

EXTRACCIÓN, PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE PROTEÍNA OBTENIDA DE ALMENDRAS DE CAFÉ DEFECTUOSAS¹

Diana Lucia Castrillón-Monroy *; Campo Elias Riaño-Luna **

RESUMEN

CASTRILLÓN M., D.L.; RIAÑO L., C.E. Extracción, preparación y almacenamiento de proteína aislada de almendras de café defectuosas. *Cenicafé* 50(4): 299-312. 1999.

Se hizo la extracción de la proteína contenida en granos defectuosos de café, previamente molidos, desgrasados y descafeinados. Se extrajo hasta un 36,34%, siguiendo un diseño experimental completamente al azar, con un diseño de tratamientos compuesto central rotable 2^4+2^*4+7 de segundo orden y se logró el máximo cuando la relación de extracción fue de 1: 6,5 con un pH de 9 a 40°C, para un tiempo de extracción de 2 horas. La precipitación de la proteína contenida en la solución extractora se efectuó con sal y con ácido clorhídrico, y presentó el máximo en la concentración de 0,12M a un pH de 3,4. El contenido de proteína y las propiedades funcionales de los aislados variaron según el método de precipitación. El aislado precipitado con CaCl_2 contenía un 25% de proteína y el precipitado con HCl 56%. Ambos presentaron solubilidades de nitrógeno muy bajas y bajos niveles de espuma; todos los aislados tuvieron buena capacidad de hidratación, lo que sugiere su aplicación como absorbedor de agua en alimentos. También forman emulsiones estables con los lípidos.

Palabras claves: Aislado, proteína, café almendra defectuoso, propiedades funcionales, extracción, precipitación.

ABSTRACT

Protein contained in defective coffee grains was extracted previously grinding, defatting, and decaffeinating. Up to 36,36% was obtained, in a completely randomized design with a second order compound central rotatable treatment design 2^4+2^*4+7 , and the maximum was obtained when extraction ratio was 1:6.5 with pH 9, at 40°C, for 2 hours of extraction time. Protein contained in the extracting solution was precipitated with salt and hydrochloric acid, and was maximum at concentration 0.12 M, pH 3.4. Protein content and functional properties of the isolates varied according to the precipitation method. The isolate precipitated with CaCl_2 contained 25% protein and the isolate precipitated with HCl contained 56%. Both presented very low nitrogen solubility levels and low levels of foam. All isolates had good hydration capacities, which suggest their application as water absorbents in food. They also form stable emulsions with lipids.

Keywords: Isolate, protein, coffee defective almond, functional properties, extraction, precipitation.

¹ Fragmento de la tesis presentada a la Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales, para optar al título de Ingeniera Química.

* Becaria Colciencias. Programa Industrialización.

** Investigador Científico II. Programa de Industrialización. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La clasificación del café en almendra se realiza utilizando métodos mecánicos y en forma manual, cuando se trata de producto preparado para exportación. En este proceso se seleccionan muchos granos de café defectuosos en cantidades apreciables (6), que se denominan como café rípio. El rípio entonces comprende un conjunto de granos con gran variedad de defectos que deterioran la calidad de la taza, no es apto para bebida, no tiene uso comercial y genera pérdidas económicas; pero posee sustancias químicas que pueden tener aplicación industrial. Por tanto, se justifica la búsqueda de nuevas aplicaciones de este subproducto como base para la obtención de productos como los aislados de proteína. Las proteínas, como aislados o concentrados, son ingredientes esenciales para el procesamiento de alimentos (15). El tipo de aplicación de los aislados de proteína obedece a las propiedades finales que éstos presenten, como son: solubilidad de nitrógeno, espumación, capacidad de hidratación, actividad emulsiva y estabilidad de emulsión, entre otras (7).

Para la fabricación de aislados o concentrados de proteína se han utilizado diferentes materiales (5) como: trigo (17, 21), arroz (18), sorgo (19); soya (2, 14); semillas de girasol (10), maní (16) y otras semillas oleaginosas (18). Los cereales, por contener más del 12% de proteína y por ser cultivados en todo el mundo, son la fuente principal de proteína (8). El uso de productos proteínicos como componentes en alimentos constituye un avance comparativamente reciente. Las proteínas se usan como componentes nutritivos. Aunque existen diferentes formas de extracción, separación y purificación de las proteínas, todos estos métodos dependen del diferencial de solubilidad de las proteínas en solución acuosa. En general, se usa un ajuste de condiciones externas iónicas y de pH, para obtener la mínima interacción electrostática.

Después de la extracción de la proteína del material en donde se encuentra, es necesario

realizar una separación sólido - líquido (12), por adición de ácido o por adición de sal, con una posterior clarificación del extracto y recuperación del precipitado a través de un dispositivo de filtración simple o por centrifugación (5, 13).

El propósito de esta investigación fue establecer los valores máximos de extracción y de precipitación para la obtención de aislado de proteína a partir de café en almendra defectuoso y caracterizar este aislado con el objetivo de señalar sus posibles usos en la industria de los alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en Cenicafé, en Chinchiná, Caldas, en la planta piloto de Química Aplicada del Programa de Industrialización. En la Figura 1 se presenta el diagrama de flujo de la metodología utilizada para obtener el aislado de proteína.

Materia Prima. Se utilizó café en almendra defectuoso, obtenido en el beneficiadero de Cenicafé, con 6,88% de humedad (Medidor de humedad para café verde Kappa), 8,025% de grasas (Unidad de extracción de grasas Soxtec System HT 1430 de Tecator) y un contenido de proteína de 12,40% (%Nx 6,25) (Unidad de determinación de nitrógeno Kjeldahl Büchi, método micro-Kjeldahl)).

