008)

Los espectrofotómetros dan la lectura directa de la absorbancia (A) o bien, el porcentaje de transmitancia (%T). La relación entre ambos es

$$A = 2 - \log \%T$$

8.5.2 Análisis espectrofotométrico

Todo método espectrofotométrico se basa en la comparación de la absorbancia de una sustancia de concentración desconocida con la de una solución de la misma sustancia cuya concentración se conoce y a la cual se le denomina solución patrón o estándar.

La absorbancia de una solución es la resultante de la absorbancia del soluto cuya concentración se desea conocer y la de otros componentes del sistema (solventes, reactivos) que absorben también a esa longitud de onda. Estos compuestos se denominan interferencias. Se debe descartar la absorbancia de las interferencias, para ello es necesario hacer siempre una muestra que contenga

todos los componentes del sistema menos aquel que se desea medir. Esta muestra se llama blanco y la absorbancia de este debe restarse a las muestras problema y a los patrones, o bien, con el blanco se calibra el instrumento a absorbancia igual a cero, ósea 100% de transmisión.

Uno de los métodos que se usan corrientemente para medir concentraciones de proteína, es el método de Biuret.

Los compuestos que tienen dos o más uniones peptídicas (péptidos y proteínas) dan color purpura característico cuando se trata con una solución alcalina de sulfato de cobre diluida. El color se debe aparentemente al complejo de coordinación del cobre con cuatro átomos de nitrógeno, pero requiere una alta concentración de proteínas para la formación de color. La sensibilidad del método es de 0,25 – 200 mg de proteínas por mm de disolución.

8.6 Método de Lowry

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer

Este método consta de dos etapas:

- 1) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
- 2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdico-fosfotungstico de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

El color natural de las proteínas en ausencia de cobre puede ser enteramente atribuido al contenido de tirosina y triptófano. Sin embargo, en presencia de cobre, el tratamiento alcalino de las proteínas resulta en un incremento de 3 a 15 veces en el desarrollo de color. La reacción con cobre toma de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, pero el calentamiento a 100°C o el aumento en la concentración de álcali acelera la reacción con cobre en solución alcalina. Se

requiere muy poco cobre para obtener un color final completo. Cuando el reactivo de Folin es adicionado a la proteína tratada con buffer, se obtiene un color máximo debido a la reducción del mismo por el complejo proteína cobre. El cambio en la absorbancia producido por la reducción del reactivo Folin es monitoreado a 750 nm.

8.7 Diagrama

Procedimiento general de trabajo:

