

**Evaluación de maceración carbónica y
adición de levaduras (*Saccharomyces
cerevisiae*) durante el lavado de café Geisha
(*Coffea arabica*)**

Manuel Alberto Samaniego Rodriguez

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Evaluación de maceración carbónica y
adición de levaduras (*Saccharomyces
cerevisiae*) durante el lavado de café Geisha
(*Coffea arabica*)**

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

Presentado por

Manuel Alberto Samaniego Rodríguez

Zamorano, Honduras

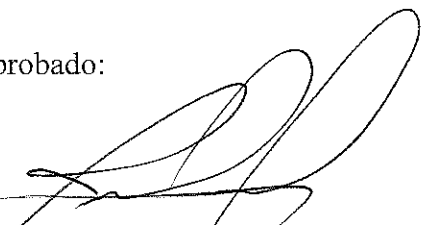
Noviembre, 2019

Evaluación de maceración carbónica y adición de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) durante el lavado de café Geisha (*Coffea arabica*)


Presentado por:

Manuel Alberto Samaniego Rodríguez

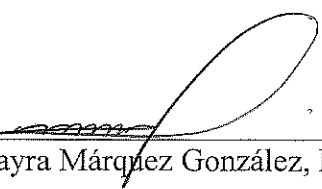
Aprobado:



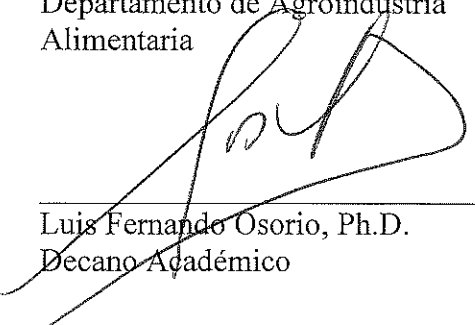
Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor Principal



Mayra Márquez González, Ph.D.
Directora
Departamento de Agroindustria
Alimentaria



Mayra Márquez González, Ph.D.
Asesora



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Decano Académico



por Aracely Vega, D.Sc.
Asesora

Evaluación de maceración carbónica y adición de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) durante el lavado de café Geisha (*Coffea arabica*)

Manuel Alberto Samaniego Rodríguez

Resumen. Se evaluó la fermentación anaeróbica de café con las variables de inyección de CO₂ e inoculación con *Saccharomyces cerevisiae*. El objetivo principal fue evaluar efectos sensoriales en el café producidos por el tratamiento con maceración carbónica y levaduras a 48 y 60 horas de fermentación. El estudio se realizó en Boquete, Panamá. Se utilizó café Geisha (*Coffea arabica*), cultivado a 1700 msnm. Este café fue despulpado y posteriormente colocado en tanques fermentativos donde se hizo la inyección de CO₂ y adición de inóculo a los tratamientos. Una vez finalizado el proceso fermentativo, el café fue lavado, secado en patio, empacado y puesto en reposo por un mes aproximadamente. Se realizó una catación con panelistas certificados. Se hicieron recuentos microbiológicos de hongos, levaduras y bacterias ácido lácticas al final de la fermentación. Se tomaron muestras de todos los cafés tostados, y se realizaron análisis proximales, y contenido de cafeína y ácidos clorogénicos por HPLC. El café con el tratamiento de 60 horas de fermentación, con inyección de CO₂ y la asistencia con levaduras fue el mejor evaluado por los catadores obteniendo un puntaje de 92.22 (testigo 89.49 puntos). Químicamente se encontraron diferencias en el contenido de grasa y fibras. Se concluyó que las variables inóculo, el tiempo y la interacción de CO₂ × inóculo × tiempo, afecta sensorialmente el café. Las levaduras proveen aromas y sabores que son apreciados por los catadores. La fermentación no hace que se produzcan cambios químicos significativos en los cafés.

Palabras clave: Cafés especiales, catación, fermentación, inóculo.

Abstract. Anaerobic coffee fermentation was evaluated by variables of CO₂ injection and inoculation with *Saccharomyces cerevisiae*. The main objective was to evaluate sensory effects in coffee produced by treatment with carbonic maceration and yeasts at 48 and 60 hours of fermentation. The study was conducted in Boquete, Panama. Geisha coffee (*Coffea arabica*) was used cultivated at 1700 masl. This coffee was pulped and subsequently placed in fermentation tanks where CO₂ injection was made and inoculum added to the treatments. Once the fermentation process was finished, the coffee was washed, dried in the yard, packed and put to rest for a month. There was a cupping with certified panelists. Microbiological counts at the end of the fermentation of fungi, yeasts and lactic acid bacteria were performed. Samples of all roasted coffees were taken and proximal analysis was made. Caffeine and chlorogenic acids were counts by HPLC. The coffee with the 60-hour fermentation treatment, with CO₂ injection and the assistance with yeasts was the best evaluated by the tasters obtaining a score of 92.22 (control 89.49 points). Chemically differences were found in fat and fiber content. It was concluded that the variables inoculum, time and the interaction of CO₂ × assistance × time of fermentation, sensorially affect coffee. Yeasts provide aromas and flavors that are appreciated by tasters. Fermentation does not cause significant chemical changes in coffees.

Key words: Cupping, fermentation, inoculum, specials coffees.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iii
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	21
5. RECOMENDACIONES.....	22
6. LITERATURA CITADA.....	23
7. ANEXOS	28

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de los tratamientos durante el proceso de fermentación de café geisha.	4
2. Perfil de tostado para cataciones de cafés especiales.	5
3. Recuentos de hongos, levaduras, bacterias ácido lácticas y valores de pH al final del proceso de fermentación por maceración carbónica.	11
4. Resultados de las cataciones, realizadas a cada uno de los tratamientos.	14
5. Comparación de análisis proximal, realizado a cada tratamiento en café tostado.....	18
6. Resultados de análisis de cafeína y ácidos clorogénicos (5-CQA, 4-CQA y 3-CQA), cuantificados por HPLC, en muestras de café Geisha tostado y molido.....	20

Figuras	Página
1. Cromatograma obtenido de la cuantificación por HPLC de cafeína en café Geisha, tostado y molido. Resultados obtenidos a una longitud de onda de 275 nm.	19
2. Cromatograma obtenido de la cuantificación por HPLC, de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA) y ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), en café Geisha, tostado y molido. Resultados obtenidos a una longitud de onda de 360 nm.	19

Anexos	Página
1. Análisis de varianza para Hongos	28
2. Análisis de varianza para Levaduras.	28
3. Análisis de varianza para BAL.	28
4. Análisis de varianza de pH.	29
5. Análisis de varianza de aroma.	29
6. Análisis de varianza de sabor.	29
7. Análisis de varianza de acidez.	29
8. Análisis de varianza de cuerpo.	30
9. Análisis de varianza de balance.	30
10. Análisis de varianza de calificación en frío.	30
11. Análisis de variancia de calificación general.	30
12. Análisis de varianza de puntaje final.	31
13. Análisis de varianza de cafeína.	31
14. Análisis de varianza de ácidos clorogénicos.	31
15. Grafica de concentración de 5-CQA, 4-CQA y 3-CQA en café Geisha, tostado y molido	32
16. Hoja de control de tueste de todos los tratamientos.	33
17. Formato utilizado para catar los cafés.	34

1. INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo y según la FAO (2004), el consumo de café aumenta 0.4% cada año. Actualmente, existen dos principales rubros en el mercado de café, uno de ellos es el mercado de cafés de alta calidad o especiales. A nivel mundial, Panamá es uno de los principales países productores de cafés en términos de calidad (Mundo social 2018). El segmento de cafés especiales representa aproximadamente el 10% del consumo mundial y según expertos el consumo de cafés especiales y con denominación de origen continuará creciendo exponencialmente (Fórum del Café 2018). Un café se considera especial cuando es percibido y valorado por los consumidores por alguna característica que lo distinga de los cafés convencionales y por lo cual, los consumidores están dispuestos a pagar un precio superior (Cardona 2010). Para producir cafés especiales, los productores deben controlar factores de campo, así como el proceso de beneficiado. Para obtener una taza de café con alta calidad, el proceso de fermentación es el más importante en términos de beneficio (Velmourougane 2013; Puerta 2015). Otros factores que determinan la calidad del café son las condiciones climáticas, el suelo, el tipo de manejo del cultivo, procesamiento poscosecha y la forma de preparación de la bebida (Puerta 1999).

Con el crecimiento del mercado de cafés especiales, las investigaciones científicas en este rubro, han aumentado. Se ha empezado a estudiar la composición química y la microbiota presente en procesos como la fermentación del mucílago, buscando siempre el mejoramiento de la calidad del café. Para el beneficiado de cafés especiales en Latinoamérica, se manejan dos métodos. El primer método es el método natural, que consiste en secar el café cereza (fruto completo) al sol por un tiempo de cuatro a cinco días aproximadamente. La duración del proceso dependerá de las condiciones climáticas. Para el café natural, es necesario moverlo constantemente para exponer las frutas húmedas y así el secado se dé más rápido y uniforme (Boren *et al.* 2008). El segundo método consiste en el café lavado, éste se consigue desmucilaginando ya sea por medio de una máquina conocida como desmucilaginadora o por fermentación húmeda o seca, en ambientes abiertos o cerrados y con condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Puerta 2013). Durante el proceso de fermentación, actúan enzimas, bacterias lácticas y levaduras del mucílago que transforman los compuestos pécticos y azúcares en azúcares simples, ácidos y alcoholes, que son luego retirados en el lavado (Zuluaga 1988; Puerta 2013). La fermentación representa un punto crítico en el proceso, si el café no llega al punto de corte, que es cuando el mucílago se desprende fácilmente, podría haber problemas en el secado del mismo. Por otra parte, si ocurre sobrefermentación se producirá café con aroma y sabor a vinagre, piña madura, cebolla o rancio (Puerta 1996). A pesar de que es una técnica muy antigua en el beneficiado de café, son pocas las personas que han podido controlar la fermentación (Puerta 2015). La recomendación es que cada finca o beneficio, desarrolle su

propio protocolo de fermentación considerando sus condiciones climáticas, agrícolas y sus limitaciones en implementación de tecnologías (Puerta 2012).