Mediante análisis sensorial se identificó en el grano un olor a fermento, color verde claro, picado por insectos y apariencia de poco cuticulado. El análisis granulométrico mostró un 79% de los granos con un tamaño mayor a 5,55mm (14/64"), un contenido total de pasilla del 14,8% clasificado como rípio y se procedió de la siguiente forma.

Preparación de la materia prima. El rípio se molió y se tamizó hasta un diámetro de partícu-

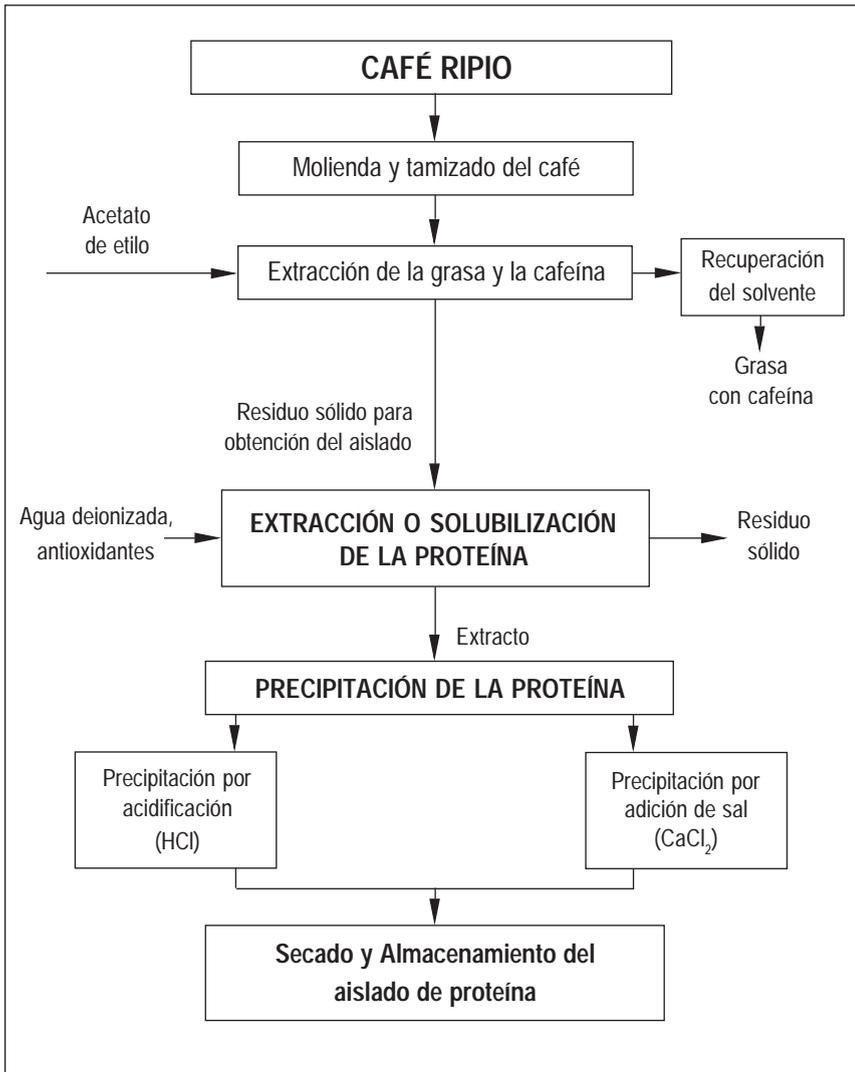


Figura 1. Diagrama de flujo para la obtención de aislamiento de proteína, a partir de café defectuoso.

la promedio de 0,79mm; se extrajo la grasa y la cafeína con acetato de etilo en una relación sólido solvente de 2:5 durante 7 horas (9), presentando un contenido de proteína de 13,45% (%Nitrógeno x 6,25). En la Tabla 1 se presenta la composición de proteína en café verde excelso, ripio y brocado; en esta se aprecia un contenido de proteína menor en el café excelso y uno mayor para el café brocado.

Extracción de Proteína. Se sometieron a extracción con agua deionizada 250g del preparado, con relación café:agua entre 1:2 y 1:8 (peso:volumen) definida para cada tratamiento con agitación constante (200rpm.) durante el tiempo de extracción propuesto entre 0,5 a 2 horas. El pH de extracción entre 5 y 9 se ajustó con solución de NaOH al 16% en peso, realizándose la extracción a $4 \text{ y } 40 \pm 1^\circ\text{C}$ definida para

TABLA 1. Contenido de proteína en varias denominaciones de café en almendra.*

Tipo de café verde	% de proteína (%N* 6,25)	
	Café	Café sin grasa
Café excelso	11,615	12,994
Café ripio	12,403	13,450
Café brocado		
Primer grado	14,30	15,050
Segundo grado	14,41	15,710
Tercer grado	14,90	16,200

* Determinado en esta investigación.

cada tratamiento. Se utilizaron antioxidantes debido a que los compuestos fenólicos del café se oxidan fácilmente, formando compuestos (quinonas) que se adhieren irreversiblemente a las proteínas, afectando la determinación de la proteína por el método Bradford (1). La concentración de los aditivos se fijó de acuerdo a la concentración final del antioxidante en el agua de extracción en las siguientes concentraciones: metabisulfito de sodio 10mM, polivinil polipirrolidona (PVPP) 0,1% en peso y dietilditiocarbamato de sodio (DIECA) 10mM (1).