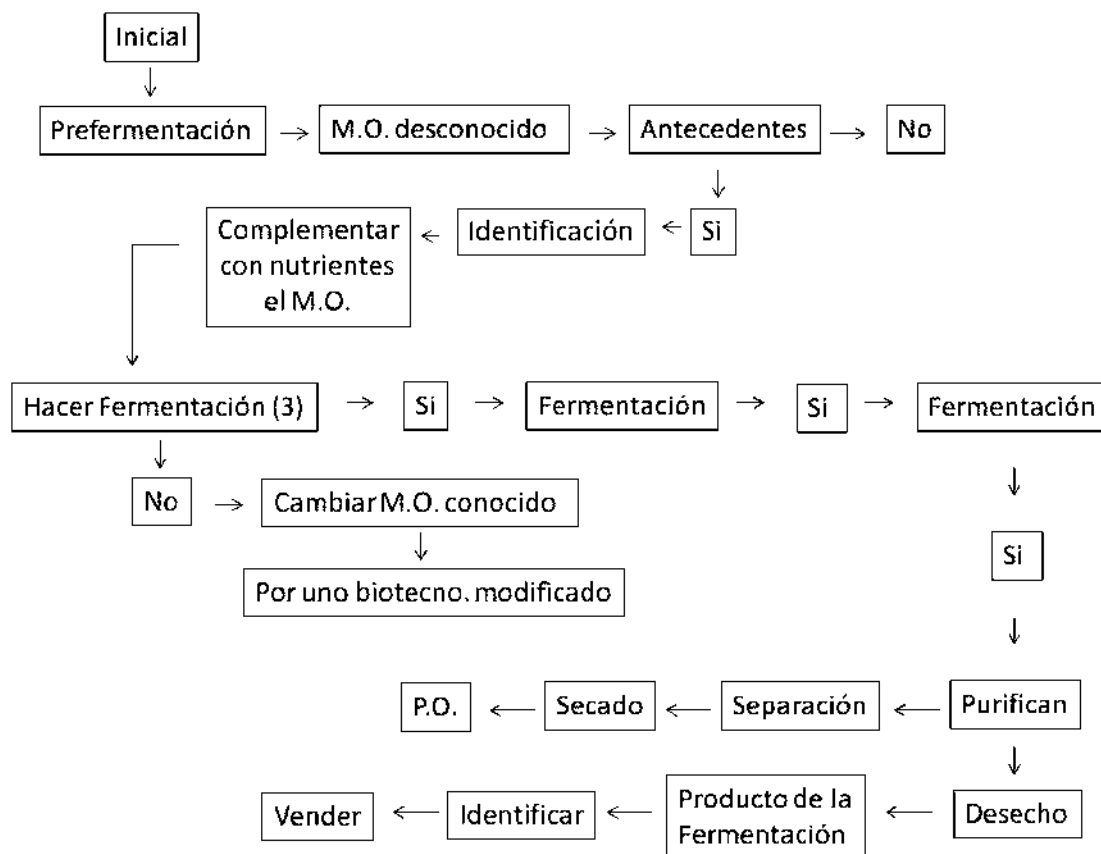


Figura2. Diagrama general del proceso de investigación.

9 Resultados



Figura 4. Método por el cual se sometió la muestra a una reducción de partícula



Figura 3. Terreno de cultivo donde fue tomada de forma aleatoria la muestra.



Figura 5. Toma de muestra de forma aleatoria del proceso de desecho de la pulpa de café.

Inicialmente, se toma una muestra de forma aleatoria de pulpa de café, de cultivo cafetalero ubicado en el municipio de la concepción, perteneciente a Jilotepec Veracruz México

Posteriormente se trabajó con 30 (treinta) gramos de pulpa de café y se adicionan cien mililitros de agua destilada, sometidos a proceso de cocimiento con objeto de degradar los macronutrientes a sustancias más pequeñas, además, se realizó la esterilización, además, se tomó la decisión de utilizar los desarrollos de crecimiento microbiano sobre la pulpa. Cabe señalar que este procedimiento se realiza para verificar la viabilidad del sustrato como fuente de nutrientes para el microorganismo, sin exponer, en una primera instancia, al microorganismo de referencia. Sin embargo, después de 24hrs de fermentación a 37°C sin agitación, no se obtiene resultado alguno, por lo que se deja 24hrs más en incubación, sin que exista evidencia alguna de fermentación sobre el sustrato.

Para verificar si existió crecimiento microbiano en el medio, aunque no haya habido fermentación evidente en la muestra, se realizó una serie de cultivos inoculando con la muestra, obteniéndose una gran cantidad de microorganismos que se desarrollaron en, tal como se muestra en las imágenes de la figura 6, mostrándose *Escherichia coli*, que fue atribuida a contaminación del medio, además de múltiples tipos de microorganismos,

incluyendo formas levaduriformes que captaron la atención desde el primer momento, estos resultados fueron comprobados a través de tinciones. A partir de este punto, se tomó la decisión

de no utilizar la mezcla pulpa con agua, sometida a cocción, sino pulpa de café directamente, sin ningún proceso de calentamiento, sin embargo

El procedimiento anterior permitió definir que es posible realizar un proceso fermentativo sobre la pulpa de café, demostrando que esta materia prima es un buen sustrato para la realización de un proceso fermentativo, y, al encontrar formas levaduriformes, cabe la posibilidad de utilizar la cepa de referencia sobre la que finalmente se realizaron los procesos de fermentación.



Figura6. Izquierda. Medio de Agar Sangre y Agar Chocolate, con crecimiento de Escherichia coli, contaminación microbiana. Centro. Medio de Agar Sabouraud, con crecimiento levaduriforme, Saccharomyces cerevisiae tomado de la cepa de referencia. Derecha. Matrices con pulpa de café, preparadas para proceso fermentativo.

Así mismo, se observó que el proceso de cocción causaba algún tipo de inconveniente en el sustrato, por lo que se decidió cambiar el tipo de esterilización de la pulpa de café, por un procedimiento que no utilizara calor, con lo cual se descartó automáticamente la esterilización en autoclave y se optó, de acuerdo a las condiciones de infraestructura, por un equipo que realiza esterilización por radiación Ultravioleta, siendo este un Transluminador Marca UVP, Modelo 2UV.