La maceración carbónica es un proceso originalmente desarrollado por la industria del vino. El proceso de la maceración carbónica, consiste en colocar la fruta entera en el caso de la uva, en un medio cerrado y hermético, rellenar el contenedor con dióxido de carbono (CO₂) y obligar a la uva a entrar en un proceso de fermentación anaeróbica (Tesniere y Flanzky 2011). En café, esta técnica se utilizó por primera vez por el barista Sasa Sastic, quien ganó el World Barista Championship con un café lavado por maceración carbónica (WBC 2019). El propósito de utilizar esta técnica en café, es el amplio periodo de exposición al ambiente fermentativo, además tiene la variación de que se elimina la pulpa a las cerezas de café. Sastic señaló en una entrevista, que llevo la fermentación hasta 65 horas, a una temperatura ambiente de 20 °C y con esto logró aumentar atributos como la dulzura y claridad de la taza (Newton 2017).

Para unificar el criterio de evaluación de café, el SCAA (Specialty Coffee Association of America) ha desarrollado protocolos de catación y calificación, los cuales evalúan atributos como el cuerpo, sabor, la acidez, entre otros. Químicamente, existen compuestos que están relacionados con el sabor del café, entre ellos se encuentran los azúcares, lípidos proteínas, alcaloides como la cafeína, compuestos nitrogenados, ácidos clorogénicos y sustancias volátiles aromáticas (Puerta 2011). El efecto en los atributos es causado por la combinación de reacciones que suceden en conjunto o de manera individual con estas moléculas cuando ocurren procesos como el tostado. En esta investigación, se evaluó el efecto de la técnica de maceración carbónica y la inoculación con levaduras fermentativas sobre las propiedades sensoriales y fisicoquímicas de café arábica variedad Geisha. La fermentación fue cerrada, sumergida en agua y en ambiente anaeróbico. Los objetivos de este estudio fueron:

- Cuantificar los principales grupos de microorganismos presentes en la fermentación anaeróbica de café.
- Evaluar el efecto producido por la adición de levaduras, la inyección de CO₂ y el tiempo de fermentación sobre los atributos sensoriales del café.
- Analizar químicamente todos los tratamientos y determinar si hubo cambios en la composición química por causa de las variables controladas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. El proyecto se realizó en las instalaciones del beneficio de Hacienda La Esmeralda, ubicada en Palmira, Boquete, Panamá, el cual está a 1120 msnm, con una temperatura promedio de 21 °C para el mes de febrero, precipitación histórica de 58 mm y humedad de 47% (Weather Spark 2019). Las cataciones se realizaron en la sala de catación del beneficio de Hacienda La Esmeralda. Los análisis microbiológicos y químicos se llevaron a cabo en el Centro de Investigación en Recursos Naturales de la Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI), en los laboratorios de micología y química del mismo.

Pruebas preliminares. Previo al estudio, se realizaron pruebas preliminares de fermentación para determinar el inóculo que se usaría, también se evaluó el tiempo en que se corta o desmucilagina totalmente el café en fermentación bajo las condiciones del beneficio y se hicieron pruebas preliminares microbiológicas en laboratorio. El estudio fue dividido en tres partes, las cuales son etapa de fermentación, análisis sensoriales o catación por panelistas certificados por el SCAA y análisis microbiológicos y fisicoquímicos.

Fermentación del café.

Inóculo. Para este experimento, se utilizó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, proveída al beneficio por empresa LALCAFÉ™, la cual se usó en la proporción 1:1000 (g de levadura: g de café). Esta levadura tiene como funcionalidad principal, realzar los atributos sensoriales del café, homogenizar la fermentación y hacer el proceso más eficiente.

Maceración carbónica. Para la maceración carbónica, se construyó un sistema de tuberías de PVC para la inyección de CO₂, el cual se conectó por medio de mangueras y un manómetro a un tanque lleno del gas. El sistema de inyección de CO₂, fue diseñado para poder aplicar el gas a los tratamientos que lo requieran de manera uniforme. Cuando se inyecta CO₂, el oxígeno presente en el medio se desplaza por diferencia de densidades (Anocibar 1992), obligando al mismo a salir del contenedor. Se utilizará el método utilizado para uvas descrito por Tesniere y Flanzky (2011).

Fermentación. Se utilizó un café tipo arábica, variedad Geisha en su punto óptimo de corte con 23 °Brix, medidos con un refractómetro óptico modelo 300005 de la marca Sper Scientific. El café fue cosechado en el lote León de la finca Cañas Verdes ubicada a 1688 msnm en la empresa Hacienda La Esmeralda S.A. ubicada en Boquete, Panamá. Al recibir el café en cereza de campo, se procedió a retirar la pulpa del mismo. Este procedimiento se hizo en una máquina despulpadora de la marca Pinhalense modelo ecoflex-4 diseñada para cafés arábicas. Se realizó una fermentación cerrada y sumergida en agua, en contenedores

plásticos de 3.73 litros. Se hicieron dos niveles de fermentación los cuales fueron 48 y 60 horas. A cada unidad experimental (UE), se le colocó 2.5 kg de café, se sumergió en agua y se agregó el inóculo a los tratamientos que lo requerían. El cuadro 1 describe los tratamientos de fermentación.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos durante el proceso de fermentación de café geisha.

Tiempo de duración (horas)	Fermentación	Inyección de CO ₂
48	Asistida ¹	SI
	Asistida	NO
	Normal	SI
	Normal	NO
60	Asistida	SI
	Asistida	NO
	Normal	SI
	Normal	NO

¹Asistido con inoculación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Lavado del café. Después de haber finalizado la fermentación, se procedió a lavar el café para retirar el mucílago del grano. Se utilizó el método descrito por Puerta (2012).

Secado del café. El café pergamino fue secado al sol, hasta tener una humedad entre 11 y 12%. Se utilizó el método descrito por Puerta (2015).

pH.

Se midió con un medidor portátil, modelo PH60S de la marca APERA instruments. Se tomaron mediciones al inicio y al final de la fermentación a cada unidad experimental. Se recolectaron 50 ml de la solución de mucílago y agua, y se tomó la medición con el equipo portátil.

Análisis microbiológicos.

Se hicieron recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL), hongos y levaduras. Se tomaron muestras líquidas de aproximadamente 5 mL, extraídas de la masa fermentable al final de la fermentación. Para el recuento de hongos y levaduras, se utilizó la metodología descrita por Camacho (2011), con variaciones. Se utilizó como diluyente buffer fosfato, y el medio de cultivo fue agar papa dextrosa (PDA), se le agregó al medio un antibiótico (cloranfenicol al 29%), como inhibidor de bacterias. Se realizaron diluciones decimales y se inocularon las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁶. Para el recuento de BAL, se utilizó la metodología descrita por Rosetti (2016). Como medio de cultivo, se utilizó placas desechables para recuento de Bacterias Ácido Lácticas 3M® Petrifilm®.

Diseño experimental.

Se usó un DCA (Diseño completamente al azar), con un arreglo factorial ($2 \times 2 \times 2$), donde se tuvieron dos tipos de fermentación (asistida y normal), inyección de CO₂ (sí o no) y dos tiempos de fermentación (45 y 60 horas). Se hicieron tres repeticiones, para un total de 24 unidades experimentales. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS® versión 9.4, se realizó un ANDEVA (análisis de varianzas), mediante un modelo lineal GLM y una separación de medias LS-Means para encontrar diferencias estadísticas entre tratamientos y se utilizó un nivel de significancia de 95%

Análisis sensorial.

El análisis sensorial fue desarrollado en la sala de cataciones de la Hacienda la Esmeralda, el cual fue realizado por tres panelistas entrenados o catadores, certificados por SCAA. Como estándares para la calificación, se utilizaron los protocolos y métodos descrito por SCAA. Cada muestra fue identificada con números del 1 al 8, ordenados completamente al azar y se prepararon tres mesas correspondientes a las tres repeticiones.

Trillado.

Las muestras fueron trilladas mediante el uso de una trilladora de mesa para muestras pequeñas de la marca SIEMENS, modelo IRF3 092-4YB90. Se limpió esta máquina entre trillas para evitar contaminación cruzada de las muestras como lo describieron Cruz y Pivaral (2018).

Tostado y molido.

Las muestras fueron tostadas y molidas según los métodos descrito por SCAA (2019), para cataciones de café arábica. El tiempo de tostado de cada café osciló entre 7 y 9 minutos, debido a diferencias en humedad, densidad, tamaño y uniformidad del grano (Cruz y Pivaral 2018) hasta obtener el perfil deseado en la escala AGTRON/SCAA (Cuadro 2). Después del tostado, las muestras se dejaron reposar por 24 horas, empacadas en bolsas con válvula de gases de una vía, esto con el fin de evacuar el CO₂ emitido por el café y a la vez proteger el café tostado del aire evitando la pérdida de atributos por oxidación (Puerta 2015). Para tostar se usó una maquina marca PROBAT, modelo VE31DB25. El molido se hizo en un molino marca BUNN, modelo Coffee Mill, y se hizo justo antes de la catación, como lo describe el SCAA (2019).

Cuadro 2. Perfil de tostado para cataciones de cafés especiales.

	AGTRON/ SCAA	L	a*	b*
Tostado para cataciones, grado gourmet.	63 ± 1	37	5	13

Fuente: SCAA 2019.

Preparación del café.

Para la preparación de la infusión, se colocaron 12 g de café por taza, pesados en una balanza con capacidad de 300 g marca Daewoo. Se procedió a calentar agua a 97 °C en teteras marca Hamilton Beach. Se añadió agua caliente a cada taza con café hasta llegar al máximo nivel posible y se dejó reposar por 4 minutos.

Análisis químicos.

Para todos los análisis químicos se utilizó café tostado. Se preparó una muestra compuesta de las tres repeticiones, dando un total de ocho muestras las cuales fueron analizadas cada una por triplicado.

Análisis proximal. Se realizó un análisis proximal, para medir proteínas, ceniza, carbohidratos, fibra, lípidos y humedad usando las siguientes metodologías:

- Cenizas: AOAC 9 42.05
- Fibra: AOCS Ba 6a-05
- Humedad: AOAC 934.0
- Proteína: AOAC 2001.11
- Grasas totales: AOCS Am 5-04
- Carbohidratos: por diferencia.