La mezcla resultante presenta las características de un lodo y fue separada en un filtro de tela muselina para obtener la fase líquida. Se retiró una alícuota para el análisis y la medición de proteína extraída en cada tratamiento. Los extractos se refrigeraron para su posterior precipitación con HCl 1N y CaCl₂ sólido, de acuerdo al método de precipitación.

La extracción de proteína se analizó mediante un diseño experimental completamente al azar, con un diseño de tratamientos compuesto central rotatable de segundo orden para cuatro factores de precisión uniforme (14): la temperatura (Tem), el pH, el tiempo de extracción y la relación café: agua deionizada (Rela). Se utilizó un diseño de $2^4 + 2*4 + 7$ (Tabla 2), para un total de 31 tratamientos con cuatro repeticiones cada uno. La variable de respuesta fue la cantidad de proteína extraída en cada tratamiento, que fue medida por el método Bradford, en miligramos por gramo de ripio y expresada con una ecuación de segundo orden para los cuatro factores.

Precipitación de la Proteína. Se hizo la precipitación de la proteína en solución mediante acidificación o precipitación isoelectrica y adicionando sal (cloruro de calcio) (2). En los dos métodos se agregó el agente precipitante bajo agitación continua por 5 minutos a temperatura

TABLA 2. Factores por evaluar en sus diferentes niveles, para la extracción de proteína del café en almendra defectuoso.

Factores	Niveles				
	-2	-1	0	1	2
Código					
Temperatura (°C)	4,0	13,0	22,0	31,0	40,0
pH	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
Relación w/v	1 : 2,0	1 : 3,5	1 : 5,0	1 : 6,5	1 : 8,0
Tiempo (horas)	0,50	0,875	1,25	1,625	2,00

ambiente; luego se congeló la solución a -7°C , para romper la suspensión coloidal formada en la insolubilización de la proteína; una vez descongelada la suspensión se recuperaron los precipitados por filtración en tela muselina. Los precipitados se lavaron con agua deionizada y finalmente, se secaron en estufa al vacío durante 24 horas a 50°C y 15 pulgadas de mercurio.

Determinación de las condiciones de precipitación. Se evaluaron, en primera aproximación, las condiciones de pH y concentración final de cloruro de calcio (CaCl_2) donde la proteína presentaba solubilidad mínima, para la precipitación por acidificación con HCL y por adición de sal, respectivamente. Los resultados mostraron una gran variación, razón por la cual se seleccionaron rangos de pH entre 2,2 y 5,5 y concentraciones de CaCl_2 entre 0,03 y 0,14M.

El procedimiento para esta determinación fue llevado a cabo vertiendo 25ml del extracto en tubos de centrifuga tarados, donde fue añadido el precipitante (HCL 1N y CaCl_2 sólido, respectivamente) cuidadosamente para conseguir los valores del rango de pH y concentración final de sal escogidos. La mezcla en cada tubo se agitó durante 5 minutos y luego se hizo una centrifugación a 10000rpm, durante 25 minutos, con el fin de separar el precipitado y pesarlo.

Se empleó un diseño completamente al azar con seis repeticiones; la variable de respuesta fue la cantidad de precipitado expresada en gramos, obtenida para cada valor de pH y cada valor de concentración final de sal.

Caracterización del aislado. Determinadas las condiciones óptimas de extracción y precipitación mediante el análisis estadístico, se obtuvo el aislado de proteína y se caracterizó determinando las propiedades físicas y químicas del aislado obtenido mediante los dos métodos de precipitación utilizados, y durante el almacenamiento luego de tres meses de congelados. Se evaluaron en ellos las propiedades funcionales.

En total se efectuaron 10 determinaciones para cada variable por cada aislado, en dos tiempos de almacenamiento.

Las propiedades medidas a los aislados fueron: porcentaje de humedad (anализador de humedad Mettler LJ16) y contenido de proteína cruda por método Kjeldahl. Para la determinación del perfil de solubilidad de nitrógeno para cada uno de los valores de pH en el rango de 2,1 a 10,5, siguiendo el método descrito por Wu, (21) se midió la capacidad de hidratación utilizando el procedimiento 56-20 de AACC (2). La formación de espuma, la actividad emulsiva y la estabilidad de la emulsión se llevaron a cabo por los métodos descritos por Yasumatsu *et al.* (22).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de Proteína. En el análisis de varianza de esta variable (Tablas 3 y 4), se encontraron como significativos la regresión y los componentes lineal y cuadrático, así como su interacción. El modelo cuadrático presentó como parámetros estimados significativos: el intercepto, el pH, el tiempo, el pH al cuadrado, la relación al cuadrado, las interacciones entre la relación de extracción y la temperatura y el tiempo y la relación de extracción, con nivel de significancia del 5% (Tabla 5) y fueron señalados como los de mayor aporte al modelo. En el análisis de varianza (Tabla 6) se encontró que el pH, la relación de extracción y el tiempo, tienen efecto significativo en la cantidad de proteína extraída mientras que la temperatura no, como en lo registrado por Liadakis *et al.* (12) para harina de semillas de tomate.

Es necesario destacar que la falta de ajuste fue altamente significativa, con un nivel de significancia menor del 5%. Esto indica que el modelo escogido no es adecuado o bien, que existe una fuente de variación no controlada en la experimentación.

TABLA 3. Análisis de la superficie de respuesta obtenida de la extracción de proteína del café en almendra defectuoso.

Regresión	Grados de libertad	Suma de cuadrados tipo I	Prob > F
Lineal	4	50677875	0,0000
Cuadrática	4	15061470	0,0018
Interacción	6	18698850	0,0018
Regresión total	14	84438195	0,0000

TABLA 4. Análisis de la superficie de respuesta de la extracción de proteína de café en almendra defectuoso.

