

**Evaluación del efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la caracterización sensorial del café en dos sistemas de fermentación**

**Ronald Omar Pivaral Cruz  
Javier Estuardo Cruz Padilla**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

# **Evaluación del efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la caracterización sensorial del café en dos sistemas de fermentación**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingenieros en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Ronald Omar Pivaral Cruz**  
**Javier Estuardo Cruz Padilla**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2018

## **Evaluación del efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la caracterización sensorial del café en dos sistemas de fermentación**

**Ronald Omar Pivaral Cruz  
Javier Estuardo Cruz Padilla**

**Resumen.** El uso potencial de cepas (*Saccharomyces cerevisiae*) fue evaluado como cultivo inicial para la fermentación controlada durante el beneficiado húmedo de café en dos sistemas de fermentación (abierto y cerrado). El crecimiento microbiano y metabolitos producidos fueron caracterizados. En el sistema de fermentación abierto prevaleció el crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras, mientras que el crecimiento de hongos no presentó un patrón definido debido a la supresión ocasionada por el uso de cepas como cultivo inicial. La inoculación de levaduras también incrementó la producción de compuestos volátiles detectados en análisis sensorial, produciendo sabores agradables catalogando el tratamiento fermentación cerrada con cepa L'ORO (CLO) con la nota más alta en la escala SCAA. El desdoblamiento de azúcares por la adición de levaduras fue evaluado mediante HPLC, detectando galactosa solo en el tratamiento CLO comparado contra la fermentación abierta sin levaduras (ASL; control). El tratamiento CLO presentó mayor contenido de cenizas y lípidos en el análisis proximal comparado contra ASL. El análisis sensorial demostró que el uso de levaduras como cultivo inicial favorece a una alta calidad de taza, presentando una intensa percepción de notas a tamarindo, bayas y arándano, cuerpo mantecilloso-cremoso prolongado. En conclusión, el uso de *Saccharomyces cerevisiae* cepa L ORO en beneficiado húmedo sistema cerrado, es una alternativa viable para establecer control en fermentaciones y asegurar una calidad consistente en el producto final.

**Palabras clave:** Beneficiado húmedo, catación, compuestos volátiles, galactosa, levadura.

**Abstract.** The potential use of strains (*Saccharomyces cerevisiae*) was evaluated as a starter culture for controlled fermentation during wet coffee processing in two fermentation systems (open and closed). Microbial growth and metabolites produced were characterized. In the open fermentation system, the growth of lactic acid bacteria and yeasts prevailed, while fungal growth did not present a defined pattern due to the suppression caused by the use of strains as initial culture. Yeast inoculation also increased the production of volatile compounds detected in sensory analysis, producing pleasant flavors by cataloging the closed fermentation treatment with L'ORO strain (CLO) with the highest score on the SCAA scale. The splitting of sugars was evaluated by the addition of yeasts by HPLC, detecting galactose alone in the CLO treatment compared to open yeast free fermentation (ASL, control). The sensory analysis showed that the use of yeast as an initial culture favors a high-quality cup, presenting an intense perception of notes of tamarind, berries and cranberry and prolonged buttery-creamy body. In conclusion, the use of *Saccharomyces cerevisiae* strain L ORO in wet coffee closed post-harvest processing, is a viable alternative to establish control in fermentations and ensure a consistent quality in the final product.

**Key words:** Cupping, galactose, volatile compounds, wet processing, yeast.

## CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| Portadilla .....                         | i         |
| Página de firmas .....                   | ii        |
| Resumen .....                            | iii       |
| Contenido .....                          | iv        |
| Índice de Cuadros, Figuras y Anexos..... | v         |
| <br>                                     |           |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>              | <b>1</b>  |
| <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>      | <b>3</b>  |
| <b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>    | <b>9</b>  |
| <b>4. CONCLUSIONES .....</b>             | <b>18</b> |
| <b>5. RECOMENDACIONES .....</b>          | <b>19</b> |
| <b>6. LITERATURA CITADA .....</b>        | <b>20</b> |
| <b>7. ANEXOS .....</b>                   | <b>23</b> |

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

| Cuadros   | Página |
|---|--------|
| 1. Descripción de los tratamientos de fermentación de café ( <i>Coffea arabica</i> L. var. Catuaí). .....   | 4      |
| 2. Perfil de tostado en escala AGTRO/SCAA, M-básica y L*a*b*. .....   | 6      |
| 3. Recuentos de bacterias ácido lácticas, levaduras, hongos y valores de pH al final de la fermentación de café. ....   | 10     |
| 4. Análisis sensorial de café producido bajo diferentes procesos de fermentación. ....  | 13     |
| 5. Correlación de atributos de catación utilizando coeficiente de Pearson .....   | 15     |
| 6. Comparación de análisis proximal presentes en muestra de mayor calificación sensorial y tratamiento control en café verde. ....  | 16     |
| 7. Comparación de azúcares presentes en muestra de mayor calificación sensorial y tratamiento control en café verde mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC. ....  | 17     |
|   |        |
| Figuras   | Página |
| 1. Flujo de proceso de beneficiado húmedo de café cereza. ....  | 5      |
| 2. Análisis sensorial y separación de medias por atributo de taza de café según protocolo SCAA producida bajo distintos sistemas de fermentación (abierto y cerrado) en interacción con 4 inóculos (Fermipan, L ORO, L2 y sin levadura). .... | 14     |
|   |        |
| Anexos  | Página |
| 1. Protocolo de catación de SCAA. Fuente SCAA 2015. ....  | 23     |
| 2. Análisis de varianza para bacterias ácido lácticas. ....   | 23     |
| 3. Análisis de varianza para levaduras. ....  | 24     |
| 4. Análisis de varianza para hongos. ....   | 24     |
| 5. Análisis de varianza para pH. ....   | 24     |
| 6. Análisis de varianza para catación. ....   | 25     |
| 7. Diagrama de telaraña de catación por atributos de tratamiento cerrado inoculado con L ORO. ....  | 25     |
| 8. Diagrama de telaraña de catación por atributos de tratamiento abierto sin inóculo (Control). ....  | 26     |

| Anexos  | Página |
|---|--------|
| 9. Picos detectados mediante el uso de HPLC en perfil de azucares para el tratamiento ASL repetición A. ....  | 27     |
| 10. Picos detectados mediante el uso de HPLC en perfil de azucares para el tratamiento ASL repetición B. .... | 27     |
| 11. Picos detectados mediante el uso de HPLC en perfil de azucares para el tratamiento CLO repetición A. .... | 28     |
| 12. Picos detectados mediante el uso de HPLC en perfil de azucares para el tratamiento CLO repetición B. .... | 28     |

# 1. INTRODUCCIÓN

El café tiene un impacto económico mundial siendo considerada la segunda bebida más consumida después del agua (Ramírez 2010). Históricamente el cultivo del café ha sido uno de los principales motores de la economía del país; durante el año cafetero 2010-2011 se exportaron 4.7 millones de quintales de café oro, lo que generó USD 1,136 millones de dólares en divisas para el país, comparado con el año 2017 en el cual se generó 489.1 millones de dólares en divisas (Anacafé 2017). En términos macroeconómicos, el grano de café participó en un 33% en exportaciones representando lo generado por el sector agropecuario, el 4% del PIB en 2011 y el 2.7% del PIB 2017 (Banguat 2017). La reducción de las exportaciones en los últimos años se debe al severo ataque de la roya (*Hemileia vastatrix*). Por lo anterior, los caficultores buscaron medidas para aumentar la calidad y diferenciar sus productos para compensar las pérdidas en producción. Se ha implementado el uso de nuevas variedades de café resistentes a la roya y variedades reconocidas por su alta calidad de taza, que han sido cultivadas con el propósito de buscar nuevas técnicas para agregar valor, establecer controles y asegurar la calidad consistente de las producciones cada año.

La fermentación es un proceso que ha sido utilizado en los diferentes alimentos para generar cambios organolépticos como lo son textura, aroma, sabor e incrementar la vida de anaquel de algunos productos. La industria cafetalera ha incorporado la fermentación en el proceso de beneficiado (Puerta 2012). A medida que se han desarrollado investigaciones enfocadas en la fermentación, se ha pasado de una fermentación tradicional a una fermentación controlada, obteniendo bebidas de calidad superior con sabores y aromas muy peculiares que agregan valor y permiten establecer una calidad constante en el producto (Puerta y Echeverry 2015). A estos cafés se les denomina con el nombre de “cafés especiales”, esto se consigue acompañando la fermentación con un buen manejo agronómico y buenas prácticas de manufactura en todo el proceso de beneficiado y tostado del café.

Durante el proceso de fermentación natural de un grano de café se obtiene la formación de ácidos, ésteres, alcoholes y cetonas. Estos compuestos son el resultado de la degradación de proteínas, lípidos, azúcares y ácidos en los cuales intervienen levaduras, hongos y bacterias presentes en el mucílago con ayuda de enzimas generando diferentes reacciones bioquímicas (Chávez *et al.* 2009). Las levaduras se encuentran entre los microorganismos aislados con mayor frecuencia, pero se dispone de información limitada sobre su efecto en el desarrollo de las características sensoriales del café (Evangelista *et al.* 2014).

La diversidad de levaduras en la fermentación de café a menudo abarca los géneros *Candida*, *Hanseniasspora*, *Pichia* y *Saccharomyces*. Los cambios en el mucílago durante la fermentación también se reflejan en el endospermo, donde se producen altas

concentraciones de metabolitos finales de origen microbianos (ácido acético, etanol, glicerol, ácido láctico y manitol). Además, la anoxia del método sumergido desencadena la germinación de los endospermos (Bruyn *et al.* 2017). Las sustancias formadas de la degradación de estos compuestos modifican el color, pH, olor y las características del grano de café. Según Puerta (2012) todos los procesos que ocurren en la etapa de fermentación se generan a partir de la interacción de siete factores, entre los más relevantes se encuentran: la calidad intrínseca del café, pH del sustrato, carga microbiana y tipo de sistema de fermentación.

