

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

Identificación de levaduras nativas en café Geisha (*Coffea arabica*) y su efecto como cultivo iniciador en las características sensoriales y químicas de café lavado.

Estudiante

Gisselle Aimeth Castillo Avilés

Asesores

Jorge Cardona, Ph.D

Tina Hofmann, Dr. phil. nat

Honduras, octubre 2023

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHIETTI

Directora de Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Agradecimientos

A la empresa Hacienda La Esmeralda S.A. por financiar y permitirme utilizar muestras de su café Geisha para hacer posible esta investigación.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Chiriquí y su equipo por permitirme utilizar sus instalaciones. Además de a la Dr. Tina Hofmann por su apoyo y a mi asesor interno, Dr. Jorge Cardona.

Contenido

Agradecimientos	3
Índice de Cuadros	6
Índice de Figuras	7
Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
Materiales y Métodos	13
Fase I. Aislamiento e Identificación de Levaduras	13
Obtención de Muestras	13
pH	13
Grados Brix	14
Recuento e Identificación Morfológica de Levaduras	14
Fase II. Comportamiento de las Levaduras Nativas como Cultivo Iniciador y su Efecto Sensorial	14
Reproducción de Levaduras	14
Manejo del Café	15
Diseño Experimental	16
Recuento y Abundancia Relativa de las Levaduras	16
Grados Brix	17
pH	17
Humedad	17
Análisis Sensorial	17
Análisis Estadístico	18
Fase III. Efecto de las Levaduras Nativas en las Características Químicas del Café	18
Análisis Químicos	18

Flavonoides Totales.	19
Polifenoles Totales.	19
Actividad Antioxidante.....	20
Análisis Estadístico	20
Resultados y Discusión.....	21
Fase I. Aislamiento e Identificación de Levaduras	21
Recuento e Identificación Morfológica de Levaduras	21
Fase II. Comportamiento de las Levaduras Nativas como Cultivo Iniciador y su Efecto Sensorial.....	28
Recuento de Levaduras.....	28
Abundancia Relativa de las Levaduras.....	30
Grados Brix.....	32
pH.....	34
Humedad.....	35
Análisis Sensorial.....	35
Fase III. Efecto de las Levaduras Nativas en las Características Químicas del Café	37
Análisis Químicos	37
Flavonoides Totales.	37
Polifenoles Totales.	39
Actividad Antioxidante.....	40
Conclusiones	42
Recomendaciones.....	43
Referencias.....	44
Anexos.....	52

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Tratamientos evaluados en la investigación	16
Cuadro 2 Descripción de los aislados de levaduras nativas en el proceso del café natural Geisha	22
Cuadro 3 Resultados del recuento de levaduras antes, durante y después de la fermentación anaeróbica del café natural Geisha	24
Cuadro 4 Valores de grados Brix, pH del mosto durante la fermentación del café natural Geisha	26
Cuadro 5 Recuentos de levaduras (log UFC/g) del proceso de fermentación (DIA 0 y 3) y secado (DIA 5 y 8).....	29
Cuadro 6 Valores de grados Brix, pH y porcentaje de humedad durante la fermentación del café lavado Geisha.....	33
Cuadro 7 Resultados del análisis sensorial	36
Cuadro 8 Contenido de flavonoides y polifenoles totales de los mejores tratamientos, expresados en mg equivalentes a catequina/g de café tostado (mg EC/g café) y mg equivalentes a ácido gálico/g de café tostado (mg EAG/g café) respectivamente	38
Cuadro 9 Actividad antioxidante en mg equivalentes a ácido gálico/g de café tostado (mg EAG/g café) y porcentaje de inhibición.....	41

Índice de Figuras

Figura 1 Morfoespecies en su aspecto macroscópico	21
Figura 2 Cambios en la abundancia relativa de levaduras nativas, durante y después (muestreo a las 61 horas de secado) de la fermentación anaeróbica del café natural Geisha.....	24
Figura 3 Presencia de levaduras en porcentaje de aparición durante la fermentación (DIA 0 y 3) y secado (DIA 5 y 8)	31

Índice de Anexos

Anexo A Resultados microscópicos de las morfoespecies estudiadas	52
--	----

Resumen

La calidad especial del café Geisha ha llevado a investigar y mejorar sus atributos sensoriales a través de fermentación. El objetivo de este estudio fue identificar levaduras nativas en café Geisha, aislarlas y evaluar su potencial para mejorar calidad sensorial y fisicoquímica en procesos de fermentación asistida. El estudio se desarrolló en tres fases, identificando especies y géneros de levaduras (1); aislándolas y utilizándolas en procesos de fermentación en comparación con inóculo comercial (2); y evaluando la composición química y capacidad antioxidante del café resultante (3). Las levaduras se identificaron mediante observaciones macro y microscópicas, con mediciones de pH y grados Brix y se seleccionaron dos levaduras para compararlas con la levadura comercial. Además, se llevaron a cabo evaluaciones sensoriales y análisis químicos. Se identificó de 13 morfoespecies de levaduras en el café Geisha pertenecientes a seis géneros (*Pichia*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula*), siendo el género *Pichia* sp. el más abundante. Luego, se seleccionaron levaduras nativas del café Geisha (*Pichia* sp. y *Saccharomyces* sp.), para su cultivo e inoculación en café lavado Geisha en comparación con un inóculo control (cepa optimizada de *Saccharomyces cerevisiae*). El análisis sensorial reveló que todas las muestras eran consideradas de especialidad (>90 puntos) con las puntuaciones más altas para inóculo control e inóculo *Pichia* sp. Nativa. Algunos atributos sensoriales incluyeron notas cítricas y afrutadas. A pesar de no ser inoculado, el género *Candida* sp. se observó en el café lavado Geisha evaluado. Finalmente, no se demostraron diferencias en contenido de flavonoides, polifenoles totales y actividad antioxidante.

Palabras clave: Caracterización macroscópica, catación, fermentación, inoculación.

Abstract

The special quality of Geisha coffee has led to research and improvement of its sensory attributes through fermentation. The aim of this study was to identify native yeasts in Geisha coffee, isolate them, and assess their potential to enhance sensory and physicochemical quality in assisted fermentation processes. The study was conducted in three phases, identifying yeast species and genera (1); isolating and using them in fermentation processes compared to commercial inoculum (2); and evaluating the chemical composition and antioxidant capacity of the resulting coffee (3). Yeasts were identified through macro and microscopic observations, pH and Brix measurements, and two yeasts were selected for comparison with commercial yeast. Additionally, sensory evaluations and chemical analyses were conducted. Thirteen morphospecies of yeasts belonging to six genera (*Pichia*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, and *Rhodotorula*) were identified in Geisha coffee, with the genus *Pichia* sp. being the most abundant. Native yeasts from Geisha coffee (*Pichia* sp. and *Saccharomyces* sp.) were then selected for cultivation and inoculation in washed Geisha coffee, compared to a control inoculum (optimized strain of *Saccharomyces cerevisiae*). Sensory analysis revealed that all samples were considered specialty (>90 points) with the highest scores for the control inoculum and native *Pichia* sp. inoculum. Some sensory attributes included citrusy and fruity notes. Despite not being inoculated, the *Candida* sp. genus was observed in the evaluated washed Geisha coffee. Finally, no differences were demonstrated in flavonoid content, total polyphenols, and antioxidant activity.

Keywords: Macroscopic characterization, cupping, fermentation, inoculation

Introducción

El café ocupa el segundo lugar dentro de la lista de los productos más vendidos y es la bebida más popular en el mundo (Tucker, 2018). En busca de la diferenciación, la industria introduce la producción de cafés especiales, los cuales se distinguieron porque presentaban atributos únicos o especiales como el origen, calidad y variedad (Guimarães et al., 2016). En consecuencia, surge el café Geisha, el cual llega a países de América, como es el caso de Panamá, para producir cafés de calidad de exportación, que ahora son considerados un lujo.