Residual	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Prob > F
Falta de ajuste	10	2923410	0,0000
Error Puro	99	606297	
Error Total	109	818876	

TABLA 5. Análisis de varianza. Parámetros estimados del modelo cuadrático obtenido en la extracción de proteína del café en almendra defectuoso.

Parámetros	Grados de libertad	Parámetros estimados	Error Estándar	Prob> ½T½
Intercepto	1	22013	6970,027	0,0021*
TEM	1	-224,717	120,053	0,0639
PH	1	-3784,365	1366,424	0,0066*
RELA	1	-619,591	836,778	0,4606
TIEMPO	1	-7993,389	2983,407	0,0085*
TEM*TEM	1	1,019	1,052	0,3349
PH*TEM	1	0,442	12,568	0,9720
PH*PH	1	224,375	85,231	0,0097*
RELA*TEM	1	28,495	9,988	0,0052*
RELA*PH	1	75,629	89,894	0,4020
RELA*RELA	1	-106,703	38,892	0,0071*
TIEMPO*TEM	1	14,644	33,514	0,6630
TIEMPO*PH	1	565,473	301,630	0,0635
TIEMPO*RELA	1	768,444	239,710	0,0018*
TIEMPO*TIEMPO	1	-57,239	606,052	0,9249

* Nivel de significancia menor del 5%

TABLA 6. Análisis de varianza para la extracción de proteína del café en almendra defectuoso.

Factor	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prob > F
TEMPERATURA	5	1713366	0,0718
pH	5	2326261	0,0000
RELACIÓN	5	5998384	0,0000
TIEMPO	5	9843349	0,0189

Modelo matemático.

$$\begin{aligned} \text{PROTEINA (mg)} = & 22013 - 224,717 * \text{Tem} - \\ & 3784,365 * \text{pH} - 619,591 * \text{Rela} - \\ & 7993,389 * \text{Tiempo} + 1,019 \text{Tem}^2 + \\ & 0,442 * \text{pH} * \text{Tem} + 224,375 * \text{pH}^2 + \\ & 28,495 * \text{Rela} * \text{Tem} + 75,629 * \text{Rela} \\ & * \text{pH} - 106,703 * \text{Rela}^2 + 14,644 * \\ & \text{Tiempo} * \text{Tem} + 565,473 * \text{Tiempo} * \\ & \text{pH} + 768,444 * \text{Tiempo} * \text{Rela} - \\ & 57,239 * \text{Tiempo}^2. \end{aligned}$$

$$r^2 = 0,4861 \quad \text{CV} = 38,37 \quad \langle\langle 1 \rangle\rangle$$

Con la ecuación cuadrática se puede estimar el conjunto de condiciones de trabajo para los factores que maximizan la respuesta; este conjunto se denomina punto estacionario. Una vez hallado éste, es necesario explorar la superficie de respuesta en la vecindad inmediata de este punto y determinar la naturaleza del punto estacionario (13).

Una técnica para hacer esta exploración es el análisis canónico (4), el cual consiste en transformar el modelo en un nuevo sistema de coordenadas con el origen en el punto estacionario. Esta transformación permite ubicarse en el punto crítico y desplazarse en cualquier dirección y así, analizar cuál factor hace que la respuesta varíe con mayor o menor rapidez.

A partir del análisis canónico del modelo ajustado de superficie cuadrática se localizó el

punto estacionario en las condiciones mostradas en la Tabla 7, valores que estuvieron dentro de la región explorada; en éste, la cantidad de proteína extraída calculada fue de 2202,66mg. Los valores propios (λ_i) de la matriz (Tabla 8), indicaron el punto estacionario como un punto de silla, puesto que presentan signos positivos y negativos. Las magnitudes de los valores propios y los componentes de los vectores propios muestran que el pH y la relación son los factores que más influyen en la cantidad de proteína extraída.

En vista de que el punto estacionario, como punto de silla, no definió las condiciones para un máximo, se hicieron las gráficas de las superficies de respuesta con ayuda del modelo matemático y el programa estadístico SAS. Con estas superficies se observó el comportamiento de la cantidad de proteína extraída de acuerdo al pH y la relación café:agua para cada temperatura y tiempo evaluados. Se obtuvieron 25 gráficas en total, de las cuales se observaron en común dos formas de superficie: forma de silla (Figura 2) y una superficie ascendente (Figura 3).

Como se estaba buscando la cantidad máxima de proteína extraída, se determinaron los valores más altos en cada gráfica y las condiciones en que éstos ocurrieron. Se obtuvo una cantidad mayor en las condiciones más altas evaluadas: 40°C, pH=9, relación de extracción de 8 y tiempo de extracción de 2 horas, para

TABLA 7. Análisis canónico de superficie de respuesta para la extracción de proteína de café en almendra defectuoso.

Factor	Valor crítico	
	Codificado	Sin codificar
TEMPERATURA	-0,238	17,704
pH	-0,552	5,896
RELACIÓN	-0,302	5,896
TIEMPO	-0,053	1,210

* Basado en datos codificados.

TABLA 8. Valores y vectores propios para la extracción de proteína del café en almendra defectuoso.