Figura 7. Tubos de caldo Lauril Sulfato de Sodio, que definirá el tiempo de esterilización por radiación UV.

Sin embargo, para comprobar la eficiencia de esta técnica y encontrar las condiciones adecuadas de esterilización, se colocó pulpa de café a esterilizar a diferentes intervalos de tiempo, siendo estos 30, 60 y 120 segundos, en baterías por triplicado, e inoculando directamente muestras de pulpa de café sobre caldo lauril sulfato de sodio, incubando a 37°C durante 24hrs. A los obteniéndose que en tiempo 30 segundos si existió crecimiento en todos los tubos, mientras que a los 60 segundos ya no se evidenció crecimiento alguno, siendo este tiempo el considerado

mínimo necesario para esterilizar la muestra, por lo que se decidió esterilizar la pulpa de café en tiempo 60 segundos, utilizando este equipo.

Bajo estas nuevas condiciones se realizó una nueva fermentación, utilizando de nueva cuenta 30g de pulpa sobre 100ml de agua destilada estéril, incubando a 37°C durante 24hrs, observándose ahora sí, un notable cambio en el medio, notorio por un evidente olor a alcohol, además de cambios notorios en el color (café oscuro a tonos más claros) y la consistencia.

Establecidas las condiciones iniciales, se puso en consideración la utilización de agitación, repitiendo el procedimiento anterior, bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo de fermentación, dos matraces en agitación y dos matraces sin agitación, observándose una notable diferencia entre ambos después del tiempo de fermentación, tanto en el color como en el grado de alcohol perceptible al olfato, por lo que se decide trabajar a partir de este momento bajo las siguientes condiciones.



Figura 8. Incubadora en la cual se colocaron las muestras para su posterior fermentación.



Figura 9. Cama ultravioleta, la cual fue utilizada para la esterilización del sustrato.

Temperatura: 37°C

Agitación: Si. 40 ciclos por minuto. Aproximadamente

Tiempo de fermentación: 24h

Oxigenación: Anaerobia. Se trabajó con solo la carga de Oxígeno presente al momento de iniciar el proceso.

Sustrato: 30 g de Pulpa de café disueltos en 100ml de agua destilada estéril.

Esterilización: 60 segundos en radiación UV para la pulpa

de café; 121°C, 15 minutos, 15lb/in² para el agua destilada, utilizando el Transluminador Marca UVP Modelo 2UV.

Para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos, se realizaron, bajo estas condiciones, tres procesos fermentativos, antecedidos, cada uno, por la determinación de la concentración de Glucosa presente y de proteína presente, corroborando los resultados, con el análisis bromatológico solicitado a un tercero, en este

caso, el Laboratorio del Servicio Extrauniversitario de Análisis de Alimentos, de la Facultad de Químico Farmacobiología, a los cuales, después del proceso fermentativo se le determinaba, nuevamente, Glucosa y Proteína, con objeto de medir cambios y determinar rendimientos. Es importante señalar que para la determinación de Glucosa se utilizó la técnica de por método colorimétrico por el método de Trinder o Punto Final, mientras que la de Proteína se realizó por el método de Biuret.

Se toman por tanto 30g de muestra de pulpa de café, previamente esterilizada en 60 segundos de radiación ultravioleta, y se diluyen en condiciones de esterilidad, en 100ml de agua destilada estéril, se toman en ese momento dos muestras que se pasan a tubos de ensaye y de inmediato a congelación para determinación de Glucosa y Proteína, se inocula con el microorganismo y se somete a fermentación, 24hrs a 37°C, tomando al cabo de este tiempo muestra para la determinación nuevamente de Glucosa y Proteína, bien puesta de inmediato en congelación o realizando rápidamente la determinación de ambas.

De esta forma, los resultados obtenidos en los distintos procesos fermentativos se muestran a continuación en promedios para facilitar la expresión de los resultados en solo un valor, maximizando la precisión.

Resultados del procedimiento fermentativo. Determinación de glucosa por espectrofotometría

Esta técnica se realizó por triplicado y lo que se muestra a continuación son los resultados promedio de dichas determinaciones que fueron comparadas con el análisis bromatológico realizado con un tercero.