Para mantener la calidad de esta fruta, es importante que este proceso sea realizado lo más rápido posible, de esta manera se evitará la pudrición debido a fermentaciones espontáneas y formaciones de hongos perjudiciales (Vaughan et al., 2015). Además de esto, un buen manejo de los procesos postcosecha provocaría un impacto en el producto final (Toledo, 2020). Por esta razón, para la industria de café especial, la fermentación forma parte esencial del procesamiento, ya que es donde el fruto potencializa su perfil sensorial, además de ser de ayuda para la degradación del mucílago del café (Haile y Kang, 2019c). Esto dado a que las levaduras, en conjunto con otros microorganismos, actúan química y biológicamente para producir metabolitos de relevancia en la obtención de esos aspectos sensoriales.

En este momento, la industria utiliza levaduras comerciales o simplemente deja que la fermentación espontánea ocurra. El problema con esto último es que no se puede estandarizar el producto debido a que no se han identificado los microorganismos que brindan esas características al fruto. Por eso, la estandarización de las características del aroma y sabor, buscan mejorar la calidad del café, provocando un aumento en su valor comercial, lo que ayuda al productor a aumentar sus ingresos. De acuerdo con Batista et al. (2020) uso de levaduras específicas mejora los puntajes sensoriales en comparación con una fermentación espontánea. De igual manera Silva et al. (2013) indica que el estudio de levaduras aportan a un mejor desarrollo de las fermentaciones gracias a la actividad de ciertas enzimas y producción de metabolitos.

Actualmente se han optimizado levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, con características especiales para aportar al desarrollo de la fermentación en café (Lallemand Inc., 2019). Por tanto, es importante la búsqueda constante de microorganismos que con ciertas formas de inoculación y diferentes concentraciones, brinden un aspecto de diferenciación al café especial. Así se demostró en el estudio de A. Pereira et al. (2018) donde se utilizaron levaduras *Candida* y *Torulospora* como cultivos iniciadores, los cuales brindaron puntajes altos en la taza. Algo similar se demostró en el estudio de Elhalis et al. (2021) que estos microorganismos en conjunto o individuales, producen percepciones sensoriales distintas, como es el caso de aromas y sabores frutales. A su vez, Haile y Kang (2019b) determinaron que luego de realizar la identificación de levaduras en el fruto del café, el proceso de fermentación cambió su velocidad dependiendo de la especie utilizada, lo que forma parte esencial para descartar ciertas levaduras en este proceso. Ayudando a la eficiencia y a mejorar la calidad del producto a vender.

Finalmente, teniendo como importancia la innovación y optimización de los procesos poscosecha, buscando beneficios económicos de un producto de agrado para el mercado meta. En este proyecto se aislaron, caracterizaron e inocularon levaduras nativas de uno de los lotes más antiguos de café Geisha en Panamá, comparando su efecto con la levadura comercial utilizada normalmente por la empresa. El aislamiento se realizó durante la fermentación anaeróbica en café Geisha natural, mientras que la inoculación se realizó utilizando café Geisha lavado en fermentación aeróbica. Los objetivos de este estudio fueron:

Aislar e identificar las levaduras con mayor presencia en el proceso natural del café Geisha de Hacienda La Esmeralda, durante el proceso de fermentación y secado.

Evaluar el comportamiento de levaduras nativas como cultivo iniciador en el procesamiento del café lavado Geisha y su efecto en las características sensoriales.

Determinar cambios químicos que puedan generar las levaduras nativas en el café Geisha.

Materiales y Métodos

El proyecto se desarrolló en la finca de Hacienda La Esmeralda, ubicada en Palmira, Boquete, Panamá. La preparación del aislamiento y análisis microbiológicos se realizó en la Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI) localizada en David, Chiriquí, Panamá. Los análisis sensoriales fueron elaborados en el laboratorio de catación de la empresa Hacienda La Esmeralda. Y además, se realizaron análisis químicos en el Laboratorio de Análisis de Alimentos (LAAZ), del Departamento de Agroindustria Alimentaria en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.

Fase I. Aislamiento e Identificación de Levaduras

Obtención de Muestras

Se utilizó café arábica, variedad Geisha, del lote Caballeriza, ubicado a una altura de 1600 msnm. El café fue cosechado en su plena etapa de madurez y se seleccionaron los frutos viables mediante el uso de agua para eliminar flotadores. Luego, estos se llevaron directamente a fermentación mediante el proceso natural anaeróbico, aproximadamente 136 kg de café en un tanque de acero inoxidable de una capacidad de 400L durante 3 días. Para obtener datos sobre la población micológica en el fruto recién cosechado, se tomaron 25 g de café uva con ayuda de guantes y se realizaron aislamientos y diluciones para extraer las colonias de levaduras. Se recolectaron muestras de mosto del día 1, día 2 y día 3 de la fermentación, las cuales fueron transportadas en hielera al laboratorio. Además, se tomó la temperatura, el pH y los grados Brix una vez al día de fermentación, para demostrar las condiciones en las que sobrevivieron las levaduras recolectadas. Asimismo, se tomaron muestras durante las 61 horas de secado, para determinar la sobrevivencia de estos en todo el proceso.

pH

Antes de la toma de muestra, se mezcló el café en fermentación para que fuese homogéneo. Luego, una vez al día se recolectó mosto de la válvula inferior del tanque de fermentación y con la

ayuda de un potenciómetro Milwaukee pH56 PRO, se tomaron los datos de pH del líquido proveniente de la fermentación.

Grados Brix

En un recipiente previamente limpio y seco, se recolectó una vez al día, la muestra de mosto de la válvula inferior del tanque de fermentación. Inmediatamente, con una pipeta de Pasteur, se tomó 1 mL de este líquido y con el refractómetro de la marca Aichose, se colocó la muestra y se anotaron los datos obtenidos.

Recuento e Identificación Morfológica de Levaduras

Se realizó un recuento de levaduras (Andrews y Hammack, 2022; Salfinger y Tortorello, 2015; Tournas et al., 1998) con variaciones, se utilizó como diluyente agua de peptona y el medio de cultivo fue agar extracto de levadura glucosa cloranfenicol (YGC). Se realizaron diluciones seriales desde 10^{-1} hasta 10^{-6} y se realizó el conteo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994 de la Secretaría de Salud et al. (1994). Además, de las diluciones seriales, se tomaron 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} para realizar los aislamientos por triplicado. Los mismos fueron llevados a incubación a temperatura ambiente, con revisiones diarias. En búsqueda de identificar estas levaduras, se traspasaron todas las morfo especies que macroscópicamente parecían distintas a un nuevo plato Petri utilizando el método de estriado por cuadrante, tomando aspectos como forma, elevación, consistencia, borde, textura, color, transparencia y brillo, esto con el objetivo de obtener cepas puras en medios YGC para ser caracterizados. Además, se realizaron análisis microscópicos para caracterizar las células por forma, tamaño, color, ornamentación, gemación y presencia de pseudohifas. De esta manera y con la lectura de artículos científicos (Martins et al., 2022), se identificaron por géneros las levaduras encontradas.

Fase II. Comportamiento de las Levaduras Nativas como Cultivo Iniciador y su Efecto Sensorial

Reproducción de Levaduras

Una vez caracterizadas las morfoespecies de levaduras, con ayuda de artículos científicos (Elhalis et al., 2021; Evangelista et al., 2013; Silva et al., 2013) se identificaron aquellas que

posiblemente pudieran aportar a las características organolépticas del café. Luego, se seleccionaron dos y se llevaron a reproducir siguiendo la metodología de S. J. Martinez et al. (2019) la cual utilizaba medio líquido extracto de levadura peptona glucosa (YEPG). Para este caso, se eligieron *Pichia* sp. y *Saccharomyces* sp. las cuales fueron reproducidas durante 48 h, luego se centrifugaron y, suspendiéndolas en agua destilada estéril, se llevaron a los baldes de fermentación para su inoculación según correspondía.

Para comprobar que la población entre cada una de las cepas fuese similar, se realizó un estriado por cada una de las levaduras y se sembraron tres puntos en nuevos platos Petri, de los cuales, al momento de inocular el medio líquido, se hizo un raspado de las tres colonias crecidas en dos días.