Cafeína (Método validado del Centro de Investigación en Recursos Naturales-UNACHI). Se realizó un análisis de Cafeína por HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Los estándares de cafeína fueron preparados en metanol-H₂O al 2%. Primero una solución madre a 0.875 mg/mL y dos estándares a partir de la solución madre, uno a 0.0105 mg/mL para la verificación del sistema y a 0.035 mg/mL para cuantificación. Se molió el café en grano en un molino marca Dayton, modelo 6K428BA. Se pesaron 0.125 g por cada muestra en un vial de 5 mL y se le adicionó 2.5 mL de solución de extracción agua-metanol (1:1). Se agitó en un vortex marca SCILOGEX por 3 minutos. Se tomó una alícuota de 1 mL, se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con agua destilada. Se filtró la solución con filtros de nylon de 0.45 µm y diámetro de 25 mm de grado HPLC para jeringas y se procedió a la inyección. La identificación y cuantificación se llevó a cabo en un sistema HPLC marca Agilent, modelo 1260 Infinity, con bomba cuaternaria modelo G1311C, compartimiento de columna termostatazado modelo G1316A, detector de arreglo de diodos modelo G1315D, operando a 275 nm e inyector manual modelo G13286. La separación se llevó a cabo con una columna modelo ZORBAX SB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm). Las condiciones de separación establecidas fueron las siguientes: fase móvil isocrática 90% H₂O y 10% acetonitrilo, volumen de inyección de 20 µL y flujo de 1.0 mL/min. El contenido de cafeína en café, expresado en porcentaje se obtuvo mediante la ecuación 1.

$$\% \text{ de cafeina} = \frac{Am * Ce * Ve * Vd}{Ae * Pm * Va} * 100 \quad [1]$$

Donde:

Am = Área de la muestra

Ae = Área del estándar

Ce = Concentración del estándar

Ve = Volumen de extracción

Vd = Volumen de dilución
 Pm = Peso de la muestra

Va = Volumen de alícuota.

Ácidos clorogénicos. Se analizó la cantidad de ácido clorogénicos ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA) y ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA) presentes en las muestras de café por HPLC, utilizando la metodología propuesta por (Vega *et al.* 2018). Se inició preparando los estándares con ácido clorogénico 5-CQA a concentraciones 5, 10, 25, 50, 75 y 100 ppm. Los solventes fueron metanol (pureza: 99.8%) y ácido trifluoroacético (pureza: 99.5%) de grado HPLC. Para la obtención del extracto acuoso, se pesaron 0.25 g de café, se mezcló con 25 mL de agua destilada y se colocó en una placa de calentamiento marca Biomega modelo H-4000-HS, a calentar hasta que alcanzara 90 °C, se mantuvo a esta temperatura por 5 minutos. Se dejó enfriar, y luego se cambió la muestra a un tubo de centrifuga de 50 mL y se centrifugó por 15 minutos a 10,000 rpm, a temperatura de 5 °C, se hizo en una centrifuga marca Hettich Zentrifugen Rotina-38R. El sobrenadante se decantó en un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con agua destilada. Antes de inyectar en el sistema HPLC, el sobrenadante diluido se filtró a través de filtros de nylon grado HPLC de jeringa de 0.45 µm y diámetro de 25 mm. La identificación y cuantificación se llevó a cabo en un sistema HPLC marca Agilent, modelo 1260 Infinity, con bomba cuaternaria modelo G1311C, compartimiento de columna termostatazido modelo G1316A, detector de arreglo de diodos modelo G1315D, operando a 325 y 280 nm con inyección manual. La separación se llevó a cabo con una columna ZORBAX SB-C18 Stable Bond Analytical (4.6 × 150 mm, 5 µm). Las condiciones de separación establecidas fueron las siguientes: volumen de inyección de 20 µL, flujo de 0.4 mL/min, fase móvil A (agua con 0.02% de ácido trifluoroacético), fase móvil B (metanol con 0.02% de ácido trifluoroacético), temperatura de 25 °C y tiempo de corrida de 60 min. El gradiente programado fue el siguiente: 98:2 (solvente A: solvente B) a los 0 min, 68:32 a los 30 min, 60:40 a los 40 min, 60:40 a los 45 min y 98:2 a los 50 min. La determinación de ácidos clorogénicos, se hizo a través de la ecuación 2.

$$\% \text{ de ácidos clorogénicos} = \frac{Ca * 0.025 * Fd}{Pm * \%ms} * 100 \quad [2]$$

Donde:

Ca = Concentración del ácido

Fd = Factor de dilución

Pm = Peso de la muestra

$\%ms$ = Porcentaje de materia seca de la muestra

0.25 = Constante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fermentación del café.

En la fermentación de café, las bacterias y levaduras del mucílago oxidan parcialmente los azúcares a través de sus enzimas y producen energía (ATP), etanol, ácido láctico, ácido acético y dióxido de carbono (Puerta 2012). La fermentación, también ayuda al desarrollo de aromas y sabores que traslocan hasta la taza del consumidor (Haile y Kang 2019). Dentro de una fermentación, predominan las levaduras del género *Saccharomyces*, mientras que de las bacterias ácido lácticas predominan las del género *Lactobacillus* (Velmourougane 2013). En ambientes anaeróbicos con altas concentraciones de CO₂, se reduce el crecimiento de bacterias ácido lácticas (Avallone *et al.* 2001). Por otra parte, las levaduras son organismos aeróbicos facultativos, lo cual indica que pueden metabolizar en ambientes con y sin oxígeno (Jouhten y Penttilä 2014; Piškur y Compagno 2014).

Al final de la fermentación, no hubo diferencias en el crecimiento de las bacterias ácido lácticas. El promedio de los recuentos finales de levaduras, fue mayor cuando la fermentación fue asistida. Esto, debido a la población adicional de levaduras (1g levadura/kg de café baba) que se le colocó a este proceso. La inyección de CO₂ al proceso, significó una limitante para el crecimiento de las BAL, lo que concuerda con Puerta (2010), quien encontró que gases como el N₂ y CO₂, inhiben el crecimiento de estos microorganismos. El pH al final de los procesos, fue mayor en donde se asistió (Cuadro 3). Esto ocurrió gracias a que las levaduras producen ácidos (cítricos, málicos, butíricos) de menor potencia que los ácidos que producen las BAL (Schwan y Fleet 2014).

Levaduras.

Las levaduras son organismos que en ausencia de O₂, fermentan azúcares simples (Puerta 2010; Piškur y Compagno 2014). La inoculación con levaduras, se hizo para facilitar el proceso de fermentación, ya que estos microorganismos producen enzimas como pectinasa, poligalacturonasa y pectimetilestearasa que se encargan de la hidrólisis de moléculas complejas (Agate y Bhat 1966; Haile y Kang 2019). Al analizar los recuentos de levaduras (Cuadro 3), se observó que el tipo de fermentación (asistida y normal), fue una fuente de variación ($P \leq 0.05$), al igual que el factor tiempo (48 y 60 horas). El factor CO₂, no influyó en el crecimiento de las levaduras al igual que la interacción de los tres factores (Fermentación \times tiempo \times CO₂). En general, la población de levaduras aumentó durante el proceso, lo que concuerda con Velmourougane (2013), quien encontró que en fermentaciones de café, las levaduras crecen hasta alcanzar las 72 horas, que es donde su población llega a su máximo crecimiento y empieza la fase de muerte celular (Cuadro 3). Los recuentos después de 60 horas de fermentación fueron en promedio 7.1 log UFC/mL, mayores que los de 48 horas que fueron de en promedio de 6.8 log UFC/mL

Según Puerta *et al.* (2015), la población inicial de levaduras en una fermentación es de 5 a 6 log UFC/mL, y cambiará según las condiciones de clima y sanidad de cada lugar. El tratamiento de 48 horas, normal y sin inyección de CO₂, presentó el recuento menor de levaduras. Se pudo observar que, al no haber inyección de dióxido de carbono, y no haberse agregado una población extra de levaduras, los hongos y las BAL crecieron más (Cuadro 3). Las levaduras son los microorganismos dominantes durante un proceso fermentativo, inhibiendo a sus competidores a través del tiempo (Velmourougane 2013; Schwan y Fleet 2014). Las levaduras realzan los atributos sensoriales de los cafés (Cruz y Pivaral 2018; Haile y Kang 2019), por lo que se podría esperar mejores puntajes en las evaluaciones sensoriales de los cafés con asistencia de levaduras.

Bacterias ácido lácticas.

Son organismos microaerófilos que pueden sobrevivir en concentraciones de O₂ menores a 10%. Cuando la presencia de O₂ es casi nula, estas bacterias fermentan los azúcares (Puerta 2010). Este grupo de bacterias, al igual que las levaduras poseen enzimas que ayudan al desdoblamiento de polisacáridos, lípidos, proteínas, entre otros compuestos. De estos compuestos, se producen alcoholes, azúcares simples y ácidos (láctico, butírico, acético, málico y cítrico). A la vez, de estos ácidos se producen pequeñas cantidades de acetaldehído y diacetilo que posteriormente con la intervención del proceso de tostado producen compuestos volátiles otorgando sabores y aromas agradables que son apreciados por los catadores al evaluar el café (Huertas 2010; Haile y Kang 2019). En el caso de las BAL (Cuadro 3), se encontró que la inyección CO₂ y el tiempo, influyeron significativamente ($P \leq 0.05$) en el crecimiento de estas bacterias. El tipo de fermentación no fue una fuente de variación significativa al igual que la interacción de los tres factores. Dentro de un ambiente fermentativo, las bacterias alcanzan sus crecimientos máximos a las 48 horas, después de este tiempo empiezan a morir por causa de la competencia por nutrientes (Concha *et al.* 2010; Velmourougane 2013). Durante este experimento, en promedio el bloque de fermentación con 48 horas se obtuvo 4.22 log UFC/mL de BAL. Mientras que el bloque de 60 horas, presentó en promedio recuentos de 4.05 log UFC/mL (Cuadro 3). Probablemente como lo afirman distintos autores, el CO₂ inhibió a este grupo de bacterias en este proceso. Durante el crecimiento de las BAL se producen alcoholes, ácidos y CO₂ en cantidades significantes, que cuando alcanzan una concentración definida, inhiben su crecimiento (Huertas 2010). Al ver los tratamientos de 48 horas con fermentación normal e inyección de CO₂ y 60 horas con fermentación normal e inyección de CO₂, se puede explicar que el CO₂ producido por los microorganismos más el que fue añadido, posiblemente ocasionó que se obtuvieran los recuentos más bajos (Puerta 2010).

Hongos.

No existen reportes de que los hongos intervengan en la degradación del mucílago de las frutas de café (Schwan y Fleet 2014). Los hongos frecuentes en el café y sus partes son del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* (Puerta *et al.* 2015). Al revisar el comportamiento de los hongos (Cuadro 3), solo la interacción de las tres variables (Fermentación \times tiempo \times CO₂), significó una fuente de variación en el crecimiento de estos organismos durante la fermentación. En general, el crecimiento de los hongos fue menor en comparación con las levaduras y las BAL. Esto pudo ser causado por la

competencia por nutrientes en el medio fermentativo. Cuando el proceso de fermentación no retira completamente el mucilago, se dificulta el proceso de secado y se crea un ambiente propicio para el desarrollo de hongos, los cuales pueden producir compuestos químicos como las micotoxinas y ácidos (propiónicos y butíricos), que confieren sabores no deseados, como el sabor a cebolla por ejemplo (Schwan y Fleet 2014; Haile y Kang 2019). Según los resultados obtenidos (Cuadro 3), se coincide con Suarez *et al.* (2004), quienes encontraron que se disminuye el riesgo de producción de toxinas micóticas, cuando en la fermentación hay mayor concentración de levaduras.

pH.