Tabla 1. absorbancias de glucosa por el método de Trinder.

Absorbancia Estándar Glucosa	Absorbancia Muestra Problema	Glucosa (en gr)
0.101	0.18575	18.911gr

Resultado aproximado al del análisis bromatológico, por lo cual se considera válido. A continuación el cálculo obtenido en la cuantificación de Glucosa por el método de Trinder en la realización de las muestras problema, al inicio y al final de los procedimientos.

Tabla 2. Tabla inicial de absorbancia con resultado de determinación porcentual de glucosa.

Absorbancia Estándar Glucosa	Absorbancia Muestra Problema	Glucosa (en gr)
0.401	0.270	67.3317 mgr/dl

Muestra final. Absorbancia.

Tabla 3. muestra final, absorbancia y concentración final de glucosa.

Absorbancia Estándar Glucosa	Absorbancia Muestra Problema	Glucosa (en gr)
0.401	0	0

De aquí se obtiene la conclusión de que la Glucosa es totalmente consumida por el microorganismo en tiempo 24hrs, pudiendo ser menor dicho tiempo, pero, solo se realizó la determinación al principio y al final del procedimiento.

Resultados del proceso fermentativo. Proteína.

Tabla 4. Muestra inicial, absorbancia (promedio de los tres procedimientos de fermentación).

Absorbancia Blanco	Absorbancia Muestra 1
0	0.026

Tabla 5. Muestra final. Absorbancia (promedio de los tres procedimientos fermentativos).

Absorbancia Blanco	Absorbancia Muestra 1
0	0.542

El método de Biuret requiere para su realización de una curva de una solución de Albúmina Sérica Bovina a una concentración de 0.01 g/ml. Se realiza bajo el siguiente esquema:

Tabla 6. Determinación de absorbancia por método de Biuret.

Solución Patrón (μl)	Agua Destilada (μl)	Reactivo de Biuret (μl)	Muestra (μl)	Problema
0	1000	1500	0	
100	900	1500	0	
200	800	1500	0	
300	700	1500	0	
400	600	1500	0	
500	500	1500	0	
600	400	1500	0	
700	300	1500	0	
800	200	1500	0	
0	500	1500	500	
0	500	1500	500	

Para la determinación de la Absorbancia por el método de Biuret se realiza primero la curva patrón de Albúmina, la siguiente es la lista de resultados de absorbancia promedio después de realizar el procedimiento en tres oportunidades

Tabla 7. Absorbancia obtenida en muestra de producto fermentado luego de 24 horas de incubación. Método de Biuret.

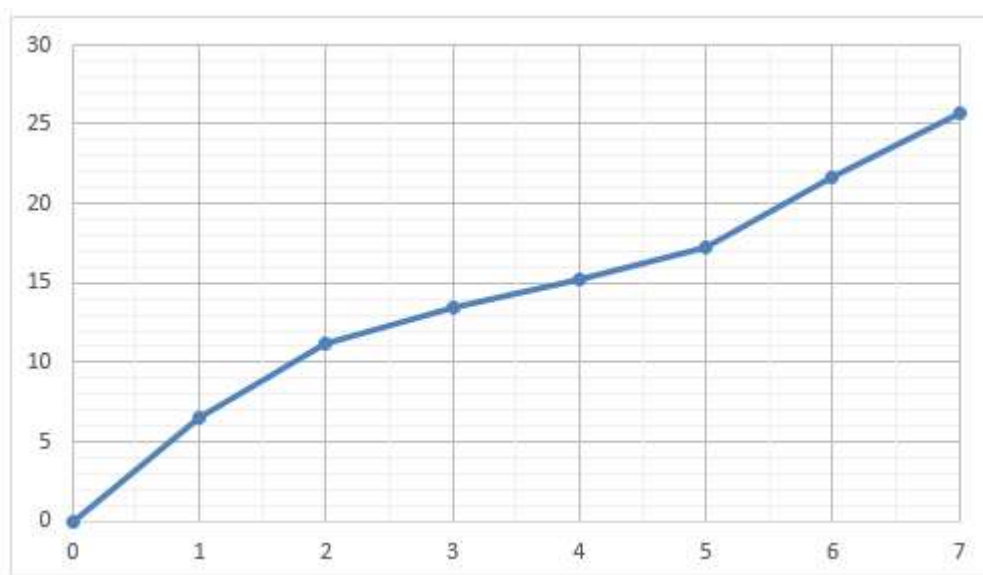
Tubo	Absorbancias
1	0
2	0.113
3	0.221
4	0.352
5	0.399
6	0.442
7	0.461
8	0.523

A continuación se realiza la gráfica de los resultados obtenidos en la curva patrón, y convirtiendo a mg/ml de muestra, con lo que se obtiene lo siguiente.