Manejo del Café

Se utilizó café arábica, variedad Geisha, del lote Trapiche, ubicado a una altura de 1600 msnm. Para la preparación de las muestras de café, se procedió a seleccionar el café mediante su peso, eliminando flotadores con el uso de agua. Seguido de esto, pasó por la despulpadora de la marca Pinhalense® con zaranda, para llevar 1.7 kg de café despulpado a fermentación aeróbica en baldes plásticos de 9.5 litros, los cuales fueron situados en la sala de fermentación de la empresa, uno al lado de otro. Listo el café en los baldes, se inocularon 20 mL de células en agua destilada de cada una de las levaduras escogidas. Colocando un tratamiento control, el cual sería la levadura comercial utilizada por la empresa. La fermentación llevó un tiempo de tres días, con mediciones periódicas de pH, temperatura y grados Brix, además de realizar recuento de levaduras al inicio y al final de la fermentación. Una vez terminado este tiempo, se lavó el café para eliminar cualquier resto de mucílago y se tomaron muestras para el análisis de humedad. Así mismo, se colocó el café en mezcladores de aproximadamente 50 cm x 50 cm para el secado. Es importante señalar que durante este proceso, el clima de la zona se encontraba lluvioso, por lo que se tomó la decisión de situar el

café en la parte superior de las camas elevadas en invernadero, para un secado más rápido. En esta etapa, se tomó recuento de levaduras durante el quinto y octavo día.

Diseño Experimental

La investigación se llevó a cabo con tres tratamientos, un tratamiento inoculado con *Pichia* sp., el segundo tratamiento con *Saccharomyces* sp. y el control, el inóculo comercial, a estos se les realizaron tres repeticiones, obteniendo un total de nueve unidades experimentales (Cuadro 1). El mismo fue realizado con un Diseño Completamente al Azar (DCA) con medidas repetidas en el tiempo. La toma de datos de cada una de las unidades experimentales se realizó durante cuatro días, en la fermentación y el secado.

Cuadro 1

Tratamientos evaluados en la investigación

Tratamiento	Cultivo iniciador	Volumen (mL)	Medidas a través del tiempo ¹
1	<i>Pichia</i> sp. nativa	20	4
2	<i>Saccharomyces</i> sp. nativa	20	4
3	Inóculo comercial	20	4

Nota. ¹Día 0 y 3 de fermentación, día 5 y 8 de secado.

Recuento y Abundancia Relativa de las Levaduras

Siguiendo la metodología explicada en la Fase I, se realizó el recuento de levaduras para cada día unidad experimental con sus respectivas repeticiones (Andrews y Hammack, 2022; Salfinger y Tortorello, 2015; Tournas et al., 1998). Además, con el fin de identificar la abundancia relativa de las poblaciones inoculadas durante los diferentes días de fermentación, se determinaron aspectos macroscópicos como la forma, elevación, consistencia, borde, textura, color, transparencia y brillo. Esto consistió en hacer el recuento total de las colonias, y una vez se diferenciaron los géneros presentes, se contaron las colonias por género y mediante la siguiente Ecuación [1] se calculó el porcentaje de abundancia relativa:

$$Abundancia\ Relativa\ (\%) = \frac{I_{si}}{\sum N_{si}} * 100 \quad [1]$$

Donde:

Isi= Número total de géneros individuales

ΣN_{si} = Número total de población de géneros

Grados Brix

Dos veces al día, con la ayuda de una pipeta Pasteur, previamente desinfectada, se tomó aproximadamente 1 mL del líquido en el que se encontraba sumergido el café en fermentación y con un refractómetro de la marca Aichose, se tomaron los datos en grados Brix.

pH

De igual forma, dos veces al día, se mezclaba la masa fermentable y utilizando un potenciómetro Milwaukee pH56 PRO, se desinfectaban los electrodos para introducirlos en la misma, una vez dejase de verse el valor cambiante, se anotaban los datos de pH del café en fermentación.

Humedad

Luego del lavado de cada unidad experimental, se tomaron 5 g de cada unidad experimental y se llevaron a secar en un deshidratador de alimentos Aroma® AFD-815B a la temperatura más baja, en este caso, 95 °F (35 °C) durante 8-10 horas (Soderberg, 2006). Luego se pesaron las muestras nuevamente y se calculó el porcentaje de humedad utilizando la siguiente Ecuación [2].

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{muestra húmeda(g)} - \text{muestra seca(g)}}{\text{muestra húmeda(g)}} * 100 \quad [2]$$

Análisis Sensorial

Las muestras se dejaron reposando dos semanas luego de su último día de secado y se llevaron a trillar en una descascaradora de muestras de café para laboratorio de la marca Pinhalense® modelo DRC, esto para obtener 120 g de cada unidad experimental. Veinticuatro horas antes de la catación, en una tostadora de muestras Probat BRZ, se colocaron 120 g de café oro y siguiendo el perfil de tostados para café especial, se tomó aproximadamente 10 minutos entre muestras lograr alcanzar 58

en el grano entero según la escala del M-Basic Agtron, esto de acuerdo con las recomendaciones SCA para procesos de catación. Una vez realizado el tueste, se cubrieron las muestras para reducir la exposición al aire.

En búsqueda de lograr un buen desarrollo durante la catación, se tomó como referencia el protocolo del Specialty Coffee Association (2015) y se llevaron dos panelistas certificados por SCA al laboratorio de catación de Hacienda La Esmeralda S.A. La puntuación fue realizada en una escala de 6 a 10 puntos, en donde cada incremento a favor de cierto atributo, se le sumaba 0.25 puntos. Además de que se evaluó el aroma, sabor, regusto, acidez, cuerpo, balance, en frío y el puntaje final.

Para este proceso se pesaron 12.5 gramos para 225 mL de agua en tazas de porcelanas. La molienda se llevó a cabo 10 minutos antes de realizar la catación, llevando el café en grano a 70-75% de partículas con la ayuda del molino Mahlkonig EK43®. En cuanto al agua utilizada, se preparó una solución de agua con Aquacode Coffee Brewing Water®, producto que permite alcanzar una mejor extracción del café. Mientras se realizaba el sensorial para el aroma, se prepararon calentadores de agua Brewista® para elevar la temperatura del agua a 94 °C. Una vez los catadores culminaran la etapa de aroma, el agua caliente se vertió hasta el borde de la taza directamente sobre el café molido y se dejó reposar durante cuatro minutos antes de ser evaluado.

Análisis Estadístico

Los resultados de los análisis microbiológicos y sensoriales se analizaron con el programa SAS OnDemand for Academics®. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con $P \leq 0.05$ y una separación de medias Ls-means.

Fase III. Efecto de las Levaduras Nativas en las Características Químicas del Café

Análisis Químicos

Por motivo de logística se tomaron los dos tratamientos con mejores evaluaciones sensoriales. Para analizar flavonoides totales y polifenoles totales, se utilizó espectrofotometría UV/VIS. Todos estos análisis se realizaron a partir del café tostado.

Con el uso de la metodología de Jeszka-Skowron et al. (2016) con ciertas modificaciones, para la preparación del extracto acuoso que sería utilizado para todos estos análisis, se realizó lo siguiente: los granos tostados fueron molidos. Luego, se pesó un gramo del café en tubos cónicos de centrifugación y se añadieron 50 mL de agua destilada a 90 °C, manteniendo esta temperatura por 10 minutos con ayuda de baño maría. Luego, se centrifugó el extracto a 3500 rpm durante 5 minutos. Seguido de esto, el sobrenadante se filtró a través papel filtro de café.

Flavonoides Totales.