El desarrollo de cepas especializadas de levaduras ya conocidas para café está teniendo un impacto en la industria cafetalera. En los sistemas de fermentación existen diversos métodos los cuales influyen en la caracterización organoléptica de la taza final (o perfil de taza); el proceso puede ser abierto o cerrado, continuo o discontinuo, estático o agitado y finalmente sólido o sumergido (Puerta y Echeverry 2015). Actualmente en la industria cafetalera se ha trabajado con el siguiente método: un sistema abierto, sólido, estático y discontinuo. La generación de tecnología en los sistemas de producción y beneficiado de café en Guatemala ha ido avanzando, a pesar de esto todavía existen fallas por falta de control y estandarización de procesos a nivel de finca. El proceso de secado es otro parámetro a considerar en el beneficiado de cafés especiales, la temperatura, porcentaje de sombra y la velocidad de secado son tres parámetros que definen la calidad del grano en este proceso. Los caficultores buscan las condiciones ideales en secado de cafés especiales para evitar el daño del grano.

La alta calidad de la taza en café es descrita como sensación agradable al consumidor, combinación equilibrada de cuerpo, sabor y acidez en ausencia de defectos, catalogando el sabor como el parámetro de mayor importancia (Sunarharum *et al.* 2014). El perfil de taza en la caracterización de diferentes tipos de café ha tomado auge. Uno de los métodos empleados en la evaluación sensorial es la prueba de “catación” desarrollada por la Speciality Coffee Association of America (SCAA 2015). En esta investigación se evaluó el efecto de tres tipos de levadura (L2, L ORO y FERMIPAN) en el sistema de fermentación cerrado y abierto, al modificar la flora natural de microorganismos que posee el mucílago y obtenidos del ambiente, midiendo el efecto en la obtención de nuevos olores y sabores especiales. La presente investigación tiene por objetivos:

- Cuantificar los principales microorganismos presentes al final de la fermentación del café.
- Determinar el perfil de taza de café fermentado en diferentes condiciones
- Caracterizar químicamente el tratamiento con mejor puntuación en la evaluación sensorial y determinar la relación que estos poseen con los sabores descritos en el perfil de taza.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Etapas 1. Fermentación del café.**

**Descripción de las levaduras.** Se utilizaron tres cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*: LALCAFÉ ORO™ y LALCAFÉ L2™ distribuidas por LALLEMAND. Se caracterizan por su capacidad para optimizar la eficacia del proceso por vía húmeda y la consistencia de la calidad de la taza. Así mismo, la levadura de nombre comercial conocida como FERMIPAN™ pertenece a una cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, con la diferencia que esta cepa no ha sido aislada para uso en café. Las levaduras fueron rehidratadas en agua potable a una proporción 1:10 (p/v) a temperatura ambiente (24 °C) 20 minutos antes de su aplicación.

**Fermentación del café baba.** Para esta evaluación se utilizó café cereza (*Coffea arabica* L. var. Catuaí) en su punto óptimo de corte, concentración de azúcares 25° Brix para la variedad Catuaí (Silva *et al.* 2011). El café fue cosechado de la Finca El Morito (1804 msnm), en el municipio de Mataquescuintla, Jalapa, Guatemala, que posee una temperatura ambiente promedio de 18.4 °C en el mes de diciembre (Orellana 2005). Las cerezas de café (160 kg) fueron sometidas al proceso de despulpado en el cual se removió el mesocarpio, quedando el grano cubierto por mucílago. Se homogeneizó la masa de café despulpado previo a la toma de cantidades que conformó cada unidad experimental de forma aleatoria dentro del conjunto de sacos cosechados. Cada unidad experimental fue rotulada según el tratamiento al cual correspondía (cuadro 1), en el caso de los tratamientos que implicaba el uso de levaduras se utilizó una relación 1:1000 (p/p) de levadura:café despulpado (recomendación del fabricante). Se utilizaron contenedores plásticos con capacidad de 10 litros en los cuales se colocaron 6.36 kilogramos de café cereza despulpado, dando un total de 24 unidades experimentales. Para los sistemas cerrados se adicionó un tercio de la capacidad del contenedor con agua para promover la anaerobiosis durante la fermentación. Se adicionó levadura a los frascos con tratamientos. El proceso de fermentación tuvo una duración de 36 horas para todos los tratamientos (abierto y cerrado). Se realizaron tomas de pH inicial y final en el proceso de fermentación, con ayuda de un potenciómetro introduciéndolo directamente en la masa de café fermentado (Figura 1).

Transcurridas 36 horas de fermentación, finalizando el proceso se tomó una muestra de café de 100 gramos aproximadamente. Utilizando bolsas estériles para cada unidad experimental, la muestra fue congelada introducida en una hielera y posteriormente llevadas a un congelador (-4 °C) con la finalidad de reducir la tasa de crecimiento microbiano. Fueron llevadas a las instalaciones de Anacafé y se procesaron específicamente en el departamento de Analab, Laboratorio de microbiología especial para muestras de café.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos de fermentación de café (*Coffea arabica* L. var. Catuaí).

| Método de Fermentación (ambiente) | Tratamiento | Código | Descripción de tratamiento          |
|-----------------------------------|-------------|--------|-------------------------------------|
| Abierto                           | 1           | ASL    | Fermentación abierta sin levaduras  |
|                                   | 2           | AL2    | Fermentación abierta con cepa L2    |
|                                   | 3           | ALO    | Fermentación abierta con cepa L'ORO |
|                                   | 4           | AFP    | Fermentación abierta con Fermipan   |
| Cerrado                           | 5           | CSL    | Fermentación cerrada sin levaduras  |
|                                   | 6           | CL2    | Fermentación cerrada con cepa L2    |
|                                   | 7           | CLO    | Fermentación cerrada con cepa L'ORO |
|                                   | 8           | CFP    | Fermentación cerrada con Fermipan   |

**Lavado del café.** Al finalizar el proceso de fermentación (36 horas), se procedió a realizar el lavado del café, con el propósito de remover el mucílago del grano post-fermentado. Para remoción del mucílago se introdujo cada muestra dentro de un contenedor realizando lavados continuos agitando la masa de café removiendo el mucílago. Los lavados se realizaron hasta el punto donde el agua no cambiaba su tonalidad cristalina.

**Secado del café.** El proceso de secado del grano se realizó después del lavado del café, en este proceso fue tratado como a un café especial, según metodología establecida en Finca el Morito. Brevemente, el secado se realizó con restricción de luz de tal manera que los granos fueron colocados dentro de sacos de yute, esparcidos en el interior de los sacos cuidando que se formara una capa delgada (1.5 cm de grosor). El objetivo de este secado es evitar el contacto directo del sol con el grano y prolongar el tiempo de secado para evitar daños en el mismo. Cabe mencionar que cada tratamiento fue inoculado por separado utilizando sacos distintos previamente identificados a fin de evitar contaminación de los mismos. El proceso de secado consistió en llevar los granos de café de un estado poco estable (pergamino húmedo) con 50% de humedad hasta su estado más estable (pergamino seco) 11.5 – 12.5% en oro. El porcentaje de humedad se determinó en campo con ayuda de un medidor de humedad Dolé 400B, el proceso de secado tuvo una duración de siete días, tiempo dependiente de la temperatura (12-20 °C, Min-Max) y humedad relativa (45-55 %, Min-Max).

**Análisis microbiológico.** La muestra se utilizó para cuantificar la presencia de bacterias ácido lácticas, levaduras y hongos en cada unidad experimental. Para los análisis microbiológicos se utilizó el procedimiento descrito por Pereira *et al.* (2012) con modificaciones. Se usó como diluyente de buffer fosfato. Diez gramos de cada muestra se diluyeron en proporción 1:9 (p: v). Se realizó un masajeado de los granos durante 5 min para posteriormente realizar diluciones en serie. Los recuentos de hongos y levaduras se realizaron utilizando un Petrifilm 3M Y&M, incubando a una temperatura entre 25-30 °C por un periodo de 72 horas para el conteo de levaduras y 120 horas para el conteo de hongos.

Para el conteo de bacterias ácido lácticas se utilizaron Petrifilm 3M BAL incubándolos a 37 °C por un periodo de 48 horas.

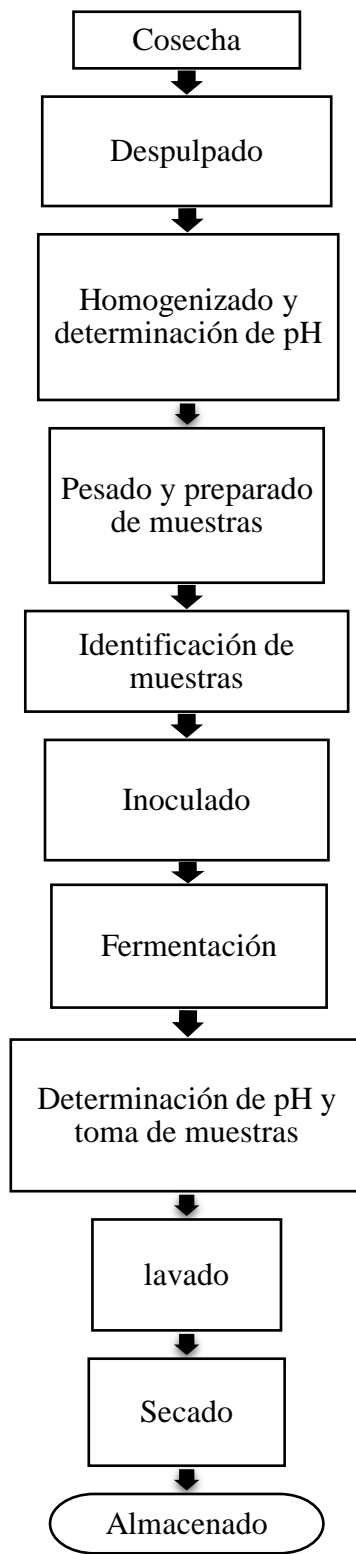


Figura 1. Flujo de proceso de beneficiado húmedo de café cereza.