Tabla 8. Resultados obtenidos en la curva patrón y convirtiéndola a mg/ml de muestra.

Concentración mgr/ml	Absorbancia ($\times 10^{-2}$)
0	0
1	0.065
2	0.112
3	0.135
4	0.152
5	0.173
6	0.216
7	0.257

Lo cual genera la siguiente gráfica.



Gráfica 1. Curva patrón de Albúmina Sérica Bovina para determinación de Proteína por el método de Biuret

Como podemos apreciar, esta gráfica muestra una curva que nos impediría realizar las interpolaciones correspondientes de forma adecuada, por lo que se procede con el procedimiento de la regresión lineal para obtener una línea recta.

Tabla 9. Procedimiento de cálculo de la pendiente y el intercepto a fin de obtener la ecuación de regresión lineal.

n	Concentración (x10 ⁻³) gr/ml (x)	Absorbancia (x10 ⁻²) (y)	x ²	y ²	xy
1	0	0	0	0	0
2	1	6.5	1	42.25	6.5
3	2	11.2	4	125.44	22.4
4	3	13.5	9	182.25	40.5
5	4	15.2	16	231.04	60.8
6	5	17.3	25	299.29	86.5
7	6	21.6	36	466.56	129.6
8	7	25.7	49	660.49	179.9
Σ	28	111	140	2007.32	526.2

Para el cual se realiza el procedimiento de cálculo de la pendiente y el intercepto a fin de obtener la ecuación de regresión lineal.

$$m = \frac{(n \sum xy) - (\sum x \sum y)}{(n \sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$m = \frac{((8)(526.2)) - ((28)(111))}{((8)(140)) - ((28))^2} = \frac{1101.6}{336} = 3.279$$

Y para encontrar el valor del intercepto.

$$b = \frac{(\sum y \sum x^2) - (\sum x \sum xy)}{(n \sum x^2) - (\sum x)^2} = \frac{(111)(140)}{((8)(140) - (28)^2)} = \frac{806.4}{336} = 2.4$$

Siendo esta la ecuación de la recta que define el comportamiento de la curva patrón de Albúmina Sérica Bovina.

$$y = 3.279x + 2.4$$

Realizando de nuevo los cálculos para las absorbancias utilizando la fórmula correspondiente nos queda:

Tabla 10. Concentración de BSA contra Absorbancia en curva patrón de BSA para técnica de Determinación de proteína por el método de Biuret.

Concentración ($\times 10^{-3}$) gr/ml	Absorbancia ($\times 10^{-2}$)
0	2.4
1	5.678
2	8.957
3	12.23
4	15.51
5	18.79
6	22.07
7	25.35

En este punto ya estamos en posibilidad de analizar nuestras muestras problema, se describe enseguida la tabla que muestra la técnica de la curva de calibración más las muestras que se analizaron.

Tabla 11. Tabla de resultados de absorbancias, concentración de BSA y Concentración final de proteína obtenida por el método de Biuret. Fuente; Karina Rios. Investigación sobre café.

Concentración BSA mgr/ml	10	10	10	10	10	10	10	10	NA	NA
Volumen de BSA (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0	0
Volumen de la muestra (ml)	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5
Volumen de Agua Destilada (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.5	0.5
Volumen total del ensayo (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Absorbancia (570nm)	0.024	0.0568	0.0896	0.122	0.155	0.188	0.221	0.254	0.031	0.542
Concentración final (mgr/ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	?	?