En fermentaciones cerradas y con ausencia de oxígeno, los microorganismos producen CO₂. Este dióxido de carbono ayudara a la acidificación del medio (Puerta 2012, 2013). Las bacterias ácido lácticas, producen ácidos orgánicos que se producen gracias al desdoblamiento de los azúcares del mucílago. Estos ácidos contribuyen a las disminución del pH (Velmourougane 2013). Las levaduras producen ácidos de menor potencia y es por esto que cuando se asistió con inóculo el pH fue mayor. En este estudio, se obtuvieron resultados distintos a otras investigaciones (Cuadro 3), ya que estadísticamente el pH no se vio afectado por el CO₂, pero sí fue afectado por las levaduras y el tiempo.

Cuadro 3. Recuentos de hongos, levaduras, bacterias ácido lácticas y valores de pH al final del proceso de fermentación por maceración carbónica.

¹ Fermentación	² Hongos	Levaduras	BAL	pH
	Log UFC/MI	Log UFC/mL	Log UFC/mL	
48 h asistida + CO ₂	3.30 ± 0.30 ^{bc}	6.88 ± 0.09 ^c	4.12 ± 0.20 ^{bc}	4.36 ± 0.11 ^a
48 h asistida	3.20 ± 0.17 ^{bc}	6.95 ± 0.05 ^{bc}	4.41 ± 0.11 ^a	4.28 ± 0.11 ^{ab}
48 h normal + CO ₂	3.50 ± 0.17 ^{ab}	6.93 ± 0.30 ^{bc}	3.76 ± 0.13 ^d	3.89 ± 0.02 ^{cd}
48 h normal	3.67 ± 0.18 ^a	6.58 ± 0.04 ^d	4.44 ± 0.19 ^a	3.95 ± 0.03 ^c
60 h asistida + CO ₂	3.74 ± 0.12 ^a	7.18 ± 0.04 ^a	4.04 ± 0.18 ^{bc}	4.28 ± 0.06 ^{ab}
60 h asistida	3.49 ± 0.20 ^{ab}	7.22 ± 0.10 ^a	4.24 ± 0.08 ^{ab}	4.18 ± 0.08 ^b
60 h normal + CO ₂	3.42 ± 0.10 ^b	7.12 ± 0.07 ^{ab}	3.92 ± 0.15 ^{cd}	3.80 ± 0.04 ^d
60 h normal	3.00 ± 0.30 ^c	7.06 ± 0.19 ^{abc}	4.2 ± 0.08 ^{ab}	3.83 ± 0.10 ^{cd}
³ CV (%)	6.05	1.70	3.56	1.86

≡

¹Descripción del proceso fermentativo de cada tratamiento, en donde se especifica el tiempo que duró el proceso (48 y 60 horas), si se asistió o no con inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, y si se inyectó o no CO₂. ²Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones. ^{a-e}Valores seguidos de una letra diferente en cada columna, representan diferencia estadística entre tratamientos ($P \leq 0.05$). ³CV (%)= coeficiente de variación expresado en porcentaje.

Análisis sensorial.

El análisis sensorial o como en el mundo de café se conoce como catación es el proceso que se realiza para evaluar cafés de alta calidad. Los catadores, deben ser entrenados para que el error experimental se reduzca y obtener resultados confiables. El SCAA, ha establecido procedimientos y escalas de puntuación para calificar cafés y éstas son aceptadas a nivel mundial.

En el puntaje final (Cuadro 4), los factores que estuvieron involucrados en los cambios sensoriales en los cafés ($P \leq 0.05$), fueron la asistencia con inóculo, la inyección con CO_2 , el catador y la interacción entre factores (Fermentación \times CO_2 \times Tiempo). A pesar de que los catadores resultaron como una fuente de variabilidad en el análisis estadístico, el coeficiente de variación fue de 0.79%. Esto indica que el experimento fue conducido correctamente y que las pequeñas diferencias entre catadores pueden deberse a que son personas quienes podrían diferir en ciertos criterios de evaluación. En general, cuando la fermentación se asistió con levaduras se obtuvieron puntajes finales mayores que cuando no se inoculó. Lo mismo sucedió con la inyección de CO_2 , que reflejó puntajes finales mayores que cuando no se inyectó este gas. El tratamiento con mejor calificación (92.22) fue el de 60 horas de fermentación, asistido con inóculo e inyección de CO_2 (Cuadro 4). Este tratamiento mejoró la puntuación del café en un 3.13% en comparación con el testigo (sin inóculo y sin inyección de CO_2). En cafés especiales esto representa una clara diferencia debido a que las cataciones consideran hasta los más mínimos detalles de cada café y un punto de diferencia puede significar un cambio significativo en la valoración comercial de un café (Giovannucci 2001). Las levaduras afectan las características sensoriales del café (Puerta *et al.* 2015; Cruz y Pivaral 2018). Este grupo de microorganismos producen alcohol, azúcares simples, ácidos orgánicos y compuestos volátiles. Estos compuestos producidos por las levaduras se traducen en tazas de alta calidad, aromas florales, frutales y cítricos que distinguen una taza de otra (Haile y Kang 2019). Al observar el atributo de aroma (Cuadro 4), los cafés asistidos con inóculo de levaduras presentaron una calificación mayor. Los catadores resaltaron aromas a perfume de flores, frutas cítricas y miel silvestre.

Con respecto a la categoría de sabor, los cafés con inóculo de levaduras presentaron mejor calificación que los que no se les agregó levaduras. Los catadores resaltaron sabores a kiwi, sandía, miel y duraznos. En el café se han registrado acerca de 600 sabores, de los cuales 60 influyen directamente en la taza (Scholes 2014). Las levaduras también influyeron sobre la acidez debido a la degradación de compuestos que metabolizan sus enzimas (Agate y Bhat 1966; Piškur 2014). Los ácidos cítricos, acéticos, málicos, fórmicos, fosfóricos, glicólicos, lácticos y otros ácidos producidos por el metabolismo de levaduras, influyen sobre la acidez de la taza. El cuerpo, balance y evaluación en frío también fueron influidos de manera significativa por las levaduras (Cuadro 4). Algunos comentarios de los catadores respecto al tratamiento mejor calificado fueron excelente acidez, cuerpo muy balanceado, cremoso, jugoso, fresco y excelente percepción en la boca.

La inyección de dióxido de carbono es una técnica utilizada por la industria vitícola y se le denomina maceración carbónica. El CO_2 , retarda el proceso de fermentación principalmente por la inhibición de BAL que son rápidos acidificadores. Al retardar el proceso, hay una mayor exposición de los granos al alcohol y otros compuestos que son

absorbidos por el grano. Se observó que el CO₂, representó una fuente de variación ($P \leq 0.05$) en los atributos de cuerpo, balance de la taza y el puntaje final (Cuadro 4). Cuando se inyectó este gas, el tratamiento mejor evaluado mejoró su cuerpo un 3.5% en comparación con su testigo. El cuerpo es definido como el peso o sensación que produce un café en la boca (Duicela *et al.* 2017). Los principales compuestos químicos de una taza de café que contribuyen al atributo de cuerpo, son los polisacáridos, lípidos, ácidos clorogénicos y alifáticos (Puerta 2011). El balance del café se refiere a la estabilidad y regularidad que presenten todos los atributos en combinación. El balance de las tazas fue mejor cuando se inyectó CO₂ (Cuadro 4). Se observa que el tratamiento con mayor puntaje final (60 h asistida + CO₂), mejoró su balance en un 5% producto de la inyección de este gas.

El tiempo de duración de un proceso fermentativo, dependerá de factores como la temperatura del ambiente, la microbiota local y la cantidad de sólidos totales que posea el café (Puerta 2012). Cada beneficio de café, debería estudiar sus condiciones y desarrollar su protocolo de fermentación de acorde a las mismas. Estadísticamente, se observó que el tiempo de fermentación produce cambios en el atributo de aroma ($P \leq 0.05$). El tiempo de fermentación, es de las variables más importantes a controlar durante este proceso, ya que si se extiende más de lo necesario se desarrollarán sabores y aromas negativos (Schwan y Fleet 2014). Los compuestos químicos que se forman cuando sucede la sobrefermentación, son los ésteres, dicetonas, dimetilsulfido y 2-isobutylmetoxipirazina (Puerta 2011). Estos compuestos producen sabores desagradables y nauseabundos. En general, los tratamientos con un tiempo de fermentación de 60 horas (Cuadro 4), fueron mejor calificados que los de 40 horas. Esto reafirma que efectivamente el protocolo desarrollado en este beneficio (60 horas), fue el correcto.

Cuadro 4. Resultados de las cataciones, realizadas a cada uno de los tratamientos.

¹ Fermentación	² Aroma	Sabor	Acidez	Cuerpo	Balance	En frío	Puntaje final
48 h asistida + CO ₂	8.94 ± 0.2 ^b	8.75 ± 0.3 ^{bc}	8.81 ± 0.1 ^b	8.72 ± 0.2 ^{bc}	8.69 ± 0.3 ^{bc}	8.67 ± 0.2 ^{ab}	90.56 ± 0.6 ^b
48 h asistida	8.97 ± 0.2 ^b	8.83 ± 0.2 ^{ab}	8.83 ± 0.1 ^b	8.78 ± 0.2 ^b	8.72 ± 0.2 ^b	8.64 ± 0.4 ^{ab}	90.69 ± 0.7 ^b
48 h normal + CO ₂	8.86 ± 0.2 ^{bc}	8.69 ± 0.2 ^{bc}	8.58 ± 0.2 ^d	8.67 ± 0.3 ^{bc}	8.56 ± 0.3 ^{cd}	8.58 ± 0.3 ^b	89.64 ± 0.7 ^{cd}
48 h normal	8.75 ± 0.2 ^c	8.61 ± 0.1 ^c	8.64 ± 0.2 ^{cd}	8.61 ± 0.1 ^c	8.56 ± 0.2 ^{cd}	8.53 ± 0.3 ^b	89.56 ± 0.8 ^d
60 h asistida + CO ₂	9.19 ± 0.2 ^a	8.97 ± 0.3 ^a	8.97 ± 0.2 ^a	8.97 ± 0.2 ^a	8.92 ± 0.3 ^a	8.78 ± 0.2 ^a	92.22 ± 0.6 ^a
60 h asistida	9.00 ± 0.2 ^b	8.72 ± 0.2 ^{bc}	8.81 ± 0.1 ^b	8.69 ± 0.2 ^{bc}	8.56 ± 0.3 ^{cd}	8.64 ± 0.2 ^{ab}	90.44 ± 1.0 ^{bc}
60 h normal + CO ₂	8.78 ± 0.1 ^c	8.64 ± 0.2 ^c	8.72 ± 0.3 ^{bc}	8.67 ± 0.3 ^{bc}	8.58 ± 0.3 ^{bcd}	8.62 ± 0.3 ^{ab}	89.47 ± 1.0 ^d
60 h normal	8.78 ± 0.2 ^c	8.69 ± 0.2 ^{bc}	8.67 ± 0.1 ^{cd}	8.67 ± 0.2 ^{bc}	8.47 ± 0.3 ^d	8.50 ± 0.3 ^b	89.42 ± 1.2 ^d
³ CV (%)	1.90	1.82	1.67	1.62	2.04	2.11	0.91

¹Descripción del proceso fermentativo de cada tratamiento, en donde se especifica el tiempo que duró el proceso (48 y 60 horas), si se asistió o no con inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, y si se inyectó o no CO₂. ²Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones. ^{a-e}Valores seguidos de una letra diferente en cada columna, representan diferencia estadística entre tratamientos ($P \leq 0.05$). ³CV (%)= coeficiente de variación expresado en porcentaje. La catación fue evaluada de acuerdo a la escala establecida por la Speciality Coffee Association of America (SCAA).