**Análisis estadístico.** Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x4 utilizando dos niveles de fermentación (abierto y cerrado) y cuatro tipos de inóculo (SL, L2, LO, FP) con tres repeticiones por tratamiento (Cuadro 1) para un total de 24 unidades experimentales. Las variables dependientes fueron el crecimiento de UFC/g de bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras. Los datos fueron analizados con el programa SAS® Versión 9.4, por medio de un análisis de varianza (ANDEVA), con el uso un modelo general lineal (GLM) y una separación de medias ajustadas (LS-MEANS). El nivel de significancia utilizado fue 95%.

## **Etapas 2. Análisis sensorial (Catación).**

**Identificación de las muestras.** Previo a la catación fueron introducidas a las instalaciones de Anacafé en el departamento de catación las 24 unidades experimentales, las cuales pasaron por un proceso de identificación para ser tratadas como unidades de investigación y evitar sesgo en los datos. Cada muestra fue introducida dentro del sistema de ingreso de muestras para investigación de Anacafé, el programa generó un código único para cada muestra. Posteriormente las muestras fueron sometidas a una descripción sensorial (por un evaluador experto) del grano en pergamino, se consideraron los siguientes factores: color, homogeneidad y materia extraña (SCAA 2015).

**Trillado.** Cada muestra fue trillada individualmente, realizando limpieza de las trillas marca LOGOS, entre cada muestra para evitar contaminación entre las mismas. Después de 24 horas se determinó el contenido de humedad de los granos en oro con ayuda de un medidor de humedad Dolé 400B.

**Tostado del café.** Se sometió el grano oro al proceso de tostado con una temperatura de 160 a 180 °C en tostadores individuales marca PROBAT, por un lapso de 9 a 10 minutos aproximadamente, sin embargo, cada grano posee tiempos distintos debido a factores que afectan como la humedad, tamaño, uniformidad, densidad, entre otras. Para la molienda de los granos tostados se utilizó un molino marca MALKÖNIG siguiendo protocolo del SCAA. El perfil del tostado realizado fue claro a claro-medio, medido vía la escala (Gourmet) M-Básica de AGTRON (Cuadro 2), aproximadamente  $58 \pm 1$  en grano entero y  $63 \pm 1$  en el café molido (55-60 en la escala estándar o placa AGTRON/SCAA para tostado No. 55). Según protocolo del SCAA (2015) en el tostado no deben aparecer granos quemados (chamuscados), estos errores son penalizados. Se retiró el café del tostador, la muestra se enfrió con aire forzado inmediatamente.

Cuadro 2. Perfil de tostado en escala AGTRON/SCAA, M-básica y L\*a\*b\*.

| Grano  | Escala<br>AGTRON/SCAA | Escala (Gourmet)<br>M-básica | Valores L*a*b* |    |    |
|--------|-----------------------|------------------------------|----------------|----|----|
|        |                       |                              | L*             | a* | b* |
| Entero | 55                    | $58 \pm 1$                   | 37             | 5  | 13 |
| Molido | 55-60                 | $63 \pm 1$                   | 31             | 4  | 9  |

Fuente: SCAA 2015.

**Preparación de la catación.** El tipo de recipiente para realizar la infusión recomendado por la SCAA es un vaso Manhattan 200 ml. Se aseguró que los vasos estuviesen limpios, sin olor evidente y a temperatura ambiente. Para la preparación de la muestra se molieron con una antelación máxima de 15 minutos a la sesión de cata. Seguidamente se adicionó agua a 95 °C en una proporción  $11.5 \pm 0.25$  g de café por  $200 \pm 2.5$  ml de agua según SCAA (2015). La fase sólida a manera de nata sobrenadante se dejó por un período de cuatro minutos y se procedió a romper taza con cuchara de catación por agitación en tres tiempos, después de la agitación se permitió que la espuma corriera por la parte de atrás de la cuchara suavemente mientras olfateaba; posteriormente, cuando la muestra se enfrió hasta 71°C, en aproximadamente 8-10 minutos de infusión, se realizó la evaluación de la bebida aspirando el líquido dentro de la boca de tal manera que cubra especialmente la lengua y paladar duro.

Se realizó una sesión de catación tipo panel, en el que cuatro catadores certificados como Q Grader evaluaron los distintos tratamientos y asignaron el puntaje correspondiente indicando el perfil de la taza. Las puntuaciones expresadas por cada catador fueron comparadas por medio un análisis estadístico. Los atributos de calidad a evaluar fueron fragancia/ aroma, sabor, post-gusto, acidez, cuerpo, uniformidad, dulzor, limpieza de la taza, balance e impresión global; los resultados se presentan en la escala de 6 a 10 correspondiente a la valoración de cafés especiales.

**Análisis estadístico.** El análisis sensorial cuantitativo y descriptivo de la bebida, fue realizado con catadores entrenados, utilizándose un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA). Se utilizaron cuatro catadores siendo estos los bloques con tres repeticiones por cada tratamiento. Los datos fueron analizados con el programa SAS® Versión 9.4, por medio de un análisis de varianza (ANDEVA), con el uso un modelo general lineal (GLM), una separación de medias ajustadas (LS MEANS) para la interacción de los principales factores. El nivel de significancia fue 95%, respectivamente.

### **Etapas 3. Análisis químicos.**

**Preparación de muestras.** El grano en estado verde (Oro) fue sometido a un molido mecánico, para lograr una reducción del tamaño de partícula hasta alcanzar 0.5 mm, para este proceso se utilizó un molino marca Perten 3310. El molido de las muestras fue realizado el mismo día de que se realizaron los análisis, respectivamente.

**Análisis proximal.** Se hizo un análisis proximal completo siguiendo los métodos oficiales del AOAC (Latimer y Horwitz 2016) a continuación enunciados:

- Humedad AOAC 950.46B
- Grasa por correlación con el software Genesis R&D.
- Proteína Cruda AOAC 2001.11
- Fibra Cruda AOAC 962.09
- Cenizas AOAC 923.03
- Carbohidratos por diferencia.

**Análisis perfil de azúcares por HPLC (AOAC 982.14).** El análisis se inició pesando 1 g de muestra de cada unidad experimental (por duplicado). En matraces se colocó el gramo de muestra y se le añadió 50 ml de una solución de agua más metanol grado HPLC al 99.99% (1:1). La mezcla fue sometida a baño maría con agua a 80-85 °C durante 30 minutos. Pasado el tiempo se dejaron enfriar las muestras, se homogenizaron y se aforó a 100 ml con la solución de agua más metanol (1:1).

La muestra se colocó en una jeringa con filtro de nylon de 0.45 µm, el contenido se expulsó a través de la jeringa hacia los viales de lectura. Se utilizó un equipo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) marca Agilent. Se prepararon estándares para fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa, lactosa y galactosa para la cuantificación de los azúcares presentes. Se utilizó una guarda columna Hi Plex 50 × 7.7 mm y una columna Hi Plex Ca 300 × 7.7 mm 8 µm a 85 °C para la segregación de azúcares en el HPLC. La velocidad del flujo fue de 0.6 ml/min, con un tiempo de corrida de 20 min y un volumen de inyección de 20 µL. Se utilizó como fase móvil agua desionizada y como solvente etanol de grado HPLC al 50%. El análisis de datos se efectuó con el software Agilent Chemstation Software 2003 para sistemas de cromatografía y Microsoft Excel® 2010.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Etapa 1. Fermentación del café.**

La fermentación es utilizada principalmente como método para remoción del mucílago del grano, sin embargo, este proceso tiene como efecto resultado que favorecen el sabor de la taza de café (Jackels y Jackels 2006). Durante la fermentación de café se da comensalismo en donde actúan bacterias y levaduras en donde resaltan las levaduras fermentadoras del mucílago como *Saccharomyces cerevisiae* y del género *Candida*. En el caso de las bacterias encontramos ácido lácticas (*Lactobacillus*), enterobacterias y el género *Bacillus*. Las bacterias han sido reportadas como las más numerosas durante el proceso (Puerta 2012).

El análisis estadístico de los resultados para bacterias ácido lácticas presentó diferencia significativa ( $P=0.0052$ ) para el factor ambiente (Cuadro 3) compuesto por dos niveles (abierto y cerrado). Sin embargo, el tipo de inóculo utilizado no tiene una influencia directa en el crecimiento de bacterias ácido lácticas observado, por lo tanto, no se presentó diferencia estadísticamente significativa respecto al factor inóculo ( $P=0.3217$ ). Adicionalmente, la interacción del inóculo con el ambiente no mostró diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.3378$ ). Dados los resultados del ANDEVA se realizó una separación de medias para el factor ambiente, el cual presentó un mayor crecimiento de bacterias ácido lácticas en el ambiente abierto. Los sistemas abiertos presentan disminución del pH a tasa más reducida que los sistemas cerrados principalmente porque la producción de  $\text{CO}_2$  en el sistema abierto se libera al ambiente lo cual permite el desarrollo apropiado de las bacterias.

En el caso de las levaduras se encontró diferencia significativa ( $P=0.0008$ ) para el factor inóculo compuesto por cuatro niveles (L ORO, L2, Fermipan y Control). Adicionalmente, el factor ambiente también presentó diferencia significativa ( $P<0.0001$ ). Por consiguiente, la interacción de ambos factores sí tuvo un efecto significativo ( $P=0.0002$ ) en los tratamientos, siendo de mayor efecto el ambiente al cual fueron sometidos y teniendo diferencia significativa, se realizó separación de medias obteniendo mayor crecimiento los tratamientos abiertos inoculado con L2 y sin levaduras (AL2 Y ASL).