Vectores propios				
Valores propios (λ_i)	Temperatura	PH	Rrelación	Tiempo
1313.918	0,3471	0,7079	0,3738	0,4885
681.733	0,7180	-0,6063	0,3183	0,1247
-87.112	-0,5202	-0,3624	0,1896	0,7497
-1673.323	-0,3053	0,0034	0,8503	-0,4286

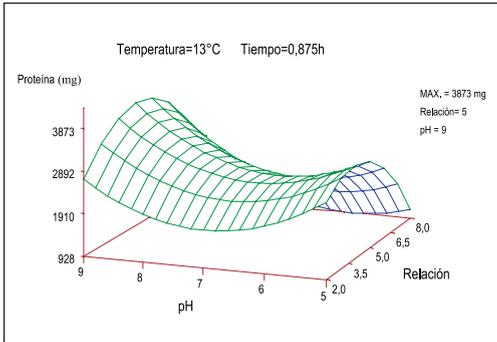


Figura 2. Superficie de respuesta para una temperatura de 13°C y 0,875 horas de tiempo de extracción.

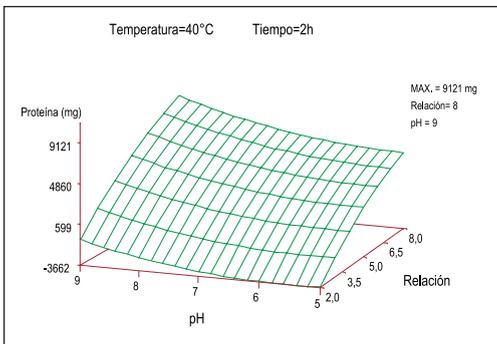


Figura 3. Superficie de respuesta para una temperatura de 40 °C y 2 horas de tiempo de extracción.

9136mg de proteína. Sin embargo, para hacer una selección final de las condiciones adecuadas se tuvieron en cuenta aspectos económicos y de manejo de las variables. Se examinó la relación café:agua de 1:8, la cual implica el manejo de grandes volúmenes y cantidades importantes de antioxidantes cuyos costos son

altos. Por esta razón, se seleccionó la relación 6,5 a la cual se obtiene una cantidad apreciable de proteína extraída, confrontada con los demás valores de las relaciones. Con la relación escogida las otras variables no implicaron una diferencia considerable en los costos, por lo cual no se cambiaron y, de acuerdo al modelo, se estimó una cantidad de proteína extraída de 7.350mg.

Se estimó una eficiencia de extracción del 90,36% (cantidad de proteína extraída por proteína total en la materia prima), teniendo en cuenta que la cantidad de proteína en el café almendra defectuoso utilizado fue de 34,95mg por gramo de café (determinado por análisis de proteína por método Bradford) y partiendo de 250g de café almendra defectuoso, en las condiciones adecuadas. La proteína obtenida experimentalmente bajo estas condiciones fue de 4.115mg (50,53% de eficiencia), en promedio.

En la Tabla 9 se registraron las condiciones determinadas como adecuadas para la extracción de proteína.

Precipitación. Se realizó un análisis de varianza y el análisis de regresión para la variable de respuesta, peso del precipitado (expresado en gramos), para cada método de precipitación y con un nivel de significancia del 5%.

Precipitación por acidificación. El modelo cuadrático del pH explicó un 87% de la variación de la cantidad de proteína precipitada (PRECIPH), con un coeficiente de variación de 13,02. Los parámetros estimados (Tabla 10)

TABLA 9. Condiciones óptimas para la extracción de proteína, del café en almendra defectuoso.

TEMPERATURA	PH	RELACIÓN	TIEMPO
40 °C	9	6,5	2 horas

TABLA 10. Parámetros estimados para el modelo cuadrático de la respuesta del precipitado de proteína obtenido por acidificación.

	Grados de libertad	Estimado	Error Estándar	Pr > ½T½
Intercepto	1	-0,281	0,0616	0,0000
pH	1	0,381	0,0335	0,0000
pH ²	1	-0,058	0,0043	0,0000

fueron altamente significativos, lo cual expresó que todos aportaron a la construcción del modelo y la cantidad de proteína precipitada calculada para diferentes valores de pH, fue confiable. El máximo en la cantidad de proteína precipitada se presentó para un valor de pH de 3,4; a partir de este valor la cantidad de proteína precipitada disminuyó a medida que aumentó el pH (Figura 4).

Precipitación por adición de sal. El modelo cuadrático de la concentración final de la sal (Tabla 11) explicó el 79% de la variación de la proteína precipitada. La relación de proteína precipitada (PRECISAL) se incrementa con el

aumento de la concentración de sal (CaCl₂), presentándose el máximo a una concentración de 0,124M, a partir de la cuál la proteína precipitada disminuye (Figura 5).

Con el extracto obtenido en los puntos máximos de los procesos de extracción se elaboraron aislados a las condiciones de pH y concentración de CaCl₂ máximas definidas para cada método de precipitación.

A estos aislados se les determino la proteína cruda por el método micro-Kjeldahl; los aislados precipitados con ácido clorhídrico tuvieron

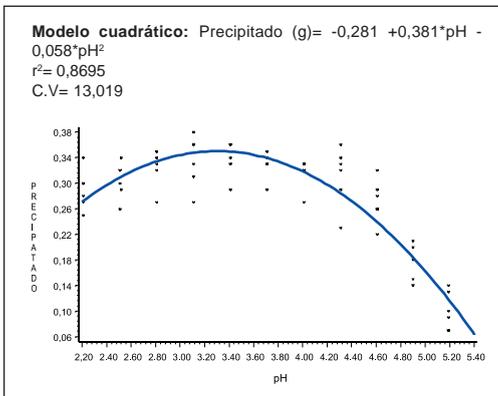


Figura 4. Precipitación de aislado de proteína por acidificación.