Análisis químicos.

Los atributos de una taza de café son el producto de una serie de reacciones químicas entre los distintos componentes y que ocurren durante el proceso de tostado (Franca *et al.* 2005). Producto del tostado, el grano sufre una pérdida considerable de agua, llegando a contenidos hasta del 3.16% (Cuadro 5). Las altas temperaturas durante este proceso, pueden alcanzar hasta los 177 °C que es cuando el grano empieza a explotar. Estas temperaturas producen degradación en lípidos, carbohidratos y desnaturalización de proteínas (Scholes 2014). Paralelamente, se produce reacción de Maillard y caramelización de azúcares. La reacción de Maillard sucede por la interacción de azúcares con un grupo amino y altas temperaturas; en el caso de la caramelización, los azúcares son deshidratados por altas temperaturas (Franca *et al.* 2005; Puerta 2011; Scholes 2014). La caramelización de azúcares produce el color del grano tostado, por lo tanto, dependerá del tiempo y la temperatura de tostado. Como producto del tostado también se forman ácidos y compuestos volátiles (furanos, pirazinas, cetonas, pirroles, alcoholes, ésteres). Estos compuestos son fundamentales en el desarrollo de aromas y sabores (Puerta 2011). En general, el tostado cambia los contenidos de los compuestos químicos y la concentración de éstos en los granos.

Los resultados de los análisis químicos (Cuadro 5), indican que hay mínimas diferencias entre tratamientos. La humedad es un parámetro que se ve relacionado principalmente al proceso de tostado del grano. Las pequeñas diferencias en la combinación de tiempo y temperatura dan como resultado a las pequeñas variaciones que hay en el porcentaje de humedad entre cada muestra. En el contenido de cenizas tampoco hubo ningún tratamiento con diferencias significativas ($P > 0.05$). Ninguno de los factores estudiados en este proyecto causó un efecto sobre el contenido de cenizas. El contenido de cenizas es mayor en el café Robusta que en Arábica, y mayor en granos obtenidos del beneficio seco (secado de los frutos o cerezas) que del beneficio húmedo (Puerta 2011). El promedio global del contenido de cenizas en las muestras fue en promedio de 3.81%, lo que coincide con diversos autores (Franca *et al.* 2005; Puerta 2011; Oestreich 2013). Sobre las proteínas, tampoco hubo influencia por parte de las variables controladas. Las proteínas son compuestos nitrogenados que participan en distintas reacciones durante el tostado. Los aminoácidos reaccionan y generan compuestos del aroma del café tostado, así, en la reacción de Strecker se transforman en aldehídos, CO₂ y amoníaco. En la reacción de Maillard los aminoácidos reaccionan con los azúcares reductores y producen las melanoidinas y diversos compuestos volátiles nitrogenados y azufrados (Illy y Viani 2005; Puerta 2011). Antes de ser tostado, el café posee entre 14 y 17% de proteína, con el tostado estas se degradan levemente hasta valores entre 13 y 15% (Franca *et al.* 2005), lo que coincide con los resultados obtenidos (Cuadro 5), ya que en promedio el contenido de proteínas fue de 15.13%. En el contenido de grasas si se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Las variables que influyeron sobre el contenido de grasas, fueron el tipo de fermentación y la interacción de los tres factores evaluados (tipo de fermentación \times tiempo \times CO₂).

Cuando la fermentación no fue asistida, hubo un 5% más de grasa que cuando se asistió con inóculo (Cuadro 5). La adición de una población extra de levaduras podría explicar esta reducción, ya que estos microorganismos pudieron haber metabolizado estas grasas.

Las levaduras necesitan lípidos para su funcionamiento ya que son importantes para la creación de estructuras como las lipoproteínas de su membrana celular (Piškur 2014). Las principales variaciones en la composición química del mucílago de café durante la fermentación son la disminución de la concentración de los azúcares, las producciones de ácidos y etanol y la degradación de los lípidos (Puerto y Ríos 2011). Los lípidos reaccionan de diferentes maneras, por ejemplo, los ácidos grasos reaccionan con alcoholes para formar ésteres y agua. Además, los lípidos se oxidan en condiciones de oxígeno, luz, altas temperaturas y presencia de metales catalizadores, así, se rompen los enlaces insaturados, se forman radicales libres y se producen aldehídos, cetonas y alcoholes que, en general, tienen olores desagradables (Puerta 2011).

Al analizar los resultados de fibra (Cuadro 5), se observa que todas las variables (tipo de fermentación, inyección de CO₂ y tiempo) influyeron significativamente ($P \leq 0.05$) sobre la cantidad de esta macromolécula. Los tratamientos que fueron asistidos con inóculo de levadura, presentaron una mayor cantidad de fibra en el grano tostado. Cuando hubo inyección de CO₂, el contenido de fibra fue menor al igual que cuando se fermentó por 60 horas (Cuadro 5). No existen evidencias científicas sobre efectos directos producidos por el contenido de fibra sobre los atributos sensoriales del café, ya que ésta es eliminada de la bebida por filtros o se sedimenta en las tazas. En promedio, los cafés presentaron un contenido de fibra de 16.6 %, concordando con Puerta (2011), quien reportó contenidos de fibra en cafés arábicas que iban desde 15 a 22%.

El contenido de carbohidratos se reportó por diferencia. Dentro del grupo de carbohidratos se encuentran polisacáridos disacáridos y azúcares reductores. Los carbohidratos participan en distintas reacciones importantes en las características sensoriales, y por lo general éstas suceden durante el proceso de tostado (Scholes 2014). Entre 15 y 20% de los polisacáridos contenidos en los granos de café almendra se degradan en el tostado; la sacarosa se descompone completamente por el proceso de caramelización (Puerta 2011). La mayoría de los azúcares reductores, reaccionan con grupos nitrogenados (proteínas) en lo que se conoce como reacción de Maillard (Stadler *et al.* 2002). La reacción de oscurecimiento, también llamada caramelización o pirólisis, ocurre cuando los azúcares se calientan por encima de su punto de fusión. En este proceso también se forman melanoidinas que brindan el color del grano. Además, se producen los pirroles, tiofenos, oxazoles, tiazoles y pirazinas compuestos responsables de los aromas del café tostado (Scholes 2014; González 2016).

La cafeína fue afectada de manera significativa ($P \leq 0.05$) por el tipo de fermentación (asistida o normal), la inyección de CO₂ y la interacción de las tres variables estudiadas (tipo de fermentación \times inyección de CO₂ \times tiempo). Cuando los tratamientos fueron asistidos con inóculo de levadura, presentaron 3% más de cafeína que cuando la fermentación fue normal (Cuadro 6). Existen evidencias que comprueban que las bacterias ácido lácticas y algunos hongos (*Aspergillus* y *Penicillium*), tienen la capacidad de degradar la cafeína (Roussos y Gaime 1996). Esto podría explicar la disminución de la cafeína, ya que, al no agregar una población extra de levaduras, había mayor población de hongos y BAL que posiblemente degradaron la cafeína.

Existe cierta polémica sobre la degradación de la cafeína durante el tostado. Sin embargo, la cafeína es un compuesto alcaloide que es estable a temperaturas de tostado (Scholes 2014). La cafeína aporta amargor a la taza y estudios previos muestran claramente que los cafés de variedad arábica poseen menos cafeína que los de variedad robusta (Puerta 2011; Oestreich 2013; Vega *et al.* 2018). Se separó de manera exitosa la cafeína mediante HPLC (Figura 1). En promedio, las muestras de cafés en este estudio estuvieron entre 7.37 y 9.83 mg/mL que concuerda con Vega *et al.* (2018), quienes encontraron valores similares en café Geisha de altura. Al tener una baja concentración de cafeína, hay una mayor concentración de ácidos orgánicos, azúcares, lípidos, entre otros compuestos, que serán responsables del aroma, sabor y acidez de la taza.

Se logró separar mediante HPLC (Figura 2), los ácidos 5-cafeoilquínico (5-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA) y ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA). Los ácidos cafeoilquínicos, en cafés arábica constituyen el 95% de los ácidos clorogénicos totales. Los 5-CQA, 4-CQA y 3-CQA, son los ácidos clorogénicos de mayor concentración en el café (Puerta y Marín 2008; Vega *et al.* 2018). Cuando la fermentación duró 48 horas, hubo mayor contenido de ácidos clorogénicos totales. El tiempo y la interacción de los tres factores estudiados (tipo de fermentación \times inyección de CO₂ \times tiempo), influyeron de manera significativa ($P \leq 0.05$) sobre el contenido final de ácidos clorogénicos. En la taza, los ácidos clorogénicos producen amargor y astringencia, por lo que afectan el atributo de cuerpo (Puerta 2011). El tratamiento mejor calificado sensorialmente en el atributo de cuerpo (60 h asistida + CO₂), presentó menor contenido total de ácidos clorogénicos. Los ácidos clorogénicos cumplen la función de proteger la planta contra microorganismos, luz ultravioleta, daño por herbívoros e insectos. El contenido de ácidos clorogénicos se ve influenciado por factores como la variedad de café y la altura a la cual es cultivado el café (Puerta y Marín 2008). Durante el tostado, parte de los ácidos clorogénicos se degradan en ácidos quínicos y caféicos, que son responsables de los sabores más audaces del buen café (Scholes 2014). Después del beneficiado húmedo, los granos de café arábica tienen 3.64% de 5-CQA, 0.44% de 4-CQ y 0.34% de 3-CQA (Puerta y Marín 2008). En general el contenido de 5-CQA, estuvo entre 12.28 y 13.76 mg/g, lo que coincide con Vega *et al.* (2018), quien encontró valores similares en cafés de la misma región. El tostado hace que se disminuya específicamente el 5-CQA y que aumenten los isómeros 3-CQA y 4-CQA (Puerta y Marín 2008). El contenido del isómero 4-CQA estuvo entre 5.75 y 6.43 mg/g, mientras que el contenido de 3-CQA osciló entre 5.5 y 6.09 mg/g concordando con lo mencionado anteriormente ya que los isómeros 4-CQA y 3-CQA aumentaron y el 5-CQA disminuyó después del tostado. Los resultados obtenidos (Cuadro 6), fueron similares a los encontrados por Puerta y Marín (2008); Vega *et al.* (2018), quienes han estudiado a fondo la composición química de cafés tipo arábica.