Los resultados de hongos presentaron diferencia significativa ( $P=0.0169$ ) para la interacción del inóculo compuesto por cuatro niveles (L ORO, L2, Fermipan y Control) y ambiente compuesto por dos niveles (abierto y cerrado). La combinación con mayor crecimiento de hongos fue en sistema abierto con Fermipan la cual presentó  $1.84 \pm 0.09$  Log UFC/g, que además es el que presenta menor crecimiento de levaduras. Todas las fermentaciones fueron caracterizadas por un valor de pH inicial de 5.5.

Se presentó una diferencia estadística ( $P=0.0038$ ) respecto al pH el cual se ve influenciado por el factor inóculo. Por consiguiente, el tratamiento cerrado inoculado con Fermipan (CFP) mostro un pH  $5.16 \pm 0.62$  siendo el valor más alto perteneciendo a un sistema cerrado. Por otro lado, el tratamiento abierto inoculado con L2 (AL2) presento un pH  $3.98 \pm 0.12$ , valor más bajo, correspondiendo a un sistema abierto. Se presentó diferencia significativa entre ambos tratamientos con un nivel de confianza del 95%. En la fermentación del café el pH del mucilago disminuye hasta un valor que depende del sistema y de la temperatura de fermentación. Por otra parte, el pH del mucilago de café se ve influenciado por la producción del ácido láctico, la eliminación del dióxido de carbono, la producción de otros ácidos más débiles y por otras degradaciones (Puerta 2012).

Cuadro 3. Recuentos de bacterias ácido lácticas, levaduras, hongos y valores de pH al final de la fermentación de café.

| Sistema | Inóculo         | Bacterias         | Levaduras            | Hongos               | pH                    |
|---------|-----------------|-------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
|         |                 | ácido lácticas    |                      |                      |                       |
|         |                 | Log UFC/g         | Log UFC/g            | Log UFC/g            |                       |
| Abierto | SL <sup>1</sup> | $7.73 \pm 0.08^a$ | $7.06 \pm 0.07^a$    | $0.70 \pm 0.00^c$    | $4.20 \pm 0.09^{cd}$  |
|         | L2 <sup>2</sup> | $7.47 \pm 0.39^a$ | $6.96 \pm 0.48^a$    | $1.03 \pm 0.58^{bc}$ | $3.98 \pm 0.12^d$     |
|         | LO <sup>3</sup> | $7.87 \pm 0.28^a$ | $5.14 \pm 0.06^b$    | $1.10 \pm 0.46^{bc}$ | $4.42 \pm 0.20^{cd}$  |
|         | FP <sup>4</sup> | $7.57 \pm 0.13^a$ | $4.52 \pm 0.02^c$    | $1.84 \pm 0.09^a$    | $4.93 \pm 0.84^{ab}$  |
| Cerrado | SL              | $7.32 \pm 0.22^b$ | $4.55 \pm 0.11^c$    | $1.46 \pm 0.15^{ab}$ | $4.47 \pm 0.06^{bcd}$ |
|         | L2              | $6.87 \pm 0.64^b$ | $4.40 \pm 0.25^c$    | $1.00 \pm 0.00^{bc}$ | $4.29 \pm 0.26^{cd}$  |
|         | LO              | $6.91 \pm 0.14^b$ | $4.93 \pm 0.24^{bc}$ | $1.52 \pm 0.07^{ab}$ | $4.53 \pm 0.12^{bc}$  |
|         | FP              | $7.32 \pm 0.53^b$ | $4.62 \pm 0.07^{bc}$ | $1.16 \pm 0.28^{bc}$ | $5.16 \pm 0.62^a$     |
| CV (%)  |                 | 4.13              | 3.00                 | 1.42                 | 6.04                  |

<sup>a-c</sup>Medias seguidas de letra diferente en cada columna representan diferencia estadística entre tratamientos ( $P<0.05$ ). <sup>1</sup>Sin levaduras; <sup>2</sup> Cepa L2; <sup>3</sup> Cepa L ORO; <sup>4</sup> Fermipan; CV (%)= Coeficiente de variación en porcentaje; Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres repeticiones.

**Bacterias ácido lácticas.** Los factores que se ven involucrados en el crecimiento de bacterias ácido lácticas son la temperatura interna de la masa fermentada, el pH inicial y final del sustrato y el tipo de sistema de fermentación utilizado (ambiente). Puerta (2012) demostró que los °Brix del mucilago de café fresco son un indicador de la madurez del grano despulpado y los sistemas de sustrato sólido (sin adición de agua) son más heterogéneos que los sistemas sumergidos. Adicionalmente, el rango de variación del pH es más amplio para cualquier tiempo en sistemas de sustrato sólido. Los sistemas sumergidos inician con un valor de pH mayor que los sistemas de sustrato solido; sin embargo, los sistemas abiertos presentan disminución del pH a tasa más lenta que los sistemas cerrados. Así mismo, la temperatura externa se ve involucrada en una relación inversamente proporcional con la disminución del pH en la fermentación, a mayor temperatura más rápido es el descenso del pH.



El efecto dado por el tipo de sistema de fermentación utilizado (ambiente) sobre el crecimiento de bacterias ácido lácticas, se detalla en el cuadro 3. Independientemente del Inóculo utilizado, los tratamientos con sistema abierto predominaron con mayor crecimiento microbiano. Este comportamiento se debe a las temperaturas alcanzadas internamente en un sistema cerrado (45 °C) lo cual limita las condiciones idóneas para el crecimiento de bacterias ácido lácticas. La presencia de microorganismos en sistemas abiertos es mayor, al estar el café expuesto a la intemperie es colonizado por microorganismos provenientes del ambiente los cuales llegan por medio del aire, agua, tierra e insectos que actúan como vectores de microorganismos. Resultado acorde con lo obtenido por Evangelista *et al.* (2014) demostrando que no existe diferencia significativa en los conteos totales de bacterias ácido lácticas utilizando diferentes cepas inoculadas durante la fermentación en el beneficiado húmedo. Adicionalmente las poblaciones totales de bacterias ácido lácticas fueron mayores en sistemas abiertos en beneficiado húmedo, presentando una diferencia de 1.57 Log UFC/g en comparación con sistemas abiertos en beneficiado seco. En este estudio, la diferencia entre el recuento de bacterias ácido lácticas entre los sistemas abiertos y cerrados fue de 0.56 Log UFC/g.

**Levaduras.** El sistema de fermentación abierto presento mayor crecimiento que el sistema cerrado, esto se debe a que un sistema de fermentación abierto permite el crecimiento de microorganismos exógenos. Mientras que, el sistema cerrado restringe el crecimiento de los mismos y permite el desarrollo de las cepas inoculadas como cultivo inicial. Los microorganismos fermentadores del café son mesófilos. La mayoría de levaduras crecen entre 5 y 39 °C, con óptimos de 28 a 35 °C y todas mueren por encima de 50°C (Puerta 2012). La temperatura es otro factor que tuvo efecto en el crecimiento de las levaduras en el sistema cerrado. En sistemas cerrados se alcanzan temperaturas internas de la masa fermentada de 45 °C, disminuyendo la tasa de crecimiento microbiano comparada con el sistema abierto.

**Hongos.** En relación a los resultados obtenidos por Silva *et al.* (2008) indica que en investigaciones anteriores, géneros como el *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Cladosporium* representan un 42.6% de los géneros que podemos encontrar en la fermentación. Según Puerta (2012) para el desarrollo de hongos se necesita un periodo mayor a 48 horas.

De acuerdo a Silva *et al.* (2008) el crecimiento de hongos se reduce conforme el crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras, incrementa principalmente por la presencia de *Debaryomyces hanseii*. Esta se encuentra dentro de la familia Saccharomycetaceae en donde se encuentra el género *Saccharomyces*, la cual es ampliamente conocida por la producción de micotoxinas que inhiben el crecimiento de otras levaduras y principalmente hongos.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunas especies de hongos filamentosos. Las micotoxinas principales son las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, ocratoxina A (OTA), patulin, fumonisina B1. En granos de café verde (oro), solo ocratoxina A (OTA) es detectada y es la única micotoxina con máximos límites de estabilidad, por la importación de países. Especies de *Penicillium* y *Aspergillum* son productores de OTA tales como *Penicillium verrucosum*, *P. nordicum* (Larsen *et al.* 2001). Sin embargo, en café,

*Aspergillum ochraceus* es reconocida por ser la mayor fuente de OTA (Velmourougane *et al.* 2011). Los niveles de micotoxinas en café dependen de factores bióticos y abiótico, los cuales pueden influenciar el crecimiento de hongos. Los niveles de hongos y su desarrollo pueden decrecer con prácticas preventivas como buenas prácticas agrícolas, buenas prácticas de manufactura y buenas prácticas de sanitación (Velmourougane *et al.* 2006). El uso de levaduras como cultivos iniciales crea un efecto de competitividad entre levaduras y microorganismos patógenos, reduciendo la presencia de hongos obteniendo productos más inocuos y estables en almacenamiento en términos de calidad.

**Evaluación del pH.** En fermentaciones alcohólicas y heterolácticas se da la formación de dióxido de carbono, en sistemas abiertos este se volatiliza saliendo del medio sin generar alteración alguna, en cambio, en los sistemas cerrados contribuye a la acidificación del medio (Puerta 2012). Las bacterias ácido lácticas incrementan la producción de ácido láctico el cual contribuye a la reducción del pH, tal cual sucedió en el sistema de fermentación abierto, dando como resultado pH más bajo, por otra parte, el pH inicial es factor a considerar para un crecimiento más acelerado de bacterias ácido lácticas en sistema abierto que en cerrado. Por lo tanto, la reducción del pH en el sistema cerrado se debe en mayor proporción al dióxido de carbono producido por las levaduras el cual contribuye a la acidificación del mismo, que al efecto del ácido láctico producido por bacterias ácido lácticas. Por lo tanto, se generó descenso del pH, pero en menor proporción que en un sistema abierto. El pH tiene una relación inversa con el crecimiento de bacterias ácido lácticas, presentando en sistemas abiertos pH menores y mayor crecimiento de las mismas, esta correlación se mantiene al evaluar el crecimiento de bacterias ácido lácticas en distintos sistemas utilizando el mismo inóculo. Por lo tanto, al evaluar la relación del pH con bacterias ácido lácticas sin considerar el inóculo no se presenta una relación significativa.