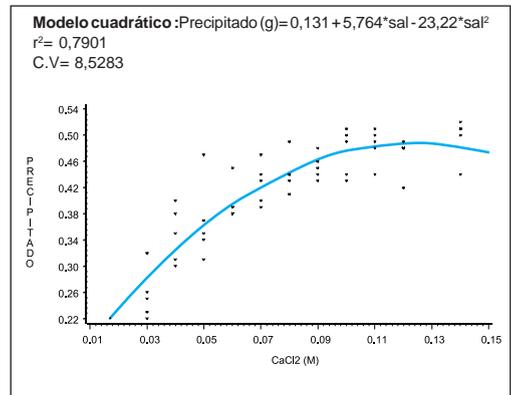


Figura 5. Precipitación de aislado de proteína por adición de sal (CaCl₂).

TABLA 11. Parámetros estimados para el modelo cuadrático de la respuesta del precipitado obtenido mediante adición de sal.

	Grados de libertad	Estimado	Error estándar	Pr > ½T½
Intercepto	1	0,131	0,029	0,0000
Sal	1	5,764	0,769	0,0000
Sal ²	1	-23,22	4,534	0,0000

un promedio de 55,87% de proteína y 4,5% de humedad, y los aislados precipitados con cloruro de calcio tuvieron 25,21% de proteína y 9% de humedad.

Propiedades funcionales del aislado de proteína. La funcionalidad de los aislados obtenidos, utilizando las condiciones máximas halladas, tanto para la extracción como para los dos métodos de precipitación, se determinó para dos tiempos de almacenamiento 1 y 3 meses. Los cambios en los promedios de las variables representativas de las propiedades funcionales respecto al tiempo para cada aislado y las de los dos aislados obtenidos por los dos métodos de precipitación utilizados, se midieron a través de pruebas de T pareadas y no pareadas, respectivamente

Perfiles de solubilidad de nitrógeno. La diferencia en la solubilidad de nitrógeno según el tiempo de almacenamiento (1 y 3 meses) en los diferentes valores de pH, se evaluó con una

prueba de T pareada (Tablas 12 y 13); sólo se observaron diferencias significativas a pH básicos de 8,1 y 10,5. Los porcentajes de nitrógeno soluble obtenidos a valores de pH entre 2,1 a 10,5, para los aislados de proteína de café, se muestran en la Figura 6. Los porcentajes de nitrógeno soluble se relacionaron con los valores de pH en cada uno de los tiempos de almacenamiento, presentando éstos, tendencias cuadráticas altamente significativas para los aislados precipitados por acidificación, con porcentajes de nitrógeno mínimos de 1,44 a pH 4,04 (para el primer mes) y 1,204 a pH 4,12 (a los 3 meses) y para el precipitado con sal un mínimo de 0,51 a pH 3,43 para el primer mes. Los valores del coeficiente R² (variación explicada) fluctuaron entre 0,803 a 0,906.

Aislado por acidificación:

$$\% \text{ nitrógeno} = 2,423 - 0,487 * \text{pH} + 0,060 * \text{pH}^2$$

$$R^2 = 0,8182 \text{ (el primer mes)} \quad \ll < > \gg$$

TABLA 12. Prueba T pareada para la solubilidad de nitrógeno a 1 y 3 meses, del aislado de proteína obtenido de café defectuoso por acidificación.

pH	No. Observaciones	Media de las diferencias	Error Estándar	Prob> T
2,10	6	0,0333	0,1525	0,8357
3,30	6	0,2766	0,1273	0,0817
4,50	6	0,2545	0,1136	0,0752
5,70	6	0,2096	0,0881	0,0633
6,90	6	0,0266	0,2228	0,9094
8,10	6	-0,5111	0,0637	0,0005*
9,30	6	-0,4150	0,2368	0,1401
10,50	6	-1,1400	0,2936	0,0116*

*Significativas, con nivel de significancia menor del 5%

TABLA 13. Prueba T pareada de la solubilidad de nitrógeno a los 1 y 3 meses, del aislado de proteína obtenido de café defectuoso, mediante adición de sal.

pH	No. Observaciones	Media de la diferencia	Error Estándar	Prob> T
2,10	6	0,2126	0,0574	0,0140*
3,30	6	0,0655	0,0662	0,3681
4,50	6	0,0616	0,0345	0,1338
5,70	6	0,1665	0,1013	0,1613
6,90	6	0,0596	0,0844	0,5113
8,10	6	0,2125	0,0264	0,0005*
9,30	6	0,0411	0,1536	0,7994
10,50	6	0,2641	0,0714	0,0140*

* Significativa, con nivel de significancia menor del 5%

$$\% \text{ nitrógeno} = 2,812 - 0,780 * \text{pH} + 0,095 * \text{pH}^2$$

$$R^2 = 0,9057 \text{ (a los 3 meses)} \quad \ll<3>>$$

Aislado por adición de sal:

$$\% \text{ nitrógeno} = 0,599 - 0,049 * \text{pH} + 0,007 * \text{pH}^2$$

$$R^2 = 0,8030 \text{ (el primer mes)} \quad \ll<4>>$$

En general, los aislados tuvieron muy bajas solubilidades de nitrógeno, observándose valores mayores para los aislados precipitados con ácido.

Hidratación, actividad de emulsión, estabilidad de emulsión y espuma. Las propiedades funcionales se determinaron y compararon con los valores de las propiedades de un aislado de soya (Tabla 14) extraído a pH=9 (3).