Cuadro 5. Comparación de análisis proximal, realizado a cada tratamiento en café tostado.

¹ Fermentación	² Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	Carbohidratos (%)
48 h asistida + CO ₂	3.81 ± 0.04 ^a	3.80 ± 0.12 ^a	14.81 ± 0.05 ^a	9.93 ± 0.04 ^b	17.18 ± 0.41 ^b	50.47 ± 0.46 ^b
48 h asistida	3.40 ± 0.23 ^b	3.81 ± 0.21 ^a	15.30 ± 0.16 ^a	9.81 ± 0.09 ^b	17.33 ± 0.35 ^{ab}	50.43 ± 0.42 ^b
48 h normal + CO ₂	3.22 ± 0.23 ^b	3.79 ± 0.33 ^a	15.18 ± 0.37 ^a	9.89 ± 0.03 ^b	12.84 ± 0.47 ^d	55.11 ± 0.69 ^a
48 h normal	3.24 ± 0.10 ^b	3.95 ± 0.19 ^a	15.26 ± 0.32 ^a	11.1 ± 1.05 ^a	17.44 ± 0.40 ^{ab}	48.99 ± 0.89 ^c
60 h asistida + CO ₂	3.25 ± 0.04 ^b	3.66 ± 0.05 ^a	15.06 ± 0.56 ^a	10.4 ± 0.08 ^b	16.92 ± 0.56 ^b	50.61 ± 0.76 ^b
60 h asistida	3.39 ± 0.06 ^b	3.87 ± 0.07 ^a	15.21 ± 0.20 ^a	9.33 ± 0.19 ^b	18.04 ± 0.47 ^a	50.32 ± 0.73 ^b
60 h normal + CO ₂	3.16 ± 0.08 ^b	3.77 ± 0.18 ^a	15.29 ± 0.09 ^a	9.78 ± 0.23 ^b	16.87 ± 0.68 ^b	51.14 ± 0.79 ^b
60 h normal	3.22 ± 0.01 ^b	3.89 ± 0.01 ^a	14.95 ± 0.05 ^a	10.5 ± 0.51 ^{ab}	16.07 ± 0.14 ^c	51.07 ± 0.38 ^b
³ CV (%)	4.12	1.86	4.24	4.59	2.77	1.30

¹Descripción del proceso fermentativo de cada tratamiento, en donde se especifica el tiempo que duró el proceso (48 y 60 horas), si se asistió o no con inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, y si se inyectó o no CO₂. ²Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones. ^{a-e}Valores seguidos de una letra diferente en cada columna, representan diferencia estadística entre tratamientos ($P \leq 0.05$). ³CV (%)= coeficiente de variación expresado en porcentaje.

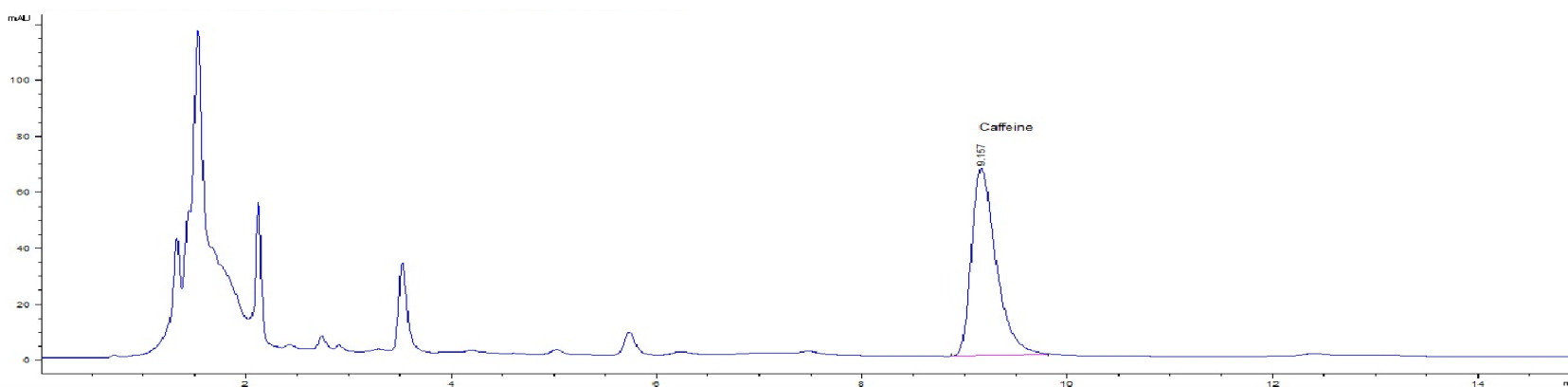


Figura 1. Cromatograma obtenido de la cuantificación por HPLC de cafeína en café Geisha, tostado y molido. Resultados obtenidos a una longitud de onda de 275 nm.

Fuente: (Vega *et al.* 2018)

19

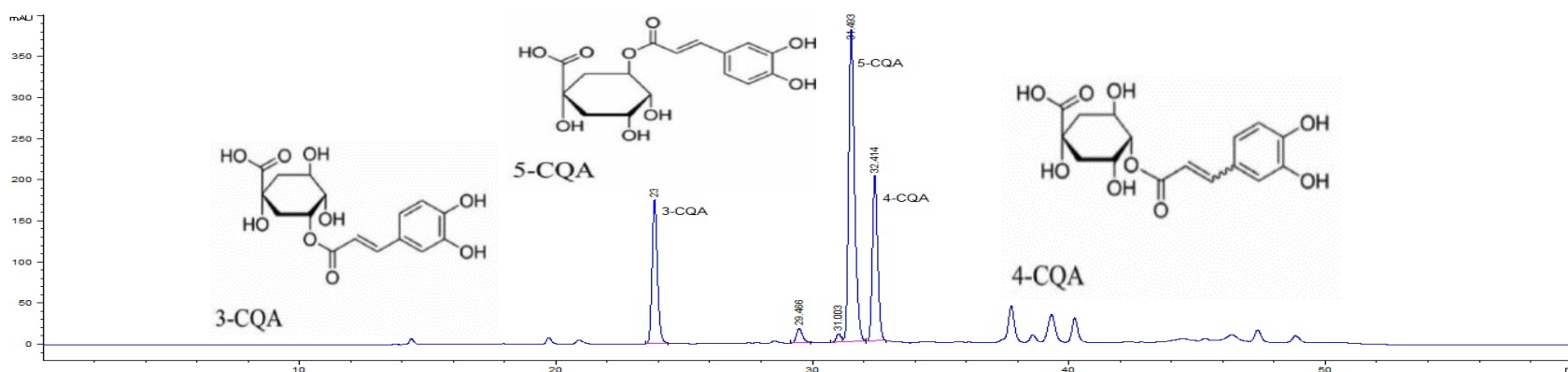


Figura 2. Cromatograma obtenido de la cuantificación por HPLC, de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA) y ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), en café Geisha, tostado. Resultados obtenidos a una longitud de onda de 360 nm.

Fuente: (Vega *et al.* 2018)

Cuadro 6. Resultados de análisis de cafeína y ácidos clorogénicos (5-CQA, 4-CQA y 3-CQA), cuantificados por HPLC, en muestras de café Geisha tostado y molido.

¹ Fermentación	² 5-CQA	4-CQA	3-CQA	CQA totales	Cafeína
48 h asistida + CO ₂	13.76 ± 0.01 ^a	6.42 ± 0.03 ^a	6.07 ± 0.01 ^a	26.25 ± 0.05 ^a	8.53 ± 0.15 ^d
48 h asistida	13.54 ± 0.22 ^a	6.41 ± 0.11 ^a	6.09 ± 0.02 ^a	26.04 ± 0.32 ^a	9.35 ± 0.28 ^{bc}
48 h normal + CO ₂	12.55 ± 0.50 ^b	6.21 ± 0.16 ^{ab}	5.71 ± 0.10 ^b	24.48 ± 0.75 ^{bc}	9.83 ± 0.22 ^a
48 h normal	12.69 ± 0.31 ^b	6.01 ± 0.11 ^{bc}	5.71 ± 0.11 ^b	24.40 ± 0.52 ^{bc}	8.21 ± 0.20 ^d
60 h asistida + CO ₂	12.28 ± 0.76 ^b	5.75 ± 0.36 ^c	5.50 ± 0.26 ^c	23.53 ± 1.38 ^c	9.64 ± 0.20 ^{ab}
60 h asistida	13.45 ± 0.31 ^a	6.36 ± 0.07 ^a	5.91 ± 0.07 ^a	25.73 ± 0.41 ^a	8.94 ± 0.31 ^c
60 h normal + CO ₂	13.21 ± 0.09 ^a	6.27 ± 0.15 ^{ab}	5.99 ± 0.04 ^a	25.47 ± 0.28 ^{ab}	9.81 ± 0.21 ^a
60 h normal	13.39 ± 0.17 ^a	6.43 ± 0.04 ^a	5.97 ± 0.01 ^a	25.78 ± 0.14 ^a	7.37 ± 0.35 ^e
³ CV (%)	2.82	2.59	1.89	2.48	2.93

¹Descripción del proceso fermentativo de cada tratamiento, en donde se especifica el tiempo que duró el proceso (48 y 60 horas), si se asistió o no con inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, y si se inyectó o no CO₂. ²Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones. ^{a-e}Valores seguidos de una letra diferente en cada columna, representan diferencia estadística entre tratamientos ($P \leq 0.05$). ³CV (%)= coeficiente de variación expresado en porcentaje

4. CONCLUSIONES

- Las levaduras fueron los microorganismos con mayor concentración al final de la fermentación anaeróbica, seguido de las bacterias ácido lácticas y hongos.
- La asistencia con inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* influyó de manera positiva sobre los atributos del café.
- La inyección de CO₂ mejoró los atributos de cuerpo y balance, influyendo sobre el puntaje final.
- Químicamente las variables estudiadas (tipo de fermentación, inyección con CO₂ y el tiempo de fermentación) hicieron efecto sobre el contenido de grasas, ácidos clorogénicos y cafeína.