A partir de esta tabla, y con la ecuación de regresión lineal que hemos obtenido, determinamos la concentración de proteína de nuestra muestra problema, empezamos con la muestra antes del proceso fermentativo.

$$y = 3.279x + 2.4$$

$$x = \frac{y - 2.4}{3.279} = \frac{3.1 - 2.4}{3.279} = 0.21348 \frac{mg}{ml}$$

Recordando que la muestra fue diluida a la mitad tenemos que la cantidad de proteína presente en la muestra es de:

$$x = (0.21348)(2) = 0.4270 \frac{mg}{ml}$$

Recordemos que la muestra estaba contenida en 100ml de solución, por tanto:

$$x = \left(0.4270 \frac{mg}{ml}\right)(100ml) = 427.0 \text{ mg}$$

Cantidad de proteína contenida en los 30gr de pulpa de café que se disolvieron en el agua. Según el análisis bromatológico del laboratorio del Servicio Universitario de Análisis de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacobiología, el contenido de proteína presente es de 1.5412% de proteína, por lo tanto, era de esperar 462.36mg de proteína, por lo que la diferencia entre ambos es del 7.64%.

Repetimos el procedimiento ahora pero para el cálculo de la muestra final, después del proceso fermentativo.

$$x = \frac{y - 2.4}{3.279} = \frac{54.2 - 2.4}{3.279} = 15.7974 \frac{mg}{ml}$$

$$x = (15.7974)(2) = 31.5950 \frac{mg}{ml}$$

$$x = \left(31.5950 \frac{mg}{ml}\right)(100ml) = 3159.50 \text{ mg}$$

Observando los resultados anteriores podemos obtener lo siguiente:

Proteína	inicial:	3159.50mg
Proteína final:	427mg	

$$Proteína = \frac{3159.50mg}{427mg} = 7.3993$$

Esto significa que hemos incrementado en más de 7 veces la cantidad de proteína presente en la muestra, con lo que queda matemáticamente demostrada la viabilidad del procedimiento fermentativo aplicado.

Otro método utilizado en la determinación de la proteína fue el método de Lowry lo cual dicho método fue descartado ya que en la comparación de los resultados obtenidos y comparados de los dos métodos, el método de Biuret resulta ser el método más aceptable para dicha determinación

10 Discusión de Resultados

Partiendo de la base que, en términos efectivos, la pulpa de café se constituye como un desecho industrial de la producción de café comercial, se observa que la cantidad de proteína unicelular que se produce es equivalente a aumentar en seis veces la cantidad original de proteína, lo cual lo convierte en una fuente viable para la obtención de proteína para consumo. Es particularmente importante porque si bien existen referencias del aprovechamiento de la pulpa de café para consumo animal no existen tales referencias para el consumo humano, *además si consideramos que en un periodo de cosecha de café se producen aproximadamente trescientas sesenta y nueve mil, quinientastoneladas de café al año*, (Sagarpa, 2013) puedo ser capaz de producir la cantidad aproximada de 27,529 kg de proteína apta para consumo humano, y teniendo como referencia que un adulto de 70kg en promedio requiere 20.44kg de proteína al año, estaríamos en posición de obtener el consumo para 1346 personas en todo un año a partir de los desechos de producción de café, por lo tanto la producción de proteína unicelular con pulpa de café resulta ser un método viable para dicha producción, y por lo tanto es viable para consumo

11 Conclusiones

Es accesible obtener residuos de la agroindustria cafetalera a bajos costos, debido a que no son aprovechados por los productores y principalmente son considerados como desechos.

Mediante el desarrollo de esta investigación se logró obtener una base sobre las condiciones adecuadas de un proceso fermentativo, sustituyendo la materia prima que habitualmente se utiliza para producir este tipo de proteínas por una fuente económica.

La importancia de lo anterior redunda en que puede considerarse, de forma adecuada y con los parámetros correspondientes, el uso de diversas materias primas de desechos industriales para la producción de alimentos, a un costo, como se ha mencionado, sumamente bajo.

Se percibió que no existen a nivel mundial, pero particularmente en nuestro estado y en nuestro país, la cantidad de procesos suficientes y adecuados que permitan dar reutilización y tratamiento adecuado a las miles de toneladas de desechos orgánicos generados por la industria agroalimentaria humana, por lo que podríamos sentar las bases de futuras técnicas y procedimientos adecuados de reciclaje de estos desechos.

Durante los procesos fermentativos se logró identificar cualitativamente un fuerte aroma alcohólico, característico de las fermentaciones de este tipo, que no se analiza por no corresponder directamente a la hipótesis planteada.

Es posible la producción de biomasa equivalente a proteína unicelular de manera eficiente, utilizando como sustrato la pulpa de café, a partir de un proceso fermentativo con el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El aprovechamiento de este residuo orgánico, permitirá dar un valor agregado a la pulpa proveniente de la agroindustria cafetalera, disminuir los problemas ambientales y promover la seguridad alimentaria en el país.

