



Nº6 Junio 2011

OBTENCIÓN DE BIOMASA A PARTIR DE CÁSCARA DE CAFÉ

María Luisa Carrillo Inungaray
Diana Zavala Cuevas
Brenda Alvarado Sánchez
Kidia Sarahí Morales Reyes
Pascasio Bautista Brígido

Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Unidad Académica Multidisciplinaria
México

maluisa@uaslp.mx

RESUMEN

La biomasa o “proteína unicelular”, es el producto del crecimiento de bacterias, levaduras, algas y hongos por medio de procesos fermentativos en desechos orgánicos. La producción de café genera varios subproductos como la pulpa, mucílago y el pergamino o cascarilla. Como la pulpa y el mucílago son eliminados por medio del agua de lavado, el pergamino o cascarilla es un subproducto que ocupa gran volumen y es una fuente importante de materia orgánica, por lo que es muy atractivo como sustrato para la producción de biomasa.

El propósito de este trabajo fue optimizar las condiciones para la producción de biomasa a partir de cáscara de café y utilizar este desecho de la industria cafetalera como materia prima para el crecimiento de la levadura *Candida utilis*. La cáscara de café se hidrolizó y se acondicionó con 3 g/L de urea, 2g/L de KH_2PO_4 y 1.3 g/L de extracto de malta; el pH se ajustó a 4.5. La mezcla preparada se esterilizó y se inoculó con la levadura *Candida utilis* ATCC-9256

previamente adaptada para utilizar el extracto ácido de café como sustrato; después se mantuvo durante 20 horas a 200 rpm y 30 °C. Después de este proceso de fermentación la biomasa producida se separó por centrifugación y se secó a 45 °C durante 48 horas.

A la biomasa obtenida se le determinaron proteínas por el método Kjeldahl, carbohidratos por el método Eynon Lane, lípidos por el método de Soxhlet y humedad por el método gravimétrico. Adicionalmente, a la proteína obtenida se le determinaron dos propiedades funcionales: capacidad de absorción de agua y capacidad de absorción de grasas. Se obtuvo un rendimiento de 3.83 g/L de biomasa, cuyo contenido de proteínas fue de 41.49%, 16.51% de azúcares totales, 4.07% de lípidos y 15.99 % de humedad. Los resultados obtenidos sugieren que la cáscara de café constituye un sustrato adecuado para la producción de biomasa.

Palabras clave: Cáscara de café, biomasa, *Candida utilis*, proteína unicelular.

ABSTRACT

Biomass or “unicellular protein,” is the product of the growth of bacteria, yeast, algae and fungi, obtained by means of fermentative processes on organic wastes. The production of coffee origins several byproducts such coffee pulp, slime and parchment or husks. Because coffee pulp and slime are eliminated via water of wash, the husk is the byproduct that represents a major volume and it's a very important source of organic material; therefore it is very attractive as a substrate for biomass production.

The purpose of this study was to optimize the conditions for biomass production from coffee husks and use this waste of the coffee industry as a raw material for the growth of the yeast *Candida utilis*. Coffee husk was hydrolyzed and conditioned with 3 g/L of urea, 2 g/L of KH_2PO_4 and 1.3 g/L of malt extract, pH was adjusted to 4.5. Prepared mixture was sterilized and inoculated with the yeast *Candida utilis* ATCC-9256, previously adapted to use the coffee extract acid as a substrate; then it remained for 20 hours at 200 rpm and 30 °C. After this fermentation process, biomass produced was separated by centrifugation and dried at 45 °C for 48 hours.

Protein by Kjeldahl method, carbohydrates by Eynon Lane method, lipids by Soxhlet method and moisture by gravimetric method, were determined to the biomass obtained. In addition, water absorption capacity and oil absorption capacity were measured to the obtained biomass. A yield of 3.83 g/L of biomass was obtained and its composition was: protein, 41.49%; total sugars, 16.51%; lipids, 4.07 % and moisture, 15.99%. The results suggest that coffee husk is a suitable substrate for the production of biomass.

Keywords: Coffee husks, biomass, *Candida utilis*, unicellular protein.