5. RECOMENDACIONES

- Desarrollar un método para asegurar que la fermentación sea totalmente en ausencia de oxígeno.
- Medir las concentraciones de CO₂ que se inyectan y evaluar el proceso con distintas concentraciones.
- Evaluar el proceso con distintas variedades para observar si éste aplica para cualquier café.
- Cuantificar los microorganismos presentes en el mucilago antes de iniciar la fermentación para obtener una visión más amplia de su comportamiento durante la fermentación.
- Hacer una cuantificación mediante cromatografía de gases de la fracción volátil del café.

6. LITERATURA CITADA

- Agate A, Bhat J. 1966. Role of pectinolytic Yeasts in the degradation of mucilage layer of *coffea robusta* cherries. Applied microbiology. 14; [consultado el 3 de abr. de 2019]. <https://aem.asm.org/content/14/2/256.short>
- Anocíbar M. 1992. Estudio sobre maceración carbónica. Ensayos con la levadura S, C. 718. (11-12). https://www.researchgate.net/publication/322930438_A_ANOCIBAR_BELOQUI_1992_Estudio_sobre_maceracion_carbonica_Ensayos_con_la_levadura_S_Cerevisiae_718Vitivinicultura_n_11_-_12_Novembre_-_Dicembre
- Avallone S, Guyot B, Brillouet JM, Olguin E, Guiraud JP. 2001. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. Curr Microbiol. 42(4):252–256. Eng. doi:10.1007/s002840110213.
- Boren F, Coradi P, Saath R, Oiveira J. 2008. Qualidade do café natural e despolpado após secagem em terreiro e com altas temperaturas. Ciênc. Agrotec; [consultado el 8 de may. de 2019]. 32:1609–1615. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000500038>.
- Camacho A. 2011. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos: Manual de técnicas básicas para la microbiología de alimentos. 2ª ed. México: Universidad Autónoma de México. 13 p. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras_6530.pdf.
- Cardona J. 2010. Cafés Especiales: Situación Actual y Aplicación del Programa de Calidad de Café Nespresso AAA, En el Municipio de Jardín Antioquia. [Grado en Gerencia Agropecuaria]. Antioquia: Corporación Universitaria Lasallista. 51 p; [consultado 7 de feb. de 2019]. https://www.google.com/search?rlz=1C1CHBD_esHN781HN781&ei=yNdIXNz0Be3R5gKNhb6YAg&q=cafes+especiales+cardona+2010&oq=cafes+especiales+cardona+2010&gs_l=psyab.3...26253.28082.28836...0.0.0.316.1315.0j1j3j1.....0...1.gwswiz.....33i21.whXQSVp9b24.
- Concha J, Agudelo C, Toro R. 2010. Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial; [consultado el 16 de jun. de 2019]. 8(2). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117666>.
- Cruz J, Pivaral R. 2018. Evaluación del efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la caracterización sensorial del café en dos sistemas de fermentación [Calificación de Pregrado]. Honduras: EAP Zamorano, Anacafé. 35 p; [consultado el 17 de ene. de 2019]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6232/1/AGI-2018-T019.pdf>.

- Duicela L, Del Rocío S, Farfán D. 2017. Calidad Organoléptica de Cafés Arábigos en Relación a las Variedades y Altitudes de las Zonas de Cultivo, Ecuador. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*; [consultado el 31 de jul. de 2019]. 18(1):67–77. <http://www.redalyc.org/pdf/813/81351597010.pdf>.
- FAO, Organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura. 2004. *Perspectivas a Plazo Medio de los Productos Básicos Agrícolas: Proyecciones al año 2010*. Roma: Food & Agriculture Organization. ISBN: 92-5-305077-2; [consultado el 6 de abr. de 2019]. <http://www.fao.org/3/y5143s/y5143s00.htm>.
- Fórum del Café. 2018. Las tendencias de consumo de café, al descubierto; [consultado el 6 de jun. de 2019]. <http://www.forumdelcafe.com/noticias/las-tendencias-consumo-cafe-descubierto>.
- Franca A, Mendonça J, Oliveira S. 2005. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT - Food Science and Technology*. 38(7):709–715. [consultado el 10 de jun. de 2019]. doi:10.1016/j.lwt.2004.08.014.
- Giovannucci D. 2001. Encuesta sobre café sustentable en el mercado de especialidad de América del Norte. Philadelphia, PA. 32 p; [consultado el 8 de mar. de 2019] <http://www3.cec.org/islandora/es/item/1700-sustainable-coffee-survey-north-american-specialty-coffee-industry-es.pdf>
- González O. 2016. Caramelización. *Química de alimentos*; [consultado el 30 de jul. de 2019]. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Seminario-Caramelizacion_27353.pdf.
- Haile M, Kang W. 2019. The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. *Journal of Food Quality*. 2019(12):1–6; [consultado el 24 de jun. de 2019]. doi:10.1155/2019/4836709.
- Huertas R. 2010. Revisión. Bacterias ácido Lácticas: Papel Funcional en Los Alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*; [consultado el 16 de jun. de 2019]. 8(1):93–105. <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=5&sid=1b6b0b93-befa-4e8a-a323-fe954c3ec734%40sessionmgr103>.
- Illy A, Viani R. 2005. *Espresso coffee: The science of quality*. 2nd ed. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic. ISBN: 0-12-370371-9.
- Jouhten P, Penttilä M. 2014. Anaerobic carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. En: Piškur J, Compagno C, editores. *Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism*. Vol. 183. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 57–82. [consultado el 6 de abr. de 2019]. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384101.2018.1442622>
- Mundo Social. 2018. Panamá, café para el mundo. [consultado el 4 de feb de 2019]. <https://www.mundosocial.net/panama-cafe-para-el-mundo/>

- Newton T. 2017. How does fermentation affect coffee flavour development? Perfect daily grind; [consultado el 2 de feb. de 2019]. <https://www.perfectdailygrind.com/2017/07/fermentation-affect-coffee-flavour-development/>.
- Oestreich J. 2013. Chemistry of coffee. En: reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering. [Hamburgo, GE]: Elsevier; [consultado 18 de may. de 2019]. https://www.researchgate.net/profile/Sigrid_OestreichJanzen/publication/303688512_Oej-2013Coffee_chemistryUpdated/links/574da33408ae82d2c6bdf211/Oej-2013-Coffee-chemistry-Updated.pdf
- Piškur J. 2014. Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism. Compagno C, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1. [consultado el 4 de jun. 2019]online resource (VIII, 326. ISBN: 978-3-642-55013-3.
- Puerta G. 1996. Evaluación de la Calidad del Café Colombiano procesado por la vía seca. Colombia: Cenicafé. Avances Técnicos. 47(2):85–90. [consultado el 22 de feb. de 2019]. <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/63/1/arc047%2802%2985-90.pdf>.
- Puerta G. 1999. Influencia del proceso de beneficio en la calidad del café. Colombia: Cenicafé. 11 p. [consultado el 25 de may. de 2019]. <http://www.kimera.com/RECURSOS/BENEFICIO%20MANEJO%20AGUA/beneficio-influencia-en-la-calidad-.pdf>.
- Puerta G. 2010. Fundamentos del Proceso de Fermentación en el Beneficio de Café. Colombia. Cenicafé. Avances Técnicos. [consultado el 14 de jun. de 2019]. <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/345/1/avt0402.pdf>
- Puerta G. 2011. Composición Química de una Taza de Café. Colombia: Cenicafé. Avances Técnicos. 12 p. [consultado el 27 de jun. de 2019]. <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt04142.pdf>.
- Puerta G. 2012. Factores, procesos y controles en la fermentación del café. Colombia: Cenicafé. Avances Técnicos. 12 p. [consultado el 23 de may. de 2019] https://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/consultaPDF/YXZ0MDQyMi5wZGY=.
- Puerta G. 2013. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. Colombia: Cenicafé. Avances Técnicos; [consultado 15 de mar. de 2019]. <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/345/1/avt04023.pdf>.
- Puerta G. 2015. Fermentación controlada del café: Tecnología para agregar valor a la calidad. Colombia: Cenicafé. Avances Técnicos. 12 p. [consultado 15 de mar. de 2019]. <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/558/1/avt0454.pdf>.
- Puerta G, Marín J, Osorio G. 2015. Microbiología de la fermentación del mucílago de café según su madurez y selección. Colombia: Cenicafé. Avances Técnicos; [consultado el 16 de jun. de 2019]. [http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/536/1/arc063\(02\)58-78.pdf](http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/536/1/arc063(02)58-78.pdf).