Se decidió que el mejor método a adoptar para la realización de esta investigación sería el de Zhishen et al. (1999) con ciertas modificaciones. Previo comienzo del estudio, se construyó una curva de calibración de catequina (Sigma-Aldrich Inc, MO, EUA) con concentraciones de 50, 200, 400, 600 y 1000 ppm ($R^2=9998$), disueltos en agua desionizada. Una vez lista, se prepararon dos soluciones: solución A conformada por 1.8 mL de NaNO_2 al 5% más 24 mL de agua desionizada y la solución B conformada por 12 mL de NaOH a 1M más 14.4 mL de agua desionizada. Luego, se extrajeron 600 μL del extracto acuoso de cada muestra de café tostado. Muestra a la cual se le añadió 2.58 mL de la solución A, dejándola reposar 5 min y donde luego se le agregó 180 μL de AlCl_3 al 10%. Tras un período de 1 min de reposo, se le adicionó 2.52 mL de la solución B. Muestras que por último, se leyeron en el espectrofotómetro UV/VIS (Cary 8454, Agilent Technologies, EUA) a 415 nm. Los resultados de estos análisis fueron expresados en mg de equivalentes de catequina por gramo de café tostado. La curva estándar fue de $R^2 = 0.9996$.

Polifenoles Totales.

De acuerdo con el procedimiento de Singleton et al. (1999) y Wolfe et al. (2003) se cuantificaron los polifenoles totales, a través del método de Folin-Ciocalteu con ciertas modificaciones. Se mezclaron 60 μL de muestra con 3 mL de agua destilada y 250 μL del reactivo Folin-Ciocalteu's (1 N) (Sigma-Aldrich, Co., MO, EE.UU.). Luego, se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente y se procedió a añadir 750 μL de Na_2CO_3 al 20% y 950 μL de agua destilada. Terminado este

procedimiento, se dejó equilibrar por 30 min a temperatura ambiente y se procedió a realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS (Cary 8454, Agilent Technologies, EE.UU.) a 765 nm. Para comparar los resultados finales, se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico (Sigma-Aldrich, Co., MO, EE.UU.) disuelto en agua con concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500, 700 y 1000 ppm. Los resultados fueron expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de café tostado. La curva estándar fue de $R^2 = 0.9954$

Actividad Antioxidante.

Con el fin de determinar la actividad antioxidante de los extractos de café se midió la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Esto, a través de la adaptación del método utilizado por Trandafir et al. (2013) y Ricci et al. (2019). Se elaboró una solución de DPPH al 0.004%. Luego, a 2.50 mL de solución metanólica de DPPH, se le adicionó 50 uL del extracto acuoso de café y se diluyó con un factor de dilución de 250. Luego, se agitó vigorosamente, se dejó incubar por media hora a 27 °C y se llevó al espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm. Además, se preparó una curva de calibración de ácido gálico disuelto en agua desionizada de 10, 20, 30, 60, 90 ppm ($R^2 = 0.9962$) expresando los resultado en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de café. Para finalmente determinar la actividad antioxidante utilizando la siguiente Ecuación [3].

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} * 100 \quad [3]$$

Donde:

A₀= Absorbancia inicial de DPPH al tiempo de 0 minutos

A_s= Absorbancia final al tiempo de 30 minutos

Análisis Estadístico

Los resultados de los parámetros químicos se analizaron con el programa SAS OnDemand for Academics®. Se realizó las media de los datos mediante la prueba T- Student correspondiente a los tratamientos mejores evaluados sensoriales para determinar las diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$).

Resultados y Discusión

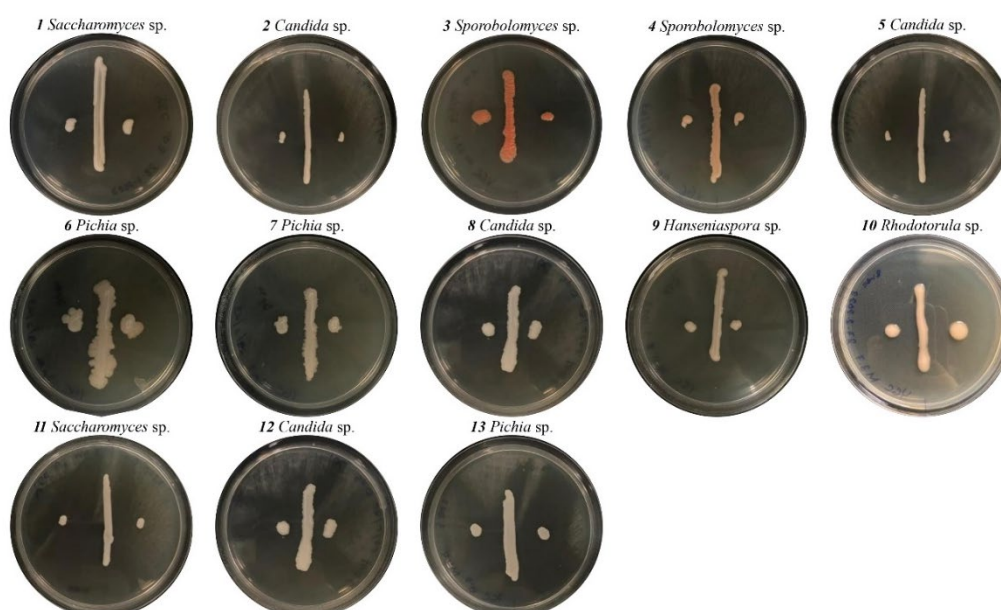
Fase I. Aislamiento e Identificación de Levaduras

Recuento e Identificación Morfológica de Levaduras

Esta etapa tomó aproximadamente un mes para su realización. Se evaluaron aspectos macro y microscópicos para determinar las diferencias entre cada género. La mayoría de las colonias, en cuanto al aspecto macroscópico, presentaron ser circulares de color crema a blanco hueso brillante, a excepción de las posibles colonias del género *Pichia* sp. que presentaban forma irregular y una elevación plana y nada brillante (Figura 1). Además de las posibles colonias del género *Rhodotorula* sp. y *Sporobolomyces* sp. que presentaron forma irregulares a circulares en diferentes tonalidades de salmones. Para que estas colonias de características macroscópicas similares se lograran identificar de forma más clara, se observaron las células. Y mediante el tamaño, la forma, tipo de gemación y la presencia de pseudohifas en la observación, se realizó revisión de literatura, en donde se presentaban las características e imágenes como complemento para lograr identificarlas de manera más acertada (Martins et al., 2022; L. Ramos et al., 2023; Wulan et al., 2021).

Figura 1

Morfoespecies en su aspecto macroscópico



Durante todo el proceso de fermentación anaeróbica del café natural Geisha, se identificaron 13 morfoespecies distintas que podrían corresponder a estos seis géneros de levaduras: *Pichia* sp.; *Candida* sp.; *Sporobolomyces* sp.; *Hanseniaspora* sp.; *Saccharomyces* sp.; *Rhodotorula* sp. (Cuadro 2). La mayoría de estas levaduras se encuentran en el suelo, frutas y árboles, además de presentarse en mucosas, piel, genitales de mamíferos e intestinos (Deak, 2007). Esto explica los resultados de este estudio, además de que indica su similitud con otros estudios, en donde se menciona la presencia de estos géneros fermentativos (Carvalho Neto et al., 2017; Evangelista et al., 2015; Q. Puerta et al., 2015). El mucílago de café, además de otros compuestos, está formado por azúcares como la sacarosa que se invierte para formar glucosa y fructosa, sustratos importantes para el crecimiento de las levaduras (D'Amore et al., 1989; G. Puerta y Ríos, 2011).