La capacidad de hidratación (peso de agua por gramo de muestra) fue buena para todos los aislados y menor que la presentada por el aislado de soya; esto sugiere su uso como agente absorbente de agua en alimentos. En general, los valores para la actividad de emulsión y estabilidad de emulsión observados estuvieron por encima del 50%, lo que posibilita su aplicación como emulsivo de lípidos. Los valores para la formación de espuma en los aislados fueron muy bajos respecto a los reportados por Betschart *et al.* (3) para aislado de proteína de girasol.

En el aislado obtenido por precipitación con ácido se encontraron diferencias significativas en la mayoría de las propiedades (Tabla 15) excepto en la actividad de emulsión, en el primer y tercer mes. En el aislado precipitado con sal (Tabla 16) todas las propiedades funcionales presentaron diferencia en los mismos tiempos.

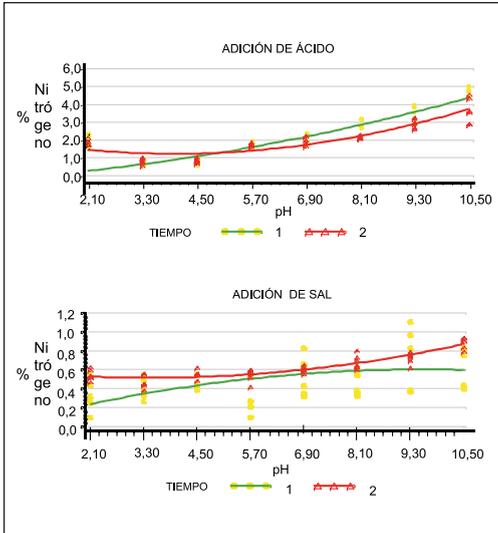


Figura 6. Solubilidad de nitrógeno de los aislados de proteína de café precipitados por adición de sal y por acidificación.

1: 3 meses de almacenamiento.
2: 1 mes de almacenamiento.

TABLA 14. Algunas propiedades funcionales del aislado de proteína, obtenida del café en almendra defectuoso.

Aislado de Proteína	Tiempo de almacenamiento	Capacidad de hidratación	Actividad % de emulsificación	Estabilidad de emulsión %	Espumación %
Sal**	3 meses	2,283	54,41	54,94	20,78
1 mes	2,394	63,17	62,32	26,67	
Ácido	3 meses	2,509	52,21	25,51	34,39
1 mes	2,251	50,37	45,10	26,40	
Soya*		3,100	51,00	56,00	-

* Datos obtenidos por Betschart et al.(1979)(3)

** Valores determinados para esta investigación.

TABLA 15. Prueba T pareada de las propiedades funcionales para el aislado de proteína de café defectuoso obtenida por acidificación.

Variable	Media de la diferencia**	Error Estándar	T	Prob> T
Capacidad de hidratación	0,258	0,017	15.261	0,0001*
Actividad del emulsivo	1,843	1,170	1.576	0,1495
Estabilidad de la emulsión	-19,584	2,206	-8.875	0,0001*
Espumación	7,990	1,186	6.734	0,0001*

* Nivel de significancia menor del 5%

** Diferencia entre 3 meses y 1 mes de almacenamiento

TABLA 16. Prueba T pareada de las propiedades funcionales del aislado de proteína del café defectuoso, obtenido por adición de sal.

Variable	Media de la diferencia**	Error Estándar	T	Prob> T
Capacidad de hidratación	-0,1115	0,022	-4.944	0,0008*
Actividad del emulsivo	-8,7620	1,239	-7.072	0,0001*
Estabilidad de la emulsión	-7,3840	2,410	-3.063	0,0135*
Espumación	-5,8860	0,781	-7.537	0,0001*

* Nivel de significancia menor del 5%

** Diferencia entre 3 meses y 1 mes de almacenamiento.

Se presentaron diferencias significativas a los 3 meses entre los dos aislados en la mayoría de variables, con excepción de la actividad emulsiva (Tabla 17). Para el primer mes no se observaron diferencias significativas en la espumación, contrario a las demás variables que sí presentaron diferencias significativas.

Para el aislado precipitado con ácido las propiedades en su mayor parte mostraron un aumento con el tiempo de almacenamiento, en cambio para el precipitado con sal todas las propiedades se deterioraron (Tabla 17)

En general, se encontró que el contenido de la proteína cruda (% Nitrógeno x 6,25) en el café

TABLA 17. Prueba T no pareada de las propiedades funcionales del aislado de proteína del café defectuoso.

Variable	Tiempo	Muestra	Media	Varianza	T	Prob> T
Capacidad de hidratación	3 meses	Ácido	2,509	Iguales	11,2494	0,0001*
		Sal	2,282			
Actividad del emulsivo		Ácido	52,214	Iguales	-2,0210	0,0584
		Sal	54,408			
Estabilidad de la emulsión		Ácido	25,511	Diferentes	-25,8533	0,0001*
		Sal	54,936			
Espumación		Ácido	34,395	Diferentes	12,7064	0,0001*
		Sal	20,781			
Capacidad de hidratación	1 mes	Ácido	2,251	Diferentes	-8,6371	0,0001*
		Sal	2,394			
Actividad del emulsivo		Ácido	50,381	Iguales	-9,0319	0,0000*
		Sal	63,170			
Estabilidad de la emulsión		Ácido	45,095	Iguales	-5,7950	0,0000*
		Sal	62,320			
Espumación		Ácido	26,405	Iguales	-0,2202	0,8282
		Sal	26,667			

* Nivel de significancia menor del 5%.

almendra difiere de acuerdo a su calidad. El café de buena calidad tiene un contenido menor de proteína que los cafés ripio y brocado, siendo este último el que presenta mayor contenido de proteína, la cual va aumentando a media que el grado de infestación aumenta.