- Puerta G, Marín C. 2008. Contenido de Ácidos Clorogénicos en Granos de *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, Según el Desarrollo del Fruto. *Cenicafé*. 59(1):7–28. [consultado el 23 de abr. de 2019]. <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc059%2801%29007-028.pdf>
- Puerto G, Ríos A. 2011. Composición Química del Mucílago de Café Según el Tiempo de Fermentación y Refrigeración. *Cenicafé*; [consultado el 24 de jul. de 2019]. 62:23–40. <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/478>.
- Rosetti L. 2016. Bacterias Lácteas: Identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) por biología molecular. Argentina: INTI. 25 p.[consultado el 30 de may. de 2019] <https://inti.gob.ar/ue/pdf/publicaciones/cuadernillo37.pdf>.
- Roussos S, Gaime I. 1996. Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentaciones en medios sólidos. 341–348. [consultado el 7 de jun. de 2019].https://www.researchgate.net/profile/Isabelle_Gaime/publication/304825959_Fisiologia_y_bioquimica_de_microorganismes_utilizados_en_procesos_de_fermentaciones_en_medios_solidos/links/577bef7208aec3b743366c21/Fisiologia-y-bioquimica-de-microorganismes-utilizados-en-procesos-de-fermentaciones-en-medios-solidos.pdf
- SCAA, Specially coffee association of America. 2019. *Protocolos*. Seattle, USA. [consultado el 3 de mar. de 2019] <https://sca.coffee/research/protocols-best-practices?page=resources&d=coffee-protocols>.
- Scholes C. 2014. The perfect roast reaction. *Chemistry in Australia*; [consultado el 21 de abr. de 2019]. (13). <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=927521859430884;res=IELENG;type=pdf>.
- Schwan R, Fleet G, editores. 2014. *Micobial activity during coffee fermentation*. New York NY: CRC Press. [consultado el 9 de jul. de 2019] ISBN: 9781439847916.
- Stadler, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy P, Robert M, Riediker S. 2002. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*. 419 (6906):449–450. [consultado el 25 de jul. de 2019] <https://doi.org/10.1038/419449a>. doi:10.1038/419449a.
- Suarez M, Gonzalez O, Barel M, Guyot B, Schorr S, Guiraud J. 2004. Study of ochratoxin A producing strains in coffee processing. *Int J Food Sci Tech*. 39(5):501–507. [consultado el 9 de jun. de 2019]. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.00810.x.
- Tesniere C, Flanzky C. 2011. Carbonic maceration wines: characteristics and winemaking process. *Adv Food Nutr Res*. 63:1–15. Eng. [consultado el 11 de mar. de 2019] doi:10.1016/B978-0-12-384927-4.00001-4.
- Vega A, León J, Reyes S. 2018. Componentes bioactivos de diferentes marcas de café comerciales de Panamá. Relación entre ácidos clorogénicos y cafeína. *Inf. tecnol*. 29(4):43–54. [consultado el 11 de abr. de 2019]. doi:10.4067/S0718-07642018000400043.
- Velmourougane K. 2013. Impact of Natural Fermentation on Physicochemical, Microbiological and Cup Quality Characteristics of Arabica and Robusta Coffee.

- Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci. 83(2):233–239. [consultado el 19 de mar. de 2019]. doi:10.1007/s40011-012-0130-1.
- WBC, World barista championship. 2019. Past rankings. Seattle, USA: World Barista Championship. [consultado el 11 de feb. de 2019] <https://worldbaristachampionship.org/past-rankings/>.
- Weather Spark. Tiempo promedio en febrero en Palmira, Panamá; [consultado el 5 de feb. de 2019]. <https://es.weatherspark.com/m/16686/2/Tiempo-promedio-en-febrero-en-Palmira-Panam%C3%A1>.
- Zuluaga J. 1988. Los factores que determinan la calidad del café verde. Colombia: Cenicafé. [consultado el 19 de abr. de 2019] <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/713/27/27%20Factores%20calidad%20caf%C3%A9%20verde.pdf>.

7. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para Hongos

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	0.18	0.67
CO ₂	1	3.12	0.10
Tiempo	1	0.01	0.94
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	6.52	0.003

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

Anexo 2. Análisis de varianza para Levaduras.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	7.77	0.01
CO ₂	1	2.23	0.15
Tiempo	1	40.46	< 0.05
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	2.92	0.054

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

Anexo 3. Análisis de varianza para BAL.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	4.00	0.063
CO ₂	1	35.56	< 0.05
Tiempo	1	7.51	0.0145
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	1.20	0.35

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

Anexo 4. Análisis de varianza de pH.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	177.06	<.0001
CO ₂	1	0.38	0.544
Tiempo	1	9.96	0.007
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	1.15	0.367

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

Anexo 5. Análisis de varianza de aroma.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	34.96	<.0001
CO ₂	1	3.02	0.087
Tiempo	1	5.93	0.017
Catador	2	16.91	<.0001
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	1.33	0.269

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

Anexo 6. Análisis de varianza de sabor.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	18.22	<.0001
CO ₂	1	1.69	0.198
Tiempo	1	2.79	0.099
Catador	2	25.21	<.0001
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	2.72	0.037

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

Anexo 7. Análisis de varianza de acidez.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	34.08	<.0001
CO ₂	1	1.01	0.318
Tiempo	1	0.04	0.841
Catador	2	17.30	<.0001
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	2.80	0.034

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

Anexo 8. Análisis de varianza de cuerpo.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	17.29	<.0001
CO ₂	1	4.32	0.042
Tiempo	1	2.77	0.101
Catador	2	35.06	<.0001
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	3.76	0.008

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

Anexo 9. Análisis de varianza de balance.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	18.79	<.0001
CO ₂	1	7.12	0.010
Tiempo	1	0.11	0.740
Catador	2	43.07	<.0001
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	3.48	0.013

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

Anexo 10. Análisis de varianza de calificación en frío.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	8.48	0.005
CO ₂	1	3.77	0.057
Tiempo	1	0.10	0.747
Catador	2	35.34	<.0001
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	0.44	0.776

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

Anexo 11. Análisis de variancia de calificación general.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	35.28	<.0001
CO ₂	1	1.56	0.216
Tiempo	1	6.25	0.015
Catador	2	46.19	<.0001
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	3.66	0.009

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

Anexo 12. Análisis de varianza de puntaje final.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	74.83	<.0001
CO ₂	1	6.95	0.011
Tiempo	1	2.71	0.104
Catador	2	15.44	<.0001
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	6.91	0.0001

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

Anexo 13. Análisis de varianza de cafeína.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	8.48	0.010
CO ₂	1	84.96	<.0001
Tiempo	1	0.09	0.768
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	35.27	<.0001

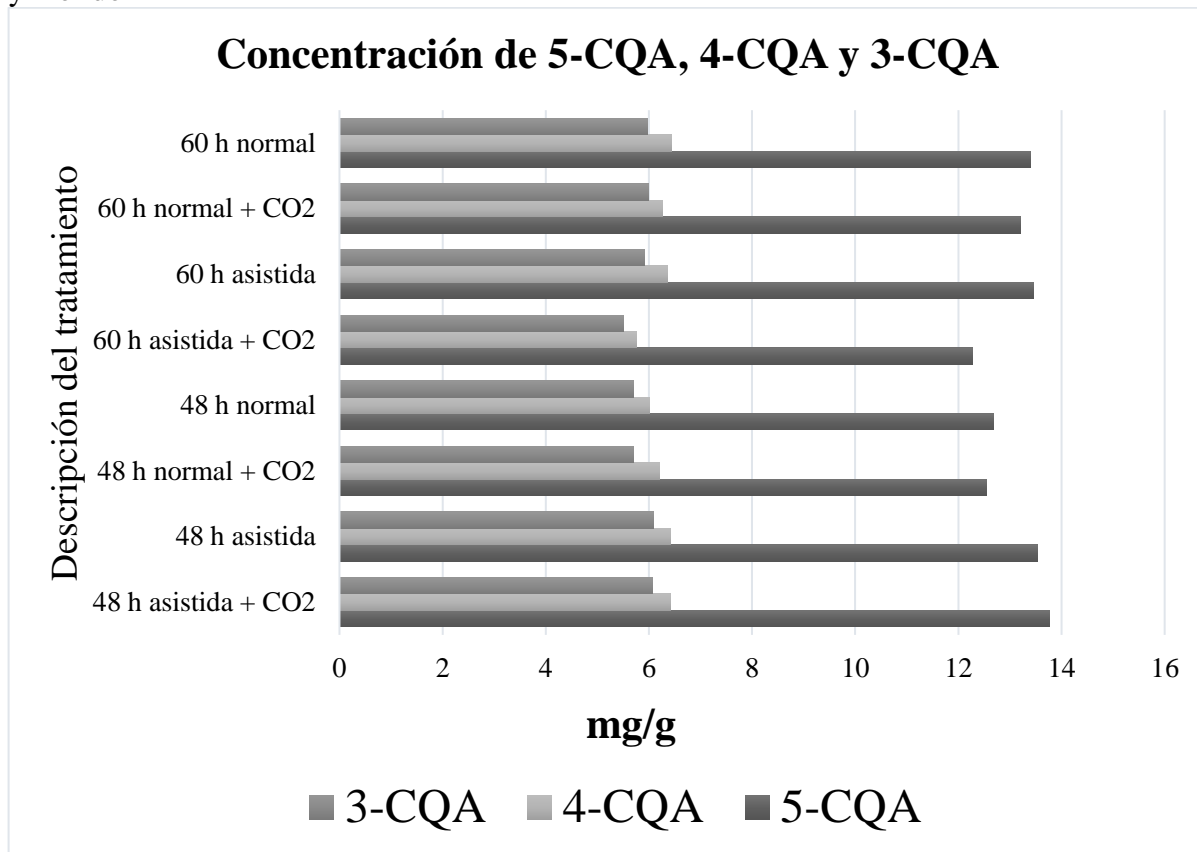
GL= grados de libertad; Valor F= variación fuera de los tratamientos. P= Probabilidad (P < 0.05).

Anexo 14. Análisis de varianza de ácidos clorogénicos.

Descripción	GL	Valor F	Pr > P
Levaduras	1	1.96	0.181
CO ₂	1	4.81	0.043
Tiempo	1	6.72	0.010
Levaduras × CO ₂ × Tiempo	4	9.02	0.0005

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

Anexo 15. Grafica de concentración de 5-CQA, 4-CQA y 3-CQA en café Geisha, tostado y molido



Anexo 16. Hoja de control de tueste de todos los tratamientos.

HACIENDA LA ESMERALDA, S.A.

FECHA: 19-3-19 FECHA DE CATACION:

NOMBRE DE LA MUESTRA	T°	CRACK		SALIDA	
		T	T	T	T
C.	280	9:30	340	9:30 10:30	350
C	290	9:43	310	10:43	330
C	280	9:24	340	10:24	350
A	280	9:34	340	10:34	350
A	290	9:40	320	10:40	330
A	280	9:19	350	10:19	360
B	290	9:33	320	10:33	330
B	28	9:24	350	10:24	360
B	290	9:47	320	10:47	330
D	280	9:33	350	10:33	360
D	290	9:45	325	10:45	335
D	280	9:27	350	10:27	360
E	290	9:57	320	10:57	330
E	280	9:17	350	10:17	360
E	290	9:46	330	10:46	340
F	280	9:31	350	10:31	360
F	290	9:43	320	10:43	330
F	280	9:33	350	10:33	360
G	290	9:42	320	10:42	330
G	270	9:25	350	10:25	360
G	290	9:48	320	10:48	330
H	280	9:28	350	10:28	360
H	290	10:00	325	11:00	335
H	280	9:20	350	10:20	360

Anexo 17. Formato utilizado para catar los cafés.

199 Mike 2014 3/20 Esmeralda via Jason

Sample #	Weight	Appearance	Smell	Taste	Balance	Sweetness	Overall	Final Score
1	100g	C	70
2	100g	H	71
3	100g	E	75
4	60g	SE	77
5	40g	A	79

Fuente SCAA 2019