12 Futuras líneas de investigación

El presente proyecto de investigación y sus resultados obtenidos plantea una serie de futuras líneas de investigación, con las cuales, puede en primera instancia incrementar el conocimiento sobre este proceso fermentativo y posteriormente a su escalamiento. Entre las posibles líneas de investigación se encuentran:

- Identificación de una levadura, aislada durante los trabajos relacionados a este proyecto, y que, a las pruebas de identificación en distintos espacios públicos y privados no ha conseguido ser identificada, pudiendo tratarse de una especie nueva.
- Identificación del tipo de sustancia presente y cuantificación de la misma, apreciable cualitativamente ya que en todos los procesos fermentativos genero un fuerte olor alcohólico.
- Realizar el escalamiento del proceso para conseguir llevarlo a proceso de producción en mayores proporciones.
- Identificar y cuantificar el tipo de aminoácidos presentes, para determinar la viabilidad de la proteína producida para la producción de suplementos alimenticios humanos o simplemente para alimentación animal.

13 Bibliografía

- Bautista Buhigas, A. (2010). *Sistema biodigestor para el tratamiento de desechos orgánicos*. Leganés, España: Universidad Carlos III de Madrid. Escuela Politécnica Superior.
- Bioquímica II. (2008). En R. Merlos Rojas, & L. Arévalo León , *Manual de prácticas* (pág. 45). Morelia Michoacan .
- Bressani, R. (1979). *Pulpa de café: composición, tecnología y utilización*. Madrid, España: Española.
- Carrillo, M., & Zavala Cuevas, D. (2010). *Obtención de biomasa a partir de cáscara de café*. San Luis Potosí, México: RePEc.
- Chinappi Ciccolella, I., & Jerez Carrizo, A. (2008). Biodigestión Anaeróbica de la pulpa de café. Propuesta de saneamiento ambiental y ahorro energético. *Academia*, 75 - 83.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (01 de 01 de 2015). *Ganadería y deforestación* . Obtenido de Ganadería y deforestación : <http://www.fao.org/3/a-a0262s.pdf>
- Gualtieri, M., Villalta R., C., Díaz T., L., & Rondón, M. (2007). Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de Coffea arabica L. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 31 - 37.
- Jimenez, R. L. (12 de 09 de 2013). analisis del proceso de generacion y consolidacion de organizaciones torrefactoras orientadas a fortalecer el consumo del cafe en la region de coatepec, Veracruz. Xalapa , Veracruz, Mexico .
- Molina, M., Lechuga, O., & Bressani, R. (79 - 82). Valor nutritivo de la pulpa de café sometida a fermentación sólida usando *Aspergillus niger* en pollos y cerdos. *Agronomía Mesoamericana I*, 1990.
- Noriega Salazar, A., & Silva Acuña, R. (2009). Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje. *Zootecnia Trop.*, 135-141.
- Rathinavelu, R., & Graziosi , G. (2005). *Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café*. Organización Internacional del café.
- Rodríguez Valencia, N. (2013). Producción de alcohol a partir de la pulpa de café. *Revista Cenicafé*, 78 - 93.

Rodríguez Valencia, N., & Zambrano Franco, D. (2010). *Los subproductos del café: Fuentes de energía renovable*. Caldás, Colombia: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

Roux, C. (1984). *La herencia*. Barcelona, España: Herder.

Sagarpa. (2013). *Impactos Café*.

<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documents/cultivos/%2520Agroindustriales/Impactos/%2520Vaf%25C3%25A9.pdf>: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. *Revista de la sociedad Mexicana Biotecnología y Bioingeniería*, 14-46.

Suárez Agudelo, J. M. (2012). *Aprovechamiento de los residuos sólidos provenientes del beneficio del café, en el municipio de Betania Antioquia: usos y aplicaciones* (Doctoral dissertation).

Tamayo, L. M. A., Cartagena, C. J., & Londoño, J. (2011). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para mejorar la calidad sensorial y nutricional de productos avícolas. *Producción+ Limpia*, 6(1), 108-127.

Torres, J. G. (15 de Mayo de 2015). *¿Qué hacer con la pulpa de café?* Obtenido de Anacafe. Asociación Nacional de Café: http://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Usos_pulpa_de_cafe