INTRODUCCIÓN

Actualmente el cultivo de café se ha extendido a toda la república mexicana, los principales estados que dominan su producción, se agrupan en cuatro regiones:

La vertiente del Golfo: la cual comprende los estados de San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla, México y Veracruz. La vertiente del Océano Pacífico: a la pertenecen los estado de Colima, Guerrero, Jalisco, Nayarit y parte de Oaxaca. La región Soconusco: la cual está conformada por gran parte de Chiapas -en esta región se produce una parte importante del café orgánico que es altamente demandado en los mercados de los Estados Unido y Europa- y la Región Centro Norte de Chiapas

Actualmente en el estado de San Luis Potosí, los productores de café de la Huasteca cosechan anualmente entre 15,000 y 17,000 toneladas del grano de calidad mundial que se cultiva en 13,000 hectáreas de esta región (Hernández Covarrubias, 2009).

La producción de café en estos municipios de la Huasteca Potosina genera varios subproductos como la pulpa de café, mucílago y el pergamino o cascarilla. En general, estos subproductos son desechados durante el procesamiento del café. La eliminación de estos residuos constituye un problema ambiental, ya que la pulpa y el mucílago (que se eliminan en mayor proporción) representan casi el total de la contaminación del agua (en expresada en términos de Demanda Química de Oxígeno o DQO) al ser

desechados con el agua de lavado (Rodríguez Valencia, n.d.). De ahí que exista la preocupación por buscar alternativas para una disposición sustentable de los residuos y darles un aprovechamiento, como es el caso de la obtención de biomasa. Este término, también conocido como “proteína unicelular”, se refiere al producto obtenido por bacterias, levaduras, algas y hongos crecidos por procesos fermentativos en desechos orgánicos (Gualtieri y Sánchez Crispín, 2003; Gutiérrez Ramírez y Gómez Rave, 2008).

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue comprobar si la cascarilla de café es adecuada para la producción de biomasa, con la finalidad de proponer una alternativa de uso para este residuo de la industria cafetalera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del sustrato

Como sustrato se empleó cáscara de café recolectada de un beneficio cafetalero ubicado en el municipio de Tamazunchale, S. L. P.

La cáscara de café se trituró empleando una licuadora, para tener un tamaño de partícula de aproximadamente 2 ó 3 mm. La cáscara se hidrolizó con H₂SO₄ al 2 % durante 4 horas, a una temperatura aproximada de 90-100 °C. El hidrolizado ácido se centrifugó a 3000 rpm a 0 °C por 15 minutos y después se decantó. Debido a la acidez del hidrolizado, el sobrenadante se ajustó a un pH de 4.5 con NaOH al 33 %, y se esterilizó a 15 libras de presión por 15 minutos, con la finalidad de inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados.

Microorganismo

En este trabajo se utilizó una cepa comercial de levadura de *Candida utilis* ATCC 9256, se descongeló a temperatura ambiente y se revitalizó en caldo extracto de malta a 25 °C por 24 horas, posteriormente se sembró en cuñas de Agar Papa Dextrosa (APD).

Ensayo de preadaptación y crecimiento

El ensayo de preadaptación y crecimiento tuvo como objetivo la adaptación de la levadura *Candida utilis* en el extracto ácido de la cascarilla de café, para lo cual se preparó el pie de cuba.

Preparación del pie de cuba

Se tomó una asada de la cepa de *Candida utilis* y se inoculó en tres tubos de Agar Papa Dextrosa a 25 °C por 24 horas. Posteriormente se tomó una azada de *Candida utilis* y se colocó en un matraz de 100 ml con 40 ml de sustrato ácido de cascarilla de café y se incubó por 20 horas, 30°C a 200 rpm; después se realizó una resiembra, se tomaron 10 ml y se pasaron a un matraz de 1 litro con 180 ml de sustrato, se incubó por 20 horas, 30 °C a 200 rpm; finalmente se tomaron del cultivo anterior 10 ml y se inocularon en un matraz de 1 litro con 200 ml de sustrato y se incubó.

Preparación del medio de cultivo

A 200 ml de sustrato, se le agregaron 0.6 g de Urea, 0.4 g de Fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4) y 0.26 g de extracto de malta- Posteriormente, la mezcla se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión por 15 minutos.

Fermentación aeróbica

Después de haber preparado el medio de cultivo y de proporcionar las condiciones para el crecimiento (nutrientes, pH, y temperatura) se continuó con la fermentación aeróbica. El medio de cultivo preparado se colocó en una estufa con agitación mecánica de 200 rpm durante 20 horas a 30 °C.