## **Etapa 2. Catación.**

**Catación.** El análisis sensorial presentó diferencia significativa en la interacción entre inóculo y ambiente ( $P < 0.05$ ). El resultado de dicha catación determinó que el tratamiento cerrado con levaduras L ORO presentó diferencia significativa con respecto al tratamiento convencional abierto sumergido lo cual concuerda con Puerta y Echeverry (2015), quienes evaluaron distintos sistemas de fermentación con distintos tiempos de fermentación y su estudio identificó que los cafés fermentados durante 36 horas en ambiente cerrado y sumergido tenían un 65% de probabilidades de obtener sabores especiales en comparación al abierto sumergido, el cual en el mismo periodo solamente presentó notas superiores a las convencionales.

El análisis sensorial de granos de café proveniente de tratamientos con y sin uso de levaduras en la etapa de fermentación, presentó diferentes punteos en los diferentes atributos. Todos los tratamientos presentaron una evaluación final positiva (puntaje arriba de 84 puntos) y agradable caracterización sensorial. Sin embargo, los resultados indicaron que cada tratamiento presentó características sensoriales distintas, siendo el tratamiento CLO el mejor evaluado con un puntaje final de 85.70 promedio de cuatro catadores. No presentó diferencia significativa, sin embargo, fue el mejor apreciado debido a su realce en los distintos atributos evaluados (cuadro 4).

El análisis sensorial realizado para los distintos tratamientos presentó un comportamiento de los atributos (figura 2), en el cual es notorio en la mayoría de los casos que el tratamiento CLO presenta diferencia en atributos comparado con el sistema tradicional abierto sin levadura (ASL). Los puntajes dados a dicho tratamiento son positivos resaltando entre ellos el cuerpo, balance y apreciación por los catadores. El tratamiento presentó una aceptación muy completa por los cuatro catadores. El tratamiento mejor apreciado presentó cuerpo mantequilloso-cremoso muy consistente y completo, sabor a bayas (arándano), uvas maduras y tamarindo, considerando una apreciación general determinada como elegancia extrema. Por otro lado, el tratamiento control ASL presentó un puntaje final  $85.27 \pm 0.33$  promedio de cuatro catadores, descrito con un sabor a frutas y cítricos con un cuerpo completo, jugoso. Los demás tratamientos fueron descritos por el panel de catadores como muestras muy similares con cambios en la intensidad de dulzura, acidez y aroma, de manera general muestras con características cítricas (toronja, limón, té de limón) con intensidades muy moderadas. Información generada por panel de cuatro catadores Q Grader.

Cuadro 4. Análisis sensorial de café producido bajo diferentes procesos de fermentación.

| <b>Tratamiento</b>                  | <b>Punteo</b>          |
|-------------------------------------|------------------------|
| Fermentación abierta sin levaduras  | $85.27 \pm 0.33^{abc}$ |
| Fermentación abierta con cepa L2    | $85.23 \pm 0.31^{abc}$ |
| Fermentación abierta con cepa L'ORO | $84.98 \pm 0.53^c$     |
| Fermentación abierta con Fermipan   | $85.28 \pm 0.36^{abc}$ |
| Fermentación cerrada sin levaduras  | $85.25 \pm 0.43^{abc}$ |
| Fermentación cerrada con cepa L2    | $85.40 \pm 0.31^{ab}$  |
| Fermentación cerrada con cepa L'ORO | $85.70 \pm 0.72^a$     |
| Fermentación cerrada con Fermipan   | $85.13 \pm 0.25^{bc}$  |
| CV (%)                              | 1.30                   |

<sup>a-c</sup>Medias seguidas de letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres repeticiones.

% C.V. = Coeficiente de variación en porcentaje. La catación fue evaluada de acuerdo a la escala establecida por la Speciality Coffee Association of America (SCAA).

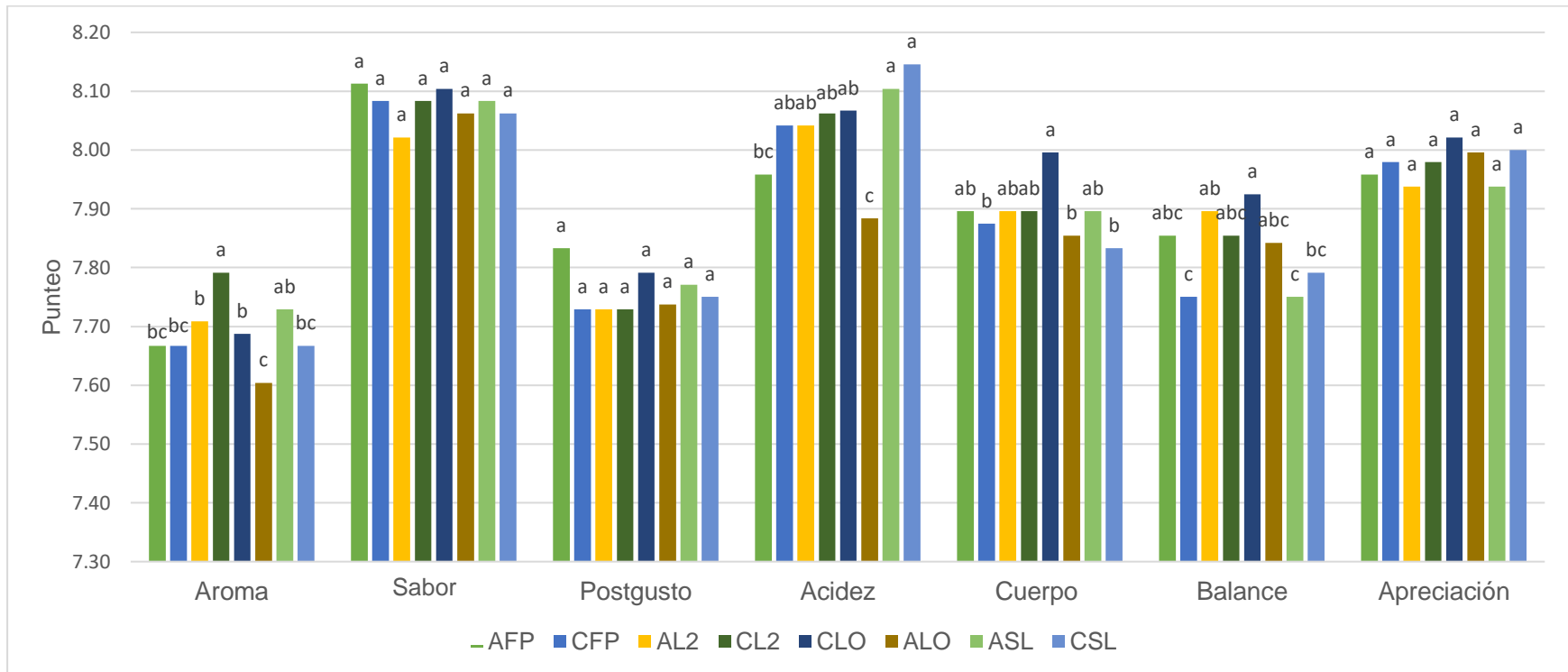


Figura 2. Análisis sensorial y separación de medias por atributo de taza de café según protocolo SCAA producida bajo distintos sistemas de fermentación (abierto y cerrado) en interacción con 4 inóculos (Fermipan, L ORO, L2 y sin levadura).

<sup>a-c</sup>Valores seguidos de letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

ASL: Fermentación abierta sin levaduras; AL2: Fermentación abierta con cepa L2; ALO: Fermentación abierta con cepa L'ORO; AFP: Fermentación abierta con Fermipan; CSL: Fermentación cerrada sin levaduras; CL2: Fermentación cerrada con cepa L2; CLO: Fermentación cerrada con cepa L'ORO; CFP: Fermentación cerrada con Fermipan.

Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres repeticiones.

CV = Coeficiente de variación en porcentaje

Los atributos que más influyeron en el punteo final de la taza de café fueron: balance, acidez, apreciación, y sabor ( $P < 0.0001$ ) (cuadro 5).

Cuadro 5. Correlación de atributos de catación utilizando coeficiente de Pearson

| <b>Correlación</b>    | <b>Coefficiente de Pearson<sup>¥</sup></b> | <b>Probabilidad</b> |
|-----------------------|--|---------------------|
| Aroma-sabor           | -0.55                                      | <.0001              |
| Aroma-cuerpo          | -0.39                                      | <.0001              |
| Sabor-postgusto       | -0.35                                      | 0.0004              |
| Postgusto-cuerpo      | -0.29                                      | 0.0039              |
| Postgusto-apreciación | -0.27                                      | 0.0083              |
| Acidez-cuerpo         | -0.22                                      | 0.0350              |
| Sabor-acidez          | -0.20                                      | 0.0481              |
| Aroma-postgusto       | 0.22                                       | 0.0316              |
| Aroma-balance         | 0.22                                       | 0.0277              |
| Postgusto-acidez      | 0.23                                       | 0.0244              |
| Cuerpo-punteo         | 0.26                                       | 0.0118              |
| Aroma-acidez          | 0.26                                       | 0.0107              |
| Sabor-punteo          | 0.28                                       | 0.0065              |
| Aroma-punteo          | 0.28                                       | 0.0065              |
| Postgusto-balance     | 0.31                                       | 0.0018              |
| Postgusto-punteo      | 0.33                                       | 0.0011              |
| Sabor-apreciación     | 0.39                                       | <.0001              |
| Apreciación-punteo    | 0.40                                       | <.0001              |
| Acidez-punteo         | 0.44                                       | <.0001              |
| Sabor-cuerpo          | 0.45                                       | <.0001              |
| Balance-punteo        | 0.55                                       | <.0001              |

<sup>¥</sup>Tomando como referencia el siguiente grado de correlación para clasificación de la misma; menor a 0.6 (bajo), 0.6-0.79 (medio) y mayor o igual a 0.8 una correlación de carácter alto.