Cuadro 2

Descripción de los aislados de levaduras nativas en el proceso del café natural Geisha

N ^o	Descripción	
	Macroscópica	Microscópica
1	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-1(2) mm después de cuatro días del crecimiento levaduriforme. Colonias de forma circular, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde entero, textura lisa, color blanco hueso a ligeramente crema, transparencia opaca y brillo notable.	Células con forma globosa a ampliamente elipsoidal y cilíndrica de (4)5-7x(3)4-6(7) μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral, ausencia de pseudohifas.
2	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de (0.5)1-1 mm después de cinco días del crecimiento levaduriforme. Forma circular, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde entero, textura lisa, color blanco hueso, transparencia opaca y brillo notable.	Células con forma elipsoidal a ampliamente cilíndricas de (4)5-7(8) x 3-5(6) μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral y ausencia de pseudohifas.
3	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-1(2) después de dos días del crecimiento levaduriforme. Forma circular a irregular, elevadas, consistencia suave, borde entero a rizado, textura entre lisa y rugosa, color salmón oscuro, transparencia opaca, y brillo notable.	Células con forma globosa a ligeramente elipsoidal de (6)7-12(15) x (3)4-5 μm color hialino, ornamentación lisa, gemación monopolar y ausencia de pseudohifas.
4	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-2 mm a los cinco días del crecimiento levaduriforme. Colonias con forma irregular, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde ondulado, textura lisa, color salmón oscuro, transparencia opaca y brillo notable.	Células con forma globosa a ampliamente cilíndrica de (9)10-14(16) x 5-7(8) μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral y ausencia de pseudohifas.

N °	Descripción	
	Macroscópica	Microscópica
5	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-1(2) mm después de cuatro días del crecimiento levaduriforme. Forma circular, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde entero, textura lisa, color blanco hueso a crema, transparencia opaca y brillo notable.	Células con forma elipsoidal a ampliamente cilíndricas de (4)5-7(9) x (2)3-5 μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral y ausencia de pseudohifas.
6	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de 4-7(8) mm a cuatro días de crecimiento levaduriforme. Colonias con forma irregular, elevación plana, consistencia suave, borde rizado, textura lisa, color blanco hueso a crema, transparencia opaca y sin brillo notable.	Células con forma elipsoidal a ampliamente cilíndrica de (4)6-10(11) x 3-5 (6) μm color hialino, gemación multilateral y ausencia de pseudohifas.
7	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-3(4) mm después de cuatro días del crecimiento levaduriforme. Colonias con forma filamentosa, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde filamentoso, textura lisa, color blanco hueso, transparencia opaca y sin brillo notable.	Células con forma elipsoidal a ampliamente cilíndrica de (4)6-10 (11) x 3-6(7) μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral, presencia de pseudohifas hialinas septadas.
8	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-2 mm a cuatro días de crecimiento levaduriforme. Colonias con forma filamentosa, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde filamentoso, textura lisa, color blanco hueso a crema, transparencia opaca y sin brillo notable.	Células con forma elipsoidal a ampliamente cilíndrica de (5)6-13(19) x 3-5(6) μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral, presencia de pseudohifas hialinas septadas.
9	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de (1)2-4(5) mm después de cuatro días del crecimiento levaduriforme. Colonias con forma circular, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde entero, textura lisa, color blanco hueso a crema, transparencia opaca y brillo notable.	Células con forma globosas a subglobosas de (3)4-6(7) x (2)3-5(6) μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral, ausencia de pseudohifas.
10	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de (1)2-3 mm después de siete días del crecimiento levaduriforme. Colonias con forma circular, elevación elevada, consistencia suave, borde entero, textura lisa, color salmón claro, transparencia opaca, brillo notable.	Células con forma elipsoidal a ampliamente cilíndrica de (3)4-6(7) x 3-5(6) μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral, ausencia de pseudohifas.
11	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de (1)2-4 mm después de tres días del crecimiento levaduriforme. Colonias con forma circular, elevación de plana a elevada, consistencia suave, borde entero, textura lisa alrededor y rugosa en medio, color blanco en medio y crema alrededor, transparencia opaca y sin brillo en el medio y alrededor brillante.	Células con forma globosa a ampliamente elipsoidal y cilíndrica de (4)5-7x(3)4-6(7) μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral, ausencia de pseudohifas.
12	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-2 mm después de tres días del crecimiento levaduriforme. Colonias con forma irregular, elevación convexa a pulvinada, consistencia dura, borde rizado, textura rugosa, color blanco hueso, transparencia opaca y sin brillo notable.	Células globosas a ampliamente elipsoidal de 4-8(10)x(1)2-3(4) μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral y pseudohifas presentes septadas hialinas.
13	Las colonias incubadas a 37 °C en agar YGC presentaron un diámetro de (2)3-6(8) mm después de tres días del crecimiento levaduriforme. Colonias con forma irregular, elevación plana, consistencia suave, borde ondulado a rizado, textura rugosa, color blanco, transparencia opaca y sin brillo notable.	Células con forma elipsoidal a cilíndrica de (4)5-8(9)x(1)2-4 μm color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral y pseudohifas presentes septadas hialinas.

En cuanto al recuento de levadura, el menor conteo se visualizó para la microbiota del fruto y para la muestra de secado (Cuadro 3). Esto puede estar relacionado a que con el deterioro del mucílago durante la fermentación, los azúcares y metabolitos se tornan disponibles, lo que causa que estos microorganismos puedan aprovechar los sustratos requeridos para su crecimiento (Péter et al., 2017). Es interesante observar que en este estudio se identificaron *Saccharomyces* sp., *Candida* sp. y *Sporobolomyces* sp. en uno de los recuentos más bajo de esta parte de la investigación (Figura 2). De acuerdo con Carvalho Neto et al. (2017) y Q. Puerta et al. (2015) estos géneros tienen la habilidad de adaptarse a las condiciones ambientales antes y después de la fermentación, es decir que la calidad del mucílago no es determinante en su permanencia.

Cuadro 3

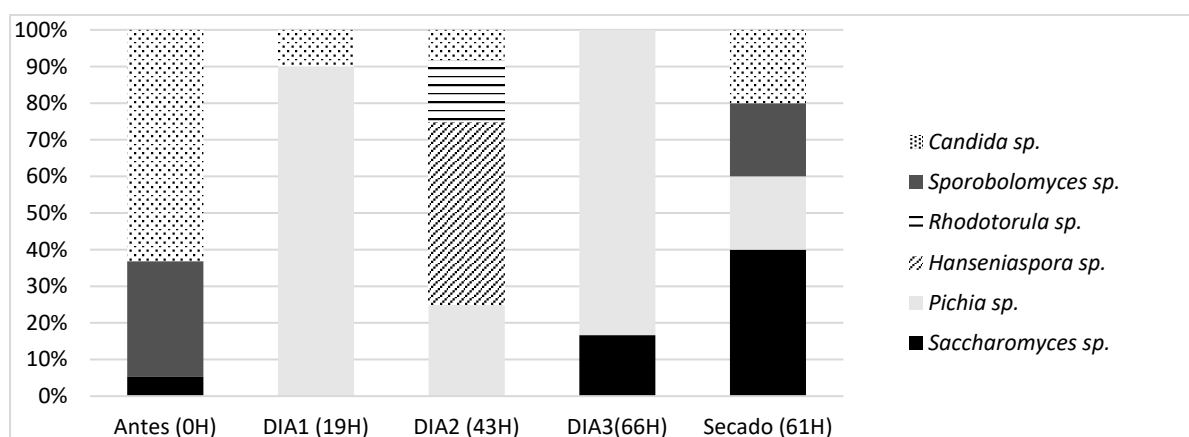
Resultados del recuento de levaduras antes, durante y después de la fermentación anaeróbica del café natural Geisha

Muestreo	Fruto ¹	Fermentación			Secado ³
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	
log UFC/mL ²	6.0	7.3	7.2	6.9	6.7
Morfoespecies caracterizadas	3	2	4	2	4

Nota. ¹Muestras cosechadas con guantes. ²Valores indican una sola repetición. ³A las 66 horas de secado.