Separación de la biomasa

La biomasa de *Candida utilis* se recuperó mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos en una centrífuga marca Thermo IEC, Centra CL3R a temperatura ambiente; el sobrenadante se separó del precipitado con una pipeta beral. La biomasa se colocó en un vaso de precipitado y se incubó a 45 °C durante 24 horas para eliminar la humedad.

Análisis bromatológico

Se llevó a cabo el análisis bromatológico a la biomasa, el cual incluyó la determinación de proteínas, azúcares totales, lípidos y humedad.

Determinación de proteína

La determinación de proteínas, se realizó a la biomasa obtenida al final de la fermentación aeróbica, utilizando el método Kjeldahl usando equipo de la marca Buchi (Digestión Unit K424, Scrubber B-414 y Destillation Unit B-324).

Determinación de azúcares totales

La determinación de azúcares, se hizo al sustrato antes y después de la fermentación, así como a la biomasa producida. Estas determinaciones se hicieron por triplicado mediante la técnica de Eynon y Lane.

Determinación de lípidos

La determinación de lípidos se le realizó a la biomasa de *C. utilis*, por triplicado mediante extracción con éter de petróleo y calculados como porcentaje del peso después de evaporar el solvente.

Determinación de humedad

La determinación de humedad a la biomasa se hizo por el método gravimétrico, utilizando para el secado de la muestra un horno Lindberg Blue[®] y para la determinación de los pesos una balanza analítica OHAUS Mod. Adventurer[®].

Propiedades funcionales de la biomasa

A la biomasa de *C. utilis* obtenida en este trabajo se le determinó la capacidad de absorción de agua y la capacidad de absorción de grasa.

Capacidad de absorción de agua

Una suspensión acuosa de la biomasa seca (10% p/v), se agitó durante 30 s en un agitador Vortex y luego se agitó durante 30 minutos a 25°C. La preparación se centrifugó (3000 rpm/20 min) descartándose el sobrenadante. La diferencia entre el peso húmedo del sedimento y el peso seco inicial proporcionó la cantidad de agua absorbida, expresándose los resultados como g agua/g proteína.

Capacidad de absorción de grasa

Se mezclaron 4 mL de aceite de maíz con 0.5 g de la biomasa seca en un tubo de centrífuga. La mezcla se dejó reposar durante 30 min a 25°C y seguidamente se centrifugó (3000 rpm/25 min) descartándose el sobrenadante. La diferencia entre el peso del sedimento obtenido y el peso seco inicial proporcionó la cantidad de aceite retenido, expresándose los resultados como g aceite/g proteína.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con la finalidad de conocer el consumo de glucosa por parte de *C. utilis*, se determinaron los azúcares reductores del sustrato al inicio y al final de la fermentación aeróbica (Figura 1), obteniendo valores de 4.1% y 1.74% respectivamente, lo cual significa que existió una remoción de azúcares de 2.36% por parte de la levadura. Esto indica que la levadura es capaz de usar la cáscara hidrolizada de café como sustrato para obtener energía y reproducirse.

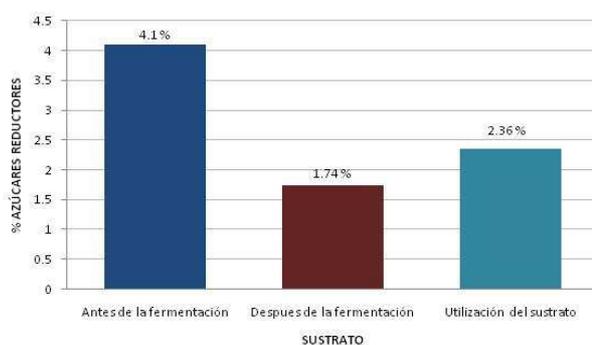


Figura 1. Contenido de azúcares en el sustrato de cáscara de café.

La cantidad de biomasa obtenida a partir de cáscara de café fue de 3.8 g/L, la cual es baja en comparación con lo reportado por otros autores para otros tipos de sustrato (Tabla 1). Sin embargo, al realizar el análisis bromatológico de la biomasa, ésta presentó un alto contenido de proteínas (Tabla 2), lo que indica que el sustrato no sólo afecta la cantidad de biomasa que se obtenga, sino también a la calidad de la misma.

Tabla 1. Cantidad de biomasa en peso seco reportada por diferentes autores.