Los atributos evaluados en la catación presentan una relación entre ellos lo cual explica el comportamiento de los mismos, sin embargo, no todos los atributos son predecibles, es decir que no se ven influenciados por alguna otra característica evaluada en la catación. Las características intrínsecas del grano de café se reflejan al momento de la catación. Durante el proceso de fermentación natural de un grano de café se obtiene la formación de ácidos, ésteres, alcoholes y cetonas. Estos compuestos son el resultado de la degradación de proteínas, lípidos, azúcares y ácidos en los cuales intervienen levaduras, hongos y bacterias presentes en el mucílago con ayuda de enzimas generando diferentes reacciones bioquímicas (Chávez *et al.* 2009). Las sustancias formadas de la degradación de estos compuestos modifican el color, pH, olor y las características del grano de café. Todos los procesos que ocurren y se generan en la fermentación dependen de la interacción de siete factores que afectan directamente el metabolismo de los microorganismos presentes y su interacción con el medio, siendo estos la temperatura externa, el tiempo de fermentación, el tipo de sistema de fermentación, la calidad intrínseca del café, el pH del sustrato, la higiene y la disponibilidad de oxígeno (Puerta 2012).

### Etapa 3. Análisis químicos.

**Análisis proximal.** Se realizó análisis proximal (cuadro 6) para conocer la cantidad de carbohidratos, fibra cruda, ceniza, grasa, humedad y proteína contenidos en el grano verde de café del tratamiento convencional y el de mejor calificación. Como bien se conoce la caracterización sensorial del café es la principal medida utilizada para determinar el precio del mismo, además el contenido de cada una de las partes afecta los sabores percibidos por el consumidor o catador cuando experimentan la taza.

Cuadro 6. Comparación de análisis proximal presentes en muestra de mayor calificación sensorial y tratamiento control en café verde.

| Parámetro         | Tipo de fermentación |                      | CV (%) | Pr> t               |
|-------------------|----------------------|----------------------|--------|---------------------|
|                   | Cerrado L ORO        | Abierto Sin Levadura |        |                     |
| Fibra cruda (%)   | 33.99 ± 0.95         | 33.63 ± 0.24         | 1.82   | 0.1419              |
| Grasa (%)         | 16.08 ± 0.13         | 14.92 ± 0.11         | 0.77   | 0.0106 <sup>‡</sup> |
| Humedad (%)       | 11.42 ± 0.15         | 11.47 ± 0.41         | 2.47   | 0.8867              |
| Cenizas (%)       | 4.700 ± 0.17         | 4.560 ± 0.01         | 1.91   | 0.3032              |
| Carbohidratos (%) | 54.64 ± 0.08         | 55.81 ± 0.21         | 0.26   | 0.0192 <sup>‡</sup> |
| Proteína (%)      | 13.17 ± 0.07         | 13.25 ± 0.07         | 0.53   | 0.3753              |
| Total (%)         | 100                  | 100                  |        |                     |

<sup>‡</sup>Parámetros con diferencia significativa (P<0.05) entre tratamientos

La composición química del café oro/verde depende de su variedad, origen, procesamiento y clima (Belitz *et al.* 2009). La humedad de las muestras fue de 11.42% para el L ORO en ambiente cerrado y 11.47% para la muestra en ambiente abierto sin levaduras. Las cenizas están dominadas principalmente por SiO<sub>2</sub> y CaO, y en menor cantidad por óxidos de magnesio, aluminio, potasio y fósforo (Melissari 2012). En la muestra inoculada con levadura L ORO en ambiente cerrado se presentó 4.70% de cenizas en comparación a los 4.55% que presentó el control (abierto y sin levadura), existen reportes que indican una correlación directa entre el contenido de minerales y la calidad del café, los principales minerales involucrados en dicha correlación son: zinc, manganeso y rubidio (Clifford 1975). El contenido de fibra cruda encontrado fue de 32.99% y 33.63% respectivamente son valores mucho más altos que los encontrados por Puerta (2012) de 21.3%. Los carbohidratos representan una fracción importante de más del 50% de la materia seca, durante la evaluación el tratamiento ASL presentó mayor contenido (t=0.0261) siendo este de 55.81% en comparación al 54.64% encontrado en el tratamiento CLO. Dentro de los carbohidratos existen azúcares reductores y no reductores que en conjunto con los aminoácidos producen compuestos importantes vía reacción de Maillard (Flament 2001). La proteína gracias a su efecto en la reacción Maillard durante el tueste se considera como un factor importante ya que esto afecta directamente el sabor, durante los análisis se presentaron valores de 13.22% para el tratamiento control y 13.16% para él inoculado con L ORO en ambiente cerrado lo que según Farah (2015) son valores esperados para cafés *robusta* y no para *arabica*. En cuanto el contenido graso el cual está compuesto en un 75%

por triglicéridos la muestra L ORO presento mayor contenido ( $t=0.0106$ ) con 16.08% mientras que la muestra control solamente 15.20%, cabe mencionar que los ácidos grasos volátiles forman parte de la fracción volátil del café encargado del realce en aromas al momento de evaluar el perfil de taza, además de estar involucrados con los componentes hidrofóbicos que contribuyen significativamente durante el análisis sensorial (Illy y Viani 2005).

**Cromatografía líquida (HPLC) para perfil de azúcares.** El análisis de perfil de azúcares por HPLC se realizó con estándares de sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, maltosa y lactosa. Se registró presencia del disacárido sacarosa en ambas muestras y de los monosacáridos glucosa y fructosa (cuadro 7). Según estudios realizados por Steiman (2003) en café verde procesado de manera convencional encontró sacarosa, fructosa y glucosa en cada una de las muestras evaluadas. El contenido de glucosa mostro diferencia significativa ( $t=0.0122$ ), presentando mayor contenido el tratamiento ASL. Según Geromel *et al.* (2006) los carbohidratos de bajo peso molecular como la sucrosa, glucosa y fructosa dependen principalmente del desarrollo del grano. Durante la evaluación de los resultados se encontró galactosa en la muestra inoculada con la cepa L ORO en condiciones cerradas mostrando diferencia significativa ( $t=0.0127$ ), provocado por la limitada cantidad de oxígeno dentro de la misma se encontraron cantidades promedio de 0.91 mg/g de muestra de café verde. La presencia de monosacáridos como la galactosa y manosa están relacionados específicamente con la expresión genómica durante el desarrollo del grano (Pré *et al.* 2008), las levaduras distribuidas por LALLEMAND, contribuyen a la expresión del potencial genético del café durante la fermentación.

Cuadro 7. Comparación de azúcares presentes en muestra de mayor calificación sensorial y tratamiento control en café verde mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC.

| Azúcares                | Tipo de fermentación |                      | Pr> t               |
|-------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
|                         | Cerrado L ORO        | Abierto sin levadura |                     |
| Sacarosa (mg/g)         | 10.38 ± 1.38         | 8.75 ± 0.627         | 0.2682              |
| Glucosa (mg/g)          | 0.46 ± 0.042         | 0.85 ± 0.044         | 0.0122 <sup>‡</sup> |
| Fructosa (mg/g)         | 1.08 ± 0.005         | 1.45 ± 0.197         | 0.2304              |
| Galactosa (mg/g)        | 0.91 ± 0.026         | Nd                   | 0.0127 <sup>‡</sup> |
| Azúcares totales (mg/g) | 1.28 ± 0.146         | 1.10 ± 0.087         | 0.2743              |
| CV (%)                  | 11.371               | 7.869                |                     |

<sup>‡</sup> Presento diferencia significativa; CV = Coeficiente de variación; Nd=No detectado

## 4. CONCLUSIONES

- El crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras presentaron mayor concentración en los sistemas de fermentación abierto a diferencia de los hongos los cuales, no presentaron un patrón definido.
- Todos los tratamientos presentaron punteo final de taza mayor a 84 puntos, catalogándose dentro de cafés especiales.
- El uso de *Saccharomyces cerevisiae* L ORO favorece sabores distintivos (arándano, bayas y tamarindo) y de alta calidad sensorial.
- *Saccharomyces cerevisiae* L ORO desarrolla perfiles proximales y de azúcares que se distinguen del sistema tradicional.



## **5. RECOMENDACIONES**

- Crear multipropósitos mezclando cepas de levaduras o cultivos bacterianos para lograr una combinación de propiedades aromáticas y/o funcionales.
- Determinar si el uso de levaduras es económicamente factible, para la aplicación de las mismas en cafés especiales y convencionales en términos beneficio/costo.
- Realizar estudios sobre la velocidad de reacción de la fermentación para la formación de compuestos volátiles y determinar los cambios a través del tiempo en base a las concentraciones de microorganismos específicos, además de la cinética de los procesos bioquímicos.
- Determinar la fracción volátil de cafés inoculados con levaduras y su relación con el café en perfil de taza.

## 6. LITERATURA CITADA

Anacafé (Asociación nacional del café). 2017. La caficultura al servicio del desarrollo rural. [http://www.anacafe.org/glifos/index.php/13NOT:NAC\\_Caficultura\\_servicio\\_desarrollo\\_rural](http://www.anacafe.org/glifos/index.php/13NOT:NAC_Caficultura_servicio_desarrollo_rural)

Banco de Guatemala. 2017. Guatemala en cifras. Departamento de Estadísticas Macroeconómicas. 72 P.

Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. 2009. Food chemistry. 4th rev. and extended ed. / H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle [Margaret Burghagen, translator]. Berlin, London: Springer. ISBN: 9783540699347. eng ger.

Bruyn F, Zhang S, Pothakos V, Torres J, Lambot C, Moroni A, Callanan M, Sybesma W, Weckx S, Vuyst L. 2017. Exploring the impacts of postharvest processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production. *Appl Environ Microbiol.* 83(1). eng. doi:10.1128/AEM.02398-16.