Figura 2

Cambios en la abundancia relativa de levaduras nativas, durante y después (muestreo a las 61 horas de secado) de la fermentación anaeróbica del café natural Geisha



El recuento inicial de esta fase parecía ser 6 log UFC/g, resultados consistentes con otra investigación donde el café cereza fue reportado con 6.3 log UFC/g para el fruto maduro recién cosechado (Machado et al., 2019). Para el primer día de fermentación la población de levaduras fue de 7.3 log UFC/mL (Cuadro 3), etapa en donde aparece *Pichia* sp. acompañada de *Candida* sp. (Figura 1). G. Pereira et al. (2014) señala que durante las primeras 16 horas de fermentación se determinó que las levaduras con mayor presencia fueron *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Candida glabrata*, *Candida quercitrusa* y *Pichia guillermondii*. De igual importancia, los resultados de este estudio mostraron un aparente pH de 4.36 y un grado Brix de 10.5 para el primer día de fermentación (Cuadro 4). De acuerdo con G. Puerta (2012) el pH y grado Brix del café cereza depende de las actividades de cosecha, poscosecha, madurez y demás, pero, inicialmente se encontró en un promedio de 5.2 para pH y 17.1 para el grado Brix. Por lo tanto, se pudo observar que este café desde su cosecha hasta el primer día de fermentación pareció aumentar su acidez y redujo su contenido de sólidos solubles. Esto posiblemente relacionado a la producción de ácidos debido a la interacción entre las bacterias ácido-lácticas y levaduras. En donde la levadura proporciona nutrientes para el crecimiento de las bacterias, y las bacterias producen la acidificación del medio lo que provoca un ambiente ideal de crecimiento para las levaduras (Da Silva et al., 2022). Al segundo día, el recuento de levaduras parecía mantenerse en 7.2 log UFC/g, sin embargo, en esta ocasión surgieron *Hanseniospora* sp. y *Rhodotorula* sp. en un pH de 4 y un grado Brix de 16. Estos resultados no soportan a Masoud et al. (2004), quienes demostraron la presencia de *Hanseniospora uvarum* antes, durante y después de la fermentación, en donde disminuía su conteo durante la fermentación y el secado. Además de que se observó *Hanseniospora opuntiae* las primeras ocho horas de fermentación. Por consiguiente, parece posible que estos resultados se deban a una especie distinta con características fermentativas especiales a las estudiadas en otros estudios científicos. Asimismo, la aparición de estas levaduras durante la mitad de la fermentación podría estar vinculada a los cambios en las condiciones, como lo es el pH y los grados Brix (Evangelista et al., 2014). En otras palabras, parámetros que se interrelacionan a la hidrólisis de la pectina y el mucílago del café, debido al aumento en la acidez del medio, lo que indica

una mayor producción de metabolitos como los ácidos orgánicos (Evangelista et al., 2014; Evangelista et al., 2015; Marques et al., 2010).

Cuadro 4

Valores de grados Brix, pH del mosto durante la fermentación del café natural Geisha

Días de fermentación	Parámetros ¹	
	°Brix	pH
Día 1	10.5	4.36
Día 2	16.1	4
Día 3	16	4.06

Nota. ¹Valores indican una sola repetición.

Para el final de la fermentación (DIA 3), la población de levaduras fue de 6.9 log UFC/g, en donde *Saccharomyces* sp. mostró su presencia, acompañada de un alto porcentaje de *Pichia* sp. Este resultado difiere de Haile y Kang (2019b) quienes demostraron la presencia de otras levaduras como *S. fibuligera* además de *Pichia* sp. y *Saccharomyces* sp. durante esta fase. Una posible explicación para esto es que en este mismo estudio se indica que *Saccharomyces cerevisiae* es altamente reproducible en comparación con otras levaduras debido a su capacidad de sobrevivir en ambientes competitivos. Asimismo, se presenta como *Pichia flavescens* y *Pichia anomalus* no presentaron diferencias con la cepa de *Saccharomyces* sp. en ese estudio. Por otra parte, el pH parecía mantenerse cercano a 4.06, seguido de un grado Brix de 16.1, indicando que la producción de ácidos se mantuvo debido a que no se proporcionaba las condiciones para el continuo crecimiento de estos microorganismos (T. Pereira et al., 2022). Esto podría relacionarse a una tasa de proliferación disminuyente, es decir, la entrada a la fase estacionaria que entre mayor es la población, mayor requerimiento de nutrientes, lo que provoca competencia entre las levaduras estudiadas (González, 2021). Entre los principales compuestos producidos durante las fermentaciones anaeróbicas son el ácido láctico, butanol, etanol, entre otros (Corrales et al., 2015). Esto se relaciona al consumo rápido de los azúcares del sustrato para convertirlo en componentes como el etanol, que causan la inhibición del crecimiento de otras especies de levaduras (Dashko et al., 2014). Como es el caso de *Saccharomyces* sp. y *Pichia* sp. que

han demostrado ser las más resistentes al etanol y son capaces de sobrevivir hacia el final de la fermentación (Da Silva et al., 2019; Maicas, 2020).

En la fermentación los microorganismos utilizan los azúcares como sustrato para su actividad metabólica, por lo que normalmente debería de disminuir. Sin embargo, un hallazgo inesperado fue el supuesto aumento de los grados Brix durante la fermentación en esta fase. Este es un dato que presenta poca evidencia para el soporte del aumento de los grados Brix durante la fermentación en café. Sin embargo, hay que tomar en consideración que este dato no solo expresa los azúcares, sino los sólidos solubles del mucílago como glucosa, ácido málico, láctico, fructosa, galacturónico, etanol, compuestos resultados de la degradación de las sustancias pécticas del café (G. Puerta y Ríos, 2011). Es por ello que G. Puerta (2012) mencionó en su estudio, que los grados Brix aumentan durante la fermentación de café cuando se realiza en sistemas sumergidos debido a la disolución de estas sustancias en el agua. Por lo tanto, es posible especular que el exudado del café estudiado (mosto) presentaba ser el medio de disolución para estos compuestos, lo que reflejó este posible aumento de los grados Brix.

Durante el secado las poblaciones de estas levaduras fueron de 6.7 log UFC/g, visualizando un aumento en el porcentaje de aparición de *Saccharomyces* sp., la aparición de *Candida* sp. y *Sporobolomyces* sp., además de presentarse una gran disminución de *Pichia* sp. Los cambios en la abundancia de estas levaduras fue reportado de igual manera con Elhalis et al. (2020) donde se mencionaba que levaduras como *Debaryomyces hansenii* fue visualizada las primeras 24 horas de fermentación y luego desapareció al final de este proceso, tomando en consideración que este microorganismo es del tipo no fermentativo, lo que podría explicar su pérdida. La prevalencia de estas levaduras durante el secado, podría estar relacionado a que géneros como *Candida* sp. pueden tolerar baja actividad de agua (Zhang et al., 2023). Para el caso de *Saccharomyces* sp. se ha demostrado que esta levadura tiene la capacidad de sobrevivir en periodos donde los nutrientes se encuentran escasos (Smets et al., 2010). De hecho, la trehalosa se considera un disacárido que forma parte importante en

esta sobrevivencia, esto debido a que este compuesto contribuye al estrés de las células preservando las células durante el choque térmico del secado (Virgilio, 2012).

El comportamiento de las levaduras estudiadas en esta investigación fue el esperado, en países como Brasil, Colombia, Tanzania y Australia, presentaron especies de los mismos géneros de microorganismos presentados en este estudio (Cruz-O'Byrne et al., 2021; Elhalis et al., 2020; Masoud et al., 2004; G. Pereira et al., 2014). De hecho, no solo en café se ha estimado esta conducta, en vino se ha determinado la presencia de levaduras como *Rhodotorula mucilaginosa* y *Pichia anomala* durante el proceso de fermentación espontánea (Díaz et al., 2013). Este hallazgo sugiere que estas poblaciones micológicas forman parte esencial del desarrollo fermentativo de los alimentos. Aun así, Delgado et al. (2020) menciona la variabilidad en la existencia de las especies de levaduras, dependiendo de la zona geográfica donde se encuentre la muestra estudiada.

Fase II. Comportamiento de las Levaduras Nativas como Cultivo Iniciador y su Efecto Sensorial

Luego de identificar morfológicamente las levaduras nativas del café natural Geisha de Hacienda La Esmeralda, proveniente del mosto de la fermentación anaeróbica y seleccionando dos levaduras a reproducir e inocular. Se eligieron *Pichia* sp. y *Saccharomyces* sp., las cuales han demostrado brindar buenas características sensoriales para el café (Elhalis et al., 2021; Evangelista et al., 2013; Silva et al., 2013). En esta fase se inocularon estas levaduras nativas en café lavado Geisha de otro de los lotes de la empresa. De esta manera, se realizó la comparación con la levadura comercial utilizada comúnmente por ellos. Este estudio reportó por primera vez el uso de levaduras nativas de café Geisha natural anaeróbico en Panamá, como cultivo iniciador en la fermentación del café especial.