Autores	Rendimiento en base seca (g/L)	Sustrato utilizado
Gualtieri <i>et al.</i> , 2007	10.00	Café
Hernández, 2009	2.96	Melaza
Carrillo <i>et al.</i> , 2010*	3.83	Cáscara de café
Muñiz <i>et al.</i> , 2010	13.8	Melaza

* Resultado obtenido en este trabajo

Al realizar el análisis bromatológico de la biomasa obtenida (Tabla 2), se destaca el elevado contenido de proteínas, en relación a los otros macronutrientes presentes en la muestra.

Tabla 2. Análisis bromatológico de la biomasa.

Determinación	Contenido (%)	Contenido (%)*
Proteínas	41.0	45-56
Carbohidratos	16.51	30-45
Lípidos	3.22	2-6
Humedad	15.99	70-75

*Datos reportados por Chacón (2004); Fajardo y Sarmiento (2007) Lemus de Bendix (2003).

En la biomasa producida en este trabajo se encontró un 41 % de proteínas. Al comparar estos resultados con los obtenidos por otros autores, se encontró que Gutiérrez Ramírez y Gómez Rave (2008) obtuvieron 49 % de proteína; Gualtieri *et al.* (2007); Lingmei Gao., *et al.* (2007) reportaron la obtención de 42% de proteína, los cuales son similares a los obtenidos en este trabajo; Ramírez Sucre (2006) y Wong y Muñiz (2010) reportaron una menor cantidad de proteínas en la biomasa que obtuvieron. Los resultados de este trabajo se atribuyeron a una buena hidrólisis de la cáscara, lo que aumentó la disponibilidad de fuente de energía para la levadura, al preenriquecimiento del sustrato y a que se cuidó que el pH fuera de 4.5, que es el pH óptimo para el crecimiento de la levadura (Gualtieri *et al.*, 2007). Así mismo, no hay que

descartar la posibilidad de que la biomasa no estuviera lo suficientemente seca antes de realizar la cuantificación de nitrógeno.

Al comparar la cantidad de nutrientes presentes en la biomasa de *C. utilis*, con el de alimentos convencionales (Tabla 3), puede observarse que el contenido de proteína es mayor que el de la leche, la carne y el huevo. Los lípidos se encuentran en menor cantidad que en la carne, el huevo y la leche. El contenido de carbohidratos es mayor que el del huevo, la leche y la carne. De acuerdo a estos resultados, se considera que si la biomasa de *C. utilis* empleada como suplemento en la elaboración de alimentos para consumo humano, contribuiría con un buen aporte nutricional.

Tabla 3. Comparación nutrimental de la biomasa obtenida en este trabajo con algunos alimentos convencionales.

Nutriente	% En diferentes fuentes alimenticias			
	Biomasa <i>C. utilis</i>	Huevo*	Leche*	Carne*
Proteína	41.00	12.5	3.3	15.2
Lípidos	3.22	11.1	3.6	20.5
Carbohidratos	16.51	0.40	5.0	0.0

*Fuente: Forschungsanstalt y München, 1991.

La Tabla 4 muestra el porcentaje de proteínas presente en diferentes alimentos y en la biomasa de *C. utilis*.

Tabla 4. Fuentes comunes de proteínas.

Fuente	Proteína (%)
Leche	3.3
Carne vaca	22.0
Carne cerdo	22.0
Carne pollo	19.0
Huevo	12.1
Biomasa de cáscara de café	41.0

(FAO, n.d.)

En relación a las propiedades funcionales de la biomasa, éstas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Propiedades Funcionales de la Biomasa de *Candida utilis*.

Propiedades funcionales	Resultado
Capacidad de absorción de agua	1.047 g agua/g proteína
Capacidad de absorción de grasa	0.304 g aceite /g proteína

Pacheco y Sgarbieri (1998) reportaron una capacidad de 3.71 g agua/g proteína para un concentrado proteico sin fosforilar y 5.11 g agua/g proteína para un concentrado proteico fosforilado. Estos resultados difieren con los obtenidos en este trabajo, lo que se atribuyó a que en esta investigación, la biomasa se empleó directamente sin realizar ningún concentrado proteico con ella; esta teoría se apoya en lo reportado por Cori *et al.* (2006) acerca de un aumento en la capacidad de absorción de agua cuando se elabora un concentrado proteico fosforilado, ya que los grupos fosfato (PO_4^{-3}) se introducen a las cadenas polipeptídicas, ocasionando cambios conformacionales y estructurales causando un aumento en las fuerzas de repulsión. Además, la presencia de dichos grupos aumenta la polaridad de las moléculas (solubilidad en agua), al tener mayor cantidad de oxígeno que puede formar puentes de hidrógeno con el agua.