Considerando todos los solubles del café, se obtiene un rendimiento de extracción de 17,47% con base al peso total del café y una eficiencia del 56% con relación a los solubles totales del café. El contenido final de proteína en el aislado producido bajo las condiciones de extracción y precipitación determinadas como óptimas, varían de acuerdo al método de precipitación. El aislado precipitado con ácido clorhídico presenta un contenido de proteína del 56% frente a un 25% del aislado obtenido por adición de cloruro de calcio.

Se considera que el aislado que presenta el más alto contenido de proteína y las mejores

propiedades (capacidad de hidratación: actividad emulsiva u estabilidad de emulsión; espumación y solubilidad de nitrógeno) se obtiene mediante la precipitación por acidificación.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Bernardo Cháves, a la Dra. Lucelly Orozco y al Dr. Ricardo Acuña por su asesoría y colaboración.

GLOSARIO

- P = proteína extraída
 Rel = relación sólido (café ripio)/solvente (agua deionizada) (peso/volumen),
 Tiempo = tiempo que dura la extracción.
- PRECIPH = precipitado de proteína por acidificación.
- PRECISAL = precipitado de proteína con sales.

LITERATURA CITADA

1. ACUÑA J.R. Estudio bioquímico y molecular de la principal proteína de reserva en el endosperma de café (*Coffea arabica*). Santafé de Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química, 1997. 95p. (Tesis:Ph.D.)
2. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. AACC. Hydration capacity of pregelatinized cereal products. Saint Paul, AACC, 1994. 1 p. (Method No. 56-20).
3. BAU, H. M.; POUILLAIN, B.; BEAUFRAND, M.J.; DEBRY, G.. Comparison of cold, acid, and salt-precipitated soy proteins. *Journal of Food Science* 43: 106-111. 1978.
4. BETSCHAR, A. A.; FONG, R. Y.; HANAMOTO, M. M.. Safflower protein isolate: functional properties in simple systems and breads. *Journal of Food Science* 44: 1022-1026. 1979.
5. CHAVES C., B.. Análisis canónico de una superficie de respuesta. *Ingresoneto.RevistaICA*20(1):45-54. 1985.
6. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. FAO. Codex Alimentarius. Vol 7. Cereales, legumbres, leguminosas, productos derivados y proteínas vegetales. 2. ed. Rev. Roma, FAO, 1995. 165 p.
7. COMITÉ DEPARTAMENTAL DE CAFETEROS DE ANTIOQUIA. Beneficio del Café. Medellín, COMITECAFE, 1991. 213 p.
8. DAMODARAN, S.; PARAF, A. Food proteins and their applications. New York, Marcel Dekker. 1997. 681 p.
9. FIGUEROA, W. E.; SUAREZ, L. M.. Instalación y adaptación de una unidad de extracción de cafeína. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, 1990. 128p. (Tesis: Ingeniero Químico).
10. FRANKS, F. Characterization of proteins. Clifton, Humana Press Inc., 1988. 561p.
11. KIRK, R.E.; OTHMER, D.F. Encyclopedia of chemical technology. Wiley and Sons. 3. ed. New York, Vol. 19. 1979. s.p.
12. LAPTEVA, N. A. Production of a protein isolate. URSS patent SU 1 706 521. (Resumen consultado en Food Science and Technology Abstracts 25(3): 79. Ref.3G29. 1993).
13. LIADAKIS, G. N.; TZIA, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Protein isolation from tomato seed meal, extraction optimization. *Journal of Food Science* 60 (3): 477-482. 1995
14. MONTGOMERY, D. C. Diseño y análisis de experimentos. México. Grupo editorial Iberoamérica, 1991. 589 p.
15. NICOLAS, K.; KADANE, V. Preparation of protein isolates and concentrate by physico- chemical methods. Industrial processes applied to soybeans. *Revue Francaise des Corps Grass.* 22 (8/9) : 439-449. 1975. (Resumen consultado en Food Science and Technology Abstracts 8(2): 42. Ref. 2G85. 1976).
16. POMERANZ, Y. Funcional properties of food components. 2. ed. San Diego. Academic Press Inc., 1991. 569 p.
17. RHEE, K. C. ; CATER, C. M.; MATTIL, K.F. Simultaneous recovery of protein and oil from raw peanuts in an aqueous system. *Journal of Food Science* 37: 90-93. 1972.
18. SAUNDERS, C.; CONNOR, M. A.; EDWARDS, M. H.; KOHLER, G. O. Preparation of protein isolates from wheat shorts and wheat millrun by a wet alkaline process. *Cereal Chemistry* 52: 93-101. 1975.
19. SCHWENKE, K. D.; MIETH, G. Process and equipment for extraction of proteins. 1975. German Democratic Republic patent 1 13 993. (Resumen consultado en Food Science and Technology Abstracts 8(4):41. Ref. 4G223. 1976).
20. WANG, H.L.; SWAIN, E. W.; HESSELTINE, C. W.; GUMBMANN, M. R.. Protein quality of wild rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(2):309-312. 1978.
21. WU, Y. V. Protein concentrate from normal and high-lisine sorghums: preparation, composition, and properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(2): 305- 309. 1978.
22. WU, V.; STRINGFELLOW, A. Protein isolated from alkaline extraction of air-classified high-protein soft wheat flour. *Journal of Food Science* 45:1383-1386. 1980.
23. YASUMATSU, K.; SAWADA, K.; MORITAKA, S.; MISAKI, M.; TODA, J.; WADA, T.; ISHII, K. Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agricultural and Biological Chemistry* 36: 719. 1972.