Recuento de Levaduras

De acuerdo con el análisis estadístico, el modelo no presentó diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, para los valores entre distintos días, sí hubo diferencias ($P \leq 0.05$) entre el primer y último día de fermentación. Además, el quinto día de secado presentó diferencias tanto para

el tiempo de fermentación, como para el octavo día de secado. También, se culminó la toma de muestras de secado con un valor de carga microbiana similar al inicial (Cuadro 5). A diferencia de la Fase I en donde el café no fue despulpado y obtuvo un conteo de 6 log UFC/g, el café lavado en esta fase presentó un conteo de levaduras en promedio de 3.7 log UFC/g. Esto relacionado a que el café cereza, al retener su pulpa, puede albergar una población microbiana diversa y abundante en la capa externa donde interactúa con el medio ambiente y puede tener acceso a una variedad de sustratos (Silva et al., 2000), y que al momento de retirar esta pulpa, causa la pérdida de esta diferencia de población.

Cuadro 5

Recuentos de levaduras (log UFC/g) del proceso de fermentación (DIA 0 y 3) y secado (DIA 5 y 8)

Tratamiento ¹	Fermentación		Secado	
	DIA0 ²	DIA3	DIA5	DIA8
Inóculo con <i>Pichia sp. nativa</i>	3.6 ± 0.05 ^{az}	7.1 ± 0.03 ^{ax}	5.0 ± 0.32 ^{ay}	3.9 ± 0.15 ^{az}
Inóculo con <i>Saccharomyces sp. nativa</i>	3.7 ± 0.06 ^{az}	7.3 ± 0.73 ^{ax}	5.2 ± 0.73 ^{ay}	4.0 ± 0.08 ^{az}
Inóculo control	3.7 ± 0.07 ^{az}	7.1 ± 0.05 ^{ax}	5.3 ± 0.50 ^{ay}	4.3 ± 0.43 ^{az}
C.V (%) ³	1.96	5.72	6.36	7.40

Nota. ¹ Cultivo iniciador para cada tratamiento. ² Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

³ Coeficiente de variación. ^{a-d} Valores seguidos de una letra diferente en cada columna representan diferencia estadística entre tratamiento (P ≤ 0.05). ^{x-z} Valores seguidos de una letra diferente en cada fila indica diferencia estadística entre medidas repetidas en el tiempo (P ≤ 0.05).

Por otra parte, se pudo apreciar que para todos los tratamientos hubo un aumento entre el día inicial hasta el día final de fermentación de 3.6 a 7.1 log UFC/g, correspondiendo al incremento de la Fase I. Este comportamiento demuestra ser el esperado debido a que de acuerdo con Ribeiro et al. (2017) las poblaciones de levaduras aumentan durante todo el proceso de fermentación debido a la presencia de sacarosa como sustrato. En cambio, se pudo observar que al iniciar el secado, se disminuyó esta población. En el proceso de secado, el café se expone al aire y a temperaturas elevadas, lo que puede crear un ambiente menos propicio para la proliferación de levaduras. Además, la reducción de la actividad de agua a medida que el café se seca también contribuye a esta disminución. Esto, según Vilela et al. (2010) se entiende como un comportamiento normal debido a que las

levaduras tienden a descender al momento de que las condiciones de nutrientes, actividad de agua y temperatura, no son ideales para su crecimiento.

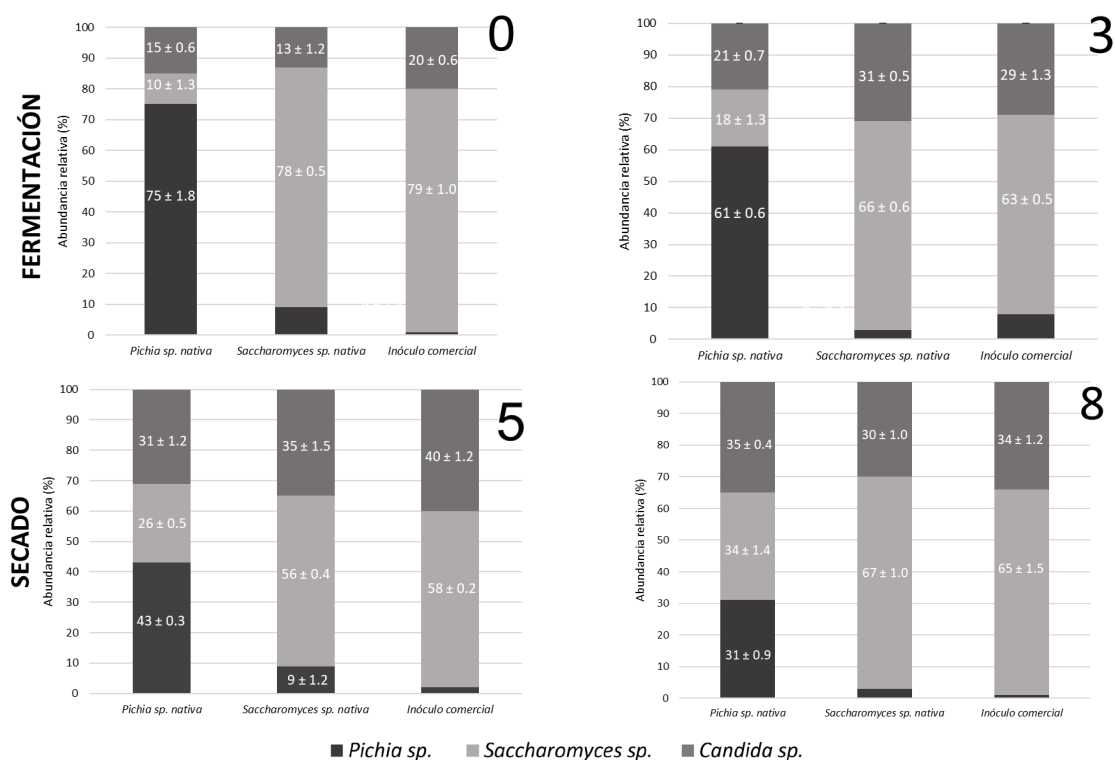
Abundancia Relativa de las Levaduras

De acuerdo con el análisis estadístico, tanto entre tratamientos, como entre días, existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Debido a que no se realizó una esterilización previa a la inoculación, los cultivos iniciadores fueron mezclados con la población nativa del café lavado en esta fase. Por tanto, luego de realizar la identificación macroscópica de los géneros durante el recuento de estos microorganismos, se determinó la presencia de las posibles levaduras *Pichia* sp., *Saccharomyces* sp. y *Candida* sp. en todos los tratamientos. Es importante mencionar que en esta fase no se detectó la presencia de *Sporobolomyces* sp., *Rhodotorula* sp. y *Hanseniaspora* sp., las cuales fueron identificadas en la Fase I, esto pudiendo estar relacionado al proceso de despulpado en el cual se transporta los frutos del café con agua, lo que provoca el lavado de ciertos microorganismos (Silva et al., 2000).

Se pudo observar que para el inicio de la fermentación, dentro del recuento promedio de 3.7 log UFC/g de levaduras, el inóculo de *Pichia* sp. nativa obtuvo una abundancia relativa de 75%, *Saccharomyces* sp. nativa con 78% y el inóculo comercial con 79% (Figura 3). Sin embargo, para el tercer día de fermentación en un promedio de 7 log UFC/g de levaduras, se observó un decrecimiento gradual en el porcentaje de aparición para todos los cultivos inoculados y un aumento en lo que parecía ser la población nativa de *Candida* sp. Tomados juntos estos resultados concuerdan con Vilela et al. (2010) quién indicó que durante las primeras 24 horas de fermentación, la mayor población está dominada por bacterias y que luego de esto, la población de levaduras crece. Por lo tanto, se puede inferir que durante este proceso, todas las levaduras presentes en cada tratamiento crecieron, incluso las que no fueron inoculadas. Es decir que proporcionalmente los cultivos iniciadores disminuyeron en su porcentaje de aparición para abrir espacio al aumento de la presencia de *Candida* sp. sin provocar la disminución del conteo de levaduras. Además, cabe mencionar que pudo haber un crecimiento de especies distintas a los inoculados de *Pichia* sp. y *Saccharomyces* sp.