Chávez R, Chan V, Arguedas P, Mora J. 2009. Desarrollo de productos no convencionales a partir de café y de sus subproductos.: Innovación y desarrollo integral en los agronegocios. Costa Rica: 89 p.

Clifford M. 1975. The composition of Green and roasted coffee beans. *Process Biochemistry.* 13-16 P. and 20-23 P.

Evangelista S, Miguel M, Cordeiro C, Silva C, Pinheiro A, Schwan R. 2014. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Food Microbiol.* 44:87–95. eng. doi:10.1016/j.fm.2014.05.013.

Evangelista S, Silva C, Miguel M, Cordeiro C, Pinheiro A, Duarte W, Schwan R. 2014. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International.* 61:183–195. doi:10.1016/j.foodres.2013.11.033.

Farah A, editor. 2015. Coffee: Chemistry, quality and health. Cambridge: Royal Society of Chemistry, RSC Publ. 1 online resource. ISBN: 1782620044

Flament 2001. Coffee flavor chemistry. John Wiley and Sons, New York, 410 P.

Geromel C, Ferreira LP, Guerreiro SMC, Cavalari AA, Pot D, Pereira LFP, Leroy T, Vieira LGE, Mazzafera P, Marraccini P. 2006. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *J Exp Bot.* 57(12):3243–3258. eng. doi:10.1093/jxb/erl084.

Illy A, Viani R. 2005. *Espresso coffee: the science of quality*. Elsevier academic press, Amsterdam. 398 P.

Jackels S, Jackels C. 2005. Characterization of the coffee mucilage fermentation process using chemical indicators: A field study in Nicaragua. *J. Food Sci.* 70: C321-C325.

Latimer G. 2016. *Official methods of analysis of AOAC International*. 20. ed. Rockville, MD: AOAC International. 2 volumi ISBN: 0935584870.

Melissari B. 2012. Comportamiento de cenizas y su impacto en sistemas de combustión de biomasa. *Memoria de Trabajos de Difusión Científica y Técnica*, núm. 10. ISSN 1510-7450.

Orellana M. 2005. *Costo y rentabilidad de unidades agrícolas: producción de café*. Guatemala: [publisher unknown]. [http://biblioteca.usac.edu.gt/EPS/03/03\\_0204.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/EPS/03/03_0204.pdf).

Pereira G, Cruz Pedrozo m, Ramos, Lacerda, C, Schwan R. 2012. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Appl Environ Microbiol.* 78(15):5395–5405. eng. doi:10.1128/AEM.01144-12.

Pré M, Caillet V, Sobilo J, McCarthy J. 2008. Characterization and expression analysis of genes directing galactomannan synthesis in coffee. *Ann Bot.* 102(2):207–220. eng. doi:10.1093/aob/mcn076.

Puerta G, 2012. Factores, procesos y controles en la fermentación del café. *Avances técnicos cenicafé*. No. 422. 12 p.

Puerta G, Echeverry J. 2015. Fermentación controlada del café: Tecnologías para agregar valor a la calidad. *Avances técnicos cenicafé*. No. 454. 12 p. <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/558/1/avt0454.pdf>.

Ramirez D. 2010. *Café, cafeína vs. Salud*. Revisión de los efectos del consume de café en la salud. Sección artículos de revisión de tema revista centro de estudios en salud. Vol 1. NO. 12. 156-167 P.

SCAA - Specialty Coffee Association of America. 2015. *SCAA Protocols cupping specialty coffee*. Santa Ana, CA.

Silva C, Batista L, Abreu L, Dias E, Schwan R. 2008. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. Food Microbiol. 25(8):951–957. eng. doi:10.1016/j.fm.2008.07.003.

Silva S, Queiroz D, Pinto F, Santos N. 2011. Quality Spatial Variability of *Arabica* Coffee and Its Relationship with Brix and Fruit Reflectance. State University of Santa Cruz, Brazil.[internet]. [Consultado 2017 diciembre 3] disponible en [https://www.researchgate.net/profile/Francisco\\_Pinto6/publication/268352331\\_Quality\\_Spatial\\_Variability\\_of\\_Arabica\\_Coffee\\_and\\_Its\\_Relationship\\_with\\_Brix\\_Degree\\_and\\_Fruit\\_Reflectance/links/555ce22108ae9963a1120ecd.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Pinto6/publication/268352331_Quality_Spatial_Variability_of_Arabica_Coffee_and_Its_Relationship_with_Brix_Degree_and_Fruit_Reflectance/links/555ce22108ae9963a1120ecd.pdf)

Steiman S. 2003. Method development for green coffee analysis and its possible application for group discrimination and correlation of green coffee chemistry with cupping quality. [Consultado 2018 marzo 7] disponible en [https://www.researchgate.net/publication/29739658\\_Method\\_development\\_for\\_green\\_coffee\\_analysis\\_and\\_its\\_possible\\_application\\_for\\_group\\_discrimination\\_and\\_correlation\\_of\\_green\\_coffee\\_chemistry\\_with\\_cupping\\_quality?enrichId=rgreq9371446f23a6f7e0ec782378df107dc4XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI5NzU4O0FTOjEwMjc2MzI0NTYwNDg2NUAxNDExNTEyMDc1NjM2&el=1\\_x\\_3&\\_esc=publicationCoverPdf](https://www.researchgate.net/publication/29739658_Method_development_for_green_coffee_analysis_and_its_possible_application_for_group_discrimination_and_correlation_of_green_coffee_chemistry_with_cupping_quality?enrichId=rgreq9371446f23a6f7e0ec782378df107dc4XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI5NzU4O0FTOjEwMjc2MzI0NTYwNDg2NUAxNDExNTEyMDc1NjM2&el=1_x_3&_esc=publicationCoverPdf)

Sunarharum W, Williams D y Smyth H. 2014. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. Food Res. Int. 62, 315-325. Doi: 10.1016/j.foodres.2014.02.030

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Protocolo de catación de SCAA. Fuente SCAA 2015.



### Protocolos de catación de SCAA

Equipo necesario

| Tostación                            | Ambiente   | Preparación de la catación |
|--------------------------------------|--|----------------------------|
| Tostador de muestras                 | Buena iluminación                                    | Balanza                    |
| AGTRON u otro dispositivo de lectura | Limpio, sin transferencia de olores                  | Vasos para catar con tapas |
| Molino                               | Mesas para catar                                     | Cucharas para catar        |
|                                      | Silencioso   | Equipo de Agua caliente    |
|                                      | Temperatura cómoda                                   | Formatos útiles            |
|                                      | Distracciones limitadas (sin teléfonos, radios, etc) | Lápices y sujetapapeles    |

**Anexo 2.** Análisis de varianza para bacterias ácido lácticas.

| Descripción         | GL | Valor F | Pr > P |
|---------------------|----|---------|--------|
| Inóculo             | 3  | 1.44    | 0.3217 |
| Ambiente            | 1  | 18.37   | 0.0052 |
| Repetición          | 2  | 0.20    | 0.8266 |
| Inóculo*Ambiente    | 3  | 1.37    | 0.3378 |
| Inóculo*Repetición  | 6  | 1.07    | 0.4681 |
| Ambiente*Repetición | 2  | 3.06    | 0.1215 |

GL= grados de libertad; Valor F= variación fuera de los tratamientos.

P= Probabilidad del valor P (<0.05).

**Anexo 3.** Análisis de varianza para levaduras.

| <b>Descripción</b>  | <b>GL</b> | <b>Valor F</b> | <b>Pr &gt; P</b> |
|---------------------|-----------|----------------|------------------|
| Inóculo             | 3         | 26.20          | 0.0008           |
| Ambiente            | 1         | 132.66         | <.0001           |
| Repetición          | 2         | 0.67           | 0.5484           |
| Inóculo*Ambiente    | 3         | 40.55          | 0.0002           |
| Inóculo*Repetición  | 6         | 0.39           | 0.8636           |
| Ambiente*Repetición | 2         | 0.04           | 0.9595           |

GL= grados de libertad; Valor F= variación fuera de los tratamientos.  
P= Probabilidad del valor P (<0.05).

**Anexo 4.** Análisis de varianza para hongos.

| <b>Descripción</b>  | <b>GL</b> | <b>Valor F</b> | <b>Pr &gt; P</b> |
|---------------------|-----------|----------------|------------------|
| Inóculo             | 3         | 3.96           | 0.0713           |
| Ambiente            | 1         | 1.12           | 0.3303           |
| Repetición          | 2         | 1.44           | 0.3087           |
| Inóculo*Ambiente    | 3         | 7.84           | 0.0169           |
| Inóculo*Repetición  | 6         | 1.26           | 0.3922           |
| Ambiente*Repetición | 2         | 0.68           | 0.5431           |

GL= grados de libertad; Valor F= variación fuera de los tratamientos.  
P= Probabilidad del valor P (<0.05).