Con respecto a la capacidad de absorción de grasa de la biomasa, los resultados de esta investigación fueron mayores que los reportados por Otero *et al.* (2000) (0.92 g aceite/g proteína) para un aislado proteico fosforilado de *Saccharomyces cerevisiae*, esto podría deberse a que con el aumento de las cargas negativas, como consecuencia de la fosforilación, es probable que los grupos no polares del aceite incorporado establezcan menos interacciones con las cadenas proteicas (Cori *et al.*, 2006), esto es lógico en razón de que a mayor polaridad (mayor solubilidad en agua), menor es la capacidad para la captación de grasas.

CONCLUSIONES

El bajo costo de obtención de la biomasa, el alto rendimiento en un periodo corto de tiempo y el valor nutritivo de la misma, permiten recomendar su uso de la cáscara de café para producir biomasa de *C. utilis*. Además, constituye una alternativa para el aprovechamiento de residuos agroindustriales.

La composición química de la biomasa, se considera de gran valor nutricional, ya que su aporte nutritivo de proteínas es mayor al de la leche, la carne y el huevo de gallina, y además contiene un bajo porcentaje de grasa respecto a éstos alimentos. Con la finalidad de proponer su uso en la elaboración de productos para consumo humano, se sugiere llevar a cabo la purificación de la biomasa, para disminuir el contenido de ácidos nucleicos.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por el apoyo brindado a este proyecto (Convenio **C10-FAI-05-63.92**). A las BQ. Mayra Aguilar Zárate y Carolina Eugenia Gil Solís, por su apoyo técnico para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cori de Mendoza M.E., Rivas N., Dorta B., Pacheco de Delahaye E. y Bertsch A. (2006). Obtención y Caracterización de dos concentrados proteicos a partir de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* cultivada en suero lácteo desproteínizado. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 16(03), 315-324.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (n.d.). Contenido de nutrientes en alimentos seleccionados. Obtenida el 30 de Junio de 2010, de <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s1x.htm>

Gualtieri A, M. J., Villalta R, C., Díaz T, L. E., Medina, G., Lapenna, E., y Rondón, M. E. (2007). Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arabica*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 38 (2), 111-130.

Gualtieri, M y Sánchez Crispín, J. A. (2003). Producción de proteína unicelular de levaduras crecidas en desechos de harina de maíz precocida (*Zea mays*). *Revista de la Facultad de Farmacia*, 45(2), 17-22.

Gutiérrez Ramírez, L.A y Gómez Rave, A.J. (2008). Determinación de proteína total de *Candida utilis* y *Sacharomyces cerevisiae* en bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación*, 5 (1) ,61-64.

Hernández Covarrubias L. (2009). Café de México. Produce la Huasteca 17,000 toneladas al año de excelente café. Obtenida el 31 de mayo 2010, de <http://www.oem.com.mx/elsoldesanluis/notas/n1245071.htm>

Lemus de Bendix, C. (2003). Proteína unicelular de levadura *Candida utilis* en jugo de pulpa de café. *Revista signos vitales*, 1(1), 13-15.

Lingmei Gao., Zhenming Chi., Jun Sheng., Xiumei N. y Lin, W. (2007). Single-cell protein production from Jerusalem artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis. *Applied Microbiol Biotechnol*, 77, (825–832).

Otero, M., Cabello, A., Vasallo M., García, L., y López, J. (2000). Tecnología para la utilización integral de la levadura de cerveza en la industria alimenticia. *Archivo Latinoamericano de Nutrición*, 50(4), 361-365.

Pacheco, M. y Sgarbieri, V. (1998). Hydrophilic and rheological properties of brewer's yeast protein concentrates". *J. of Food Sci.* 63(2), 238-243.

Ramírez Sucre, M.O. (2006). Uso de *Cándida utilis* para revalorización de cascarilla obtenida en el beneficio de café. Tesis de Licenciatura. Universidad de las Américas Puebla.

Rodríguez Valencia, N. (n.d.). Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. Obtenida el 3 de junio 2010, de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/acodal/xxx.pdf>.

Wong Paz, J.E. y Muñiz Márquez, D.B. (2010). Producción y purificación de biomasa a partir de melaza. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.