**Anexo 5.** Análisis de varianza para pH

| <b>Descripción</b>  | <b>GL</b> | <b>Valor F</b> | <b>Pr &gt; P</b> |
|---------------------|-----------|----------------|------------------|
| Inóculo             | 3         | 14.30          | 0.0038           |
| Ambiente            | 1         | 4.99           | 0.0669           |
| Repetición          | 2         | 3.56           | 0.0955           |
| Inóculo*Ambiente    | 3         | 0.16           | 0.9187           |
| Inóculo*Repetición  | 6         | 4.13           | 0.0541           |
| Ambiente*Repetición | 2         | 0.15           | 0.8605           |

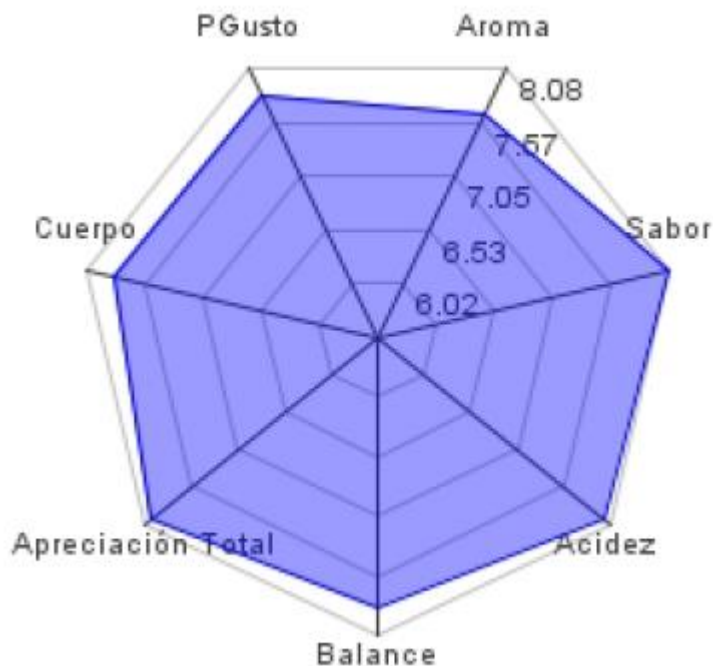
GL= grados de libertad; Valor F= variación fuera de los tratamientos.  
P= Probabilidad del valor P (<0.05).

**Anexo 6.** Análisis de varianza para catación.

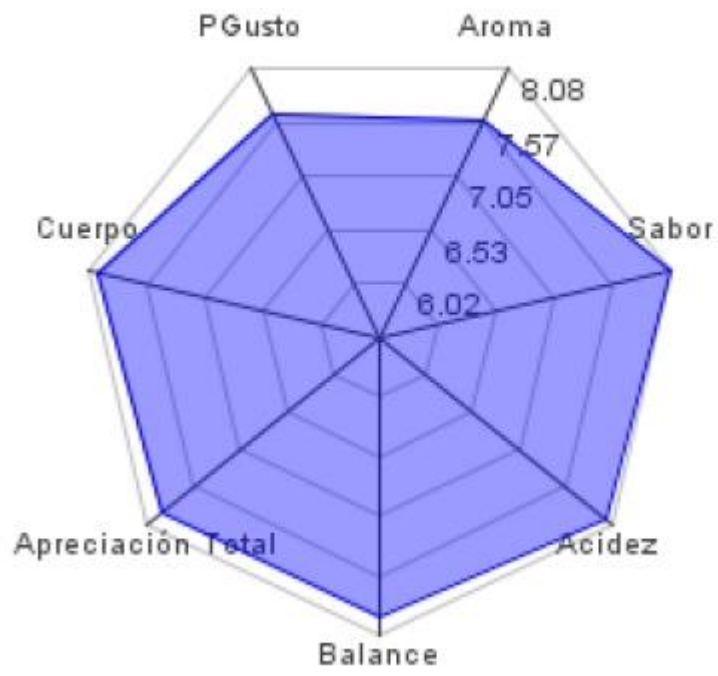
| Descripción              | GL | Valor F | Pr > P |
|--------------------------|----|---------|--------|
| Catador                  | 3  | 93.43   | <.0001 |
| Inóculo                  | 3  | 4.9     | 0.0041 |
| Ambiente                 | 1  | 1.62    | 0.2081 |
| Repetición               | 2  | 0.06    | 0.9374 |
| Catador*Inóculo          | 9  | 2.88    | 0.0065 |
| Catador*Ambiente         | 3  | 0.76    | 0.5236 |
| Inóculo*Ambiente         | 3  | 3       | 0.0373 |
| Catador*Inóculo*Ambiente | 9  | 2.6     | 0.0131 |

GL= grados de libertad; Valor F= variación fuera de los tratamientos.  
P= Probabilidad del valor P (<0.05).

**Anexo 7.** Diagrama de telaraña de catación por atributos de tratamiento cerrado inoculado con L ORO.

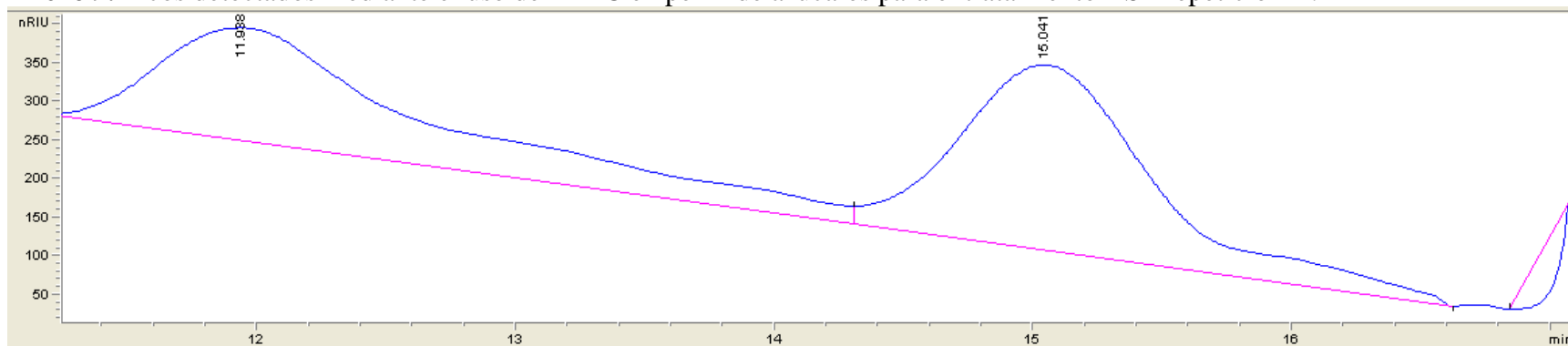


**Anexo 8.** Diagrama de telaraña de catación por atributos de tratamiento abierto sin inculo (Control).



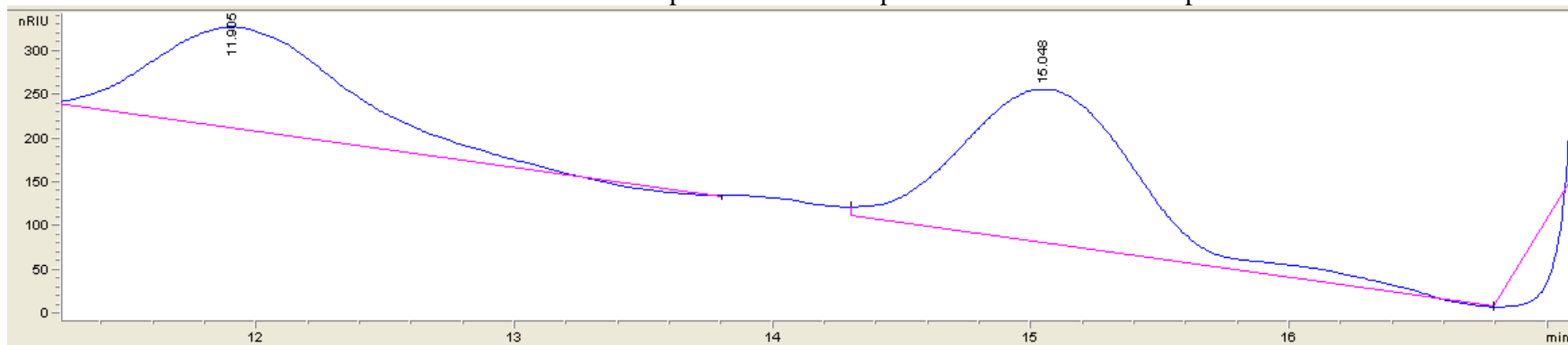


**Anexo 9.** Picos detectados mediante el uso de HPLC en perfil de azucares para el tratamiento ASL repetición A.

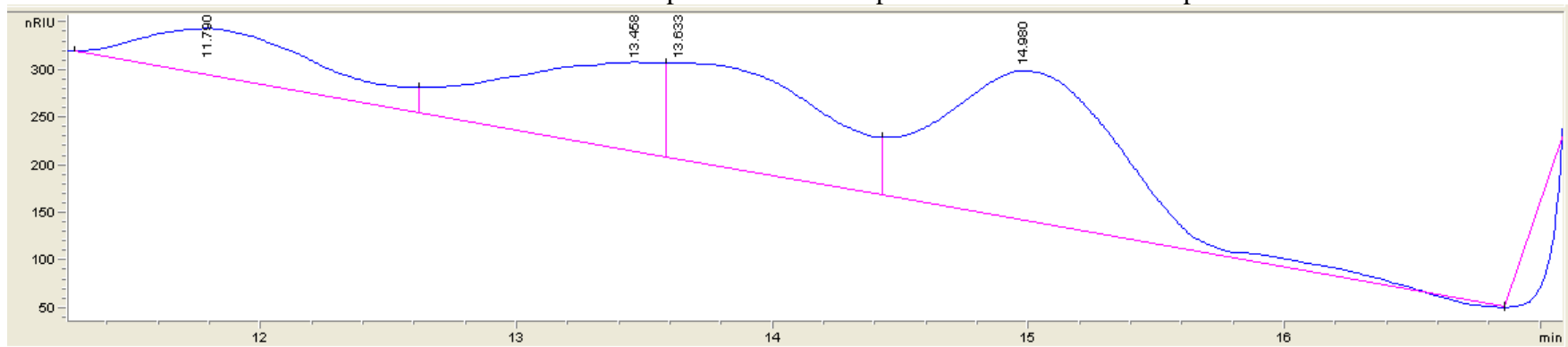


27

**Anexo 10.** Picos detectados mediante el uso de HPLC en perfil de azucares para el tratamiento ASL repetición B.



**Anexo 11.** Picos detectados mediante el uso de HPLC en perfil de azucares para el tratamiento CLO repetición A.



28

**Anexo 12.** Picos detectados mediante el uso de HPLC en perfil de azucares para el tratamiento CLO repetición B.