Figura 3

Presencia de levaduras en porcentaje de aparición durante la fermentación (DIA 0 y 3) y secado (DIA 5 y 8)



En contraste con la fase I que para el tercer día de fermentación, *Pichia sp.* y *Saccharomyces sp.* fueron los aparentemente encontrados en la fermentación anaeróbica del café natural Geisha, en esta fase se puede observar la presencia de *Candida sp.* además de las levaduras inoculadas. Esto podría llevar a la explicación de que era una especie distinta a la observada en la primera fase. Este resultado es consistente a estudios similares, donde especies de este género de levadura incluso podían mantenerse hasta 216 horas de fermentación, esto debido a su capacidad de sobrevivencia en el medio (Oliveira et al., 2019; Vilela et al., 2010).

Los cambios más notables se obtuvieron en el secado, principalmente para el tratamiento inoculado con *Pichia sp.* nativa. Se observó cómo esta levadura iba disminuyendo su porcentaje de aparición durante el desarrollo del procesamiento del café. Para el quinto día de secado, en un promedio de 5.2 log UFC/g todos los tratamientos mostraron disminuir en porcentaje de aparición.

De igual manera, para el octavo día de secado *Pichia* sp. nativa disminuyó del 75 al 31% del porcentaje de aparición, mientras que los demás tratamientos aumentaron, siendo el tratamiento inoculado con *Saccharomyces* sp. nativa el de mayor aparición comparándolo con los demás cultivos inoculados. Hay poca evidencia que soporte estos cambios en el café, pero se sugiere que pudo estar relacionada a la capacidad de tolerancia a una baja actividad agua. Como lo expresa Delgado et al. (2020) factores como los rayos UV y las altas temperaturas pueden ser parte de la supervivencia de ciertas levaduras durante esta etapa. G. Pereira et al. (2012) evaluó la habilidad de supervivencia a temperaturas altas en ciertas levaduras durante el proceso de fermentación espontánea, determinando que *S. cerevisiae* es tolerante a estos cambios, en ese caso, a 45 °C. Además, se indica la baja necesidad nutricional de la levadura mencionada anteriormente, lo que explica la supervivencia en este estudio durante el secado.

Este hallazgo apoya la investigación previa de Meersman et al. (2016) quienes observaron en cacao que, luego de la inoculación, las cepas que no pertenecen al género *Saccharomyces* como *Pichia kluyveri*, no alcanzaban tamaños de población altos y tendían a desaparecer en cierto punto. Mientras que para el caso de *Saccharomyces cerevisiae* se demostró que podía reprimir el crecimiento de las levaduras nativas en el cacao, volviéndose la levadura con dominancia debido a su posible tolerancia al ácido acético o láctico.

Grados Brix

El modelo estadístico mostró que al menos uno de los tratamientos fue diferente estadísticamente, además de presentar diferencias entre los días de tomas de muestras ($P \leq 0.05$). Se determinó que los grados Brix iniciales se encontraban en 12% (Cuadro 6). De acuerdo con G. Puerta (2012) en promedio el café maduro se encuentra entre 15% y 19% de grados Brix, menor a esto se considera pintón. Esta disminución en el café estudiado podría estar relacionado a que en los sistemas de fermentación sin agua, este parámetro tiende a disminuir debido a que la densidad del mucílago se reduce por el consumo de los microorganismos en esta etapa. Lo que indicaría actividad

microbiológica desde antes de la inoculación. Además, se presentaron diferencias estadísticas entre el primer y último día de fermentación en donde los grados Brix se redujeron de 12% a 8.3%. Haile y Kang (2019c) mencionaron que durante fermentación los azúcares tienden a disminuir debido a la formación de metabolitos que llevan al desarrollo de características organolépticas.

Cuadro 6

Valores de grados Brix, pH y porcentaje de humedad durante la fermentación del café lavado Geisha

Tratamiento ¹	°Brix ²		pH	
	DIA1	DIA3	DIA1	DIA3
Inóculo con <i>Pichia sp. nativa</i>	12.1 ± 0.39 ^{ax}	8.8 ± 0.29 ^{by}	4.5 ± 0.59 ^{ax}	3.5 ± 0.03 ^{ay}
Inóculo con <i>Saccharomyces sp. nativa</i>	12.1 ± 0.13 ^{ax}	8.7 ± 0.35 ^{by}	4.3 ± 0.12 ^{ax}	3.6 ± 0.06 ^{ay}
Inóculo control	12.0 ± 0.08 ^{ax}	7.6 ± 0.47 ^{ay}	4.2 ± 0.12 ^{ax}	3.7 ± 0.09 ^{ay}
C.V (%) ³	2.05	4.56	8.1	1.55

Nota. ¹ Cultivo iniciador para cada tratamiento. ² Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

³ Coeficiente de variación. ^{a-d} Valores seguidos de una letra diferente en cada columna representan diferencia estadística entre tratamiento

(P ≤ 0.05). ^{x-z} Valores seguidos de una letra diferente en cada fila indica diferencia estadística entre medidas repetidas en el tiempo (P ≤ 0.05).

Algo importante a observar es que dentro del tercer día de fermentación, el inóculo comercial presentó diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el que menor porcentaje de sólidos solubles presentaba en esta etapa. Este resultado apoya la idea de C. L. Ramos et al. (2014) quien observó la rapidez fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual consumía los carbohidratos provenientes del mucílago del cacao en menor tiempo para lograr la producción de etanol. Lo que permite inferir que el tratamiento con el inóculo comercial metabolizó rápidamente los azúcares para la producción de mayores componentes químicos importantes para la competición de la levadura. De igual manera, revisando la descripción de esta levadura comercial, se menciona la optimización de *Saccharomyces cerevisiae* para lograr la desmucilagínación de forma más eficiente, mejora en la taza y la consistencia, lo que explicaría su contenido de sólidos solubles más bajo. Otro hallazgo de relevancia en este estudio es que antes de la inoculación, muestras del inóculo comercial fueron observadas y en la misma se determinó la presencia de células tanto de *Saccharomyces sp.* como de *Pichia sp.* Además de presentar lo que podrían ser bacterias, deduciendo que el inóculo comercial está conformado por una mezcla de microorganismos y no solo por un género de levadura. Estos resultados

apoyan aún más la idea de estudios como los de Wang et al. (2020) que sugiere que el uso de múltiples cepas como inoculantes, podría resultar en mejorar las actividades individuales de las mismas, aportando a la parte sensorial del café.

pH

El modelo estadístico indicó que no se presentaron diferencias entre tratamientos. Sin embargo, en cuanto a los días de toma de muestra se presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) (Cuadro 6). En este parámetro se pudo observar el mismo comportamiento que con los sólidos solubles, es decir, diferencias significativas entre el primer día y último día de fermentación, comprobando un aumento en la acidez. Esto, debido al incremento de la concentración de los ácidos degradados de la capa del mucílago por los metabolismos de los microorganismos en la fermentación que producen compuestos de relevancia en los atributos sensoriales del café (Martínez et al., 2019). De acuerdo con E. Martínez et al. (2023) los ácidos cítrico, málico, láctico y succínico son de los que presentan mayor concentración al final de la fermentación, es por esto que el pH bajó en el último día de fermentación.

G. Puerta (2012) enfatiza que el mucílago contiene un aproximado de 47.5% de azúcares reductores (fructosa, glucosa, maltosa) y un 29.8% de azúcares no reductores (sacarosa). Tomando en consideración esto, Escalante et al. (2011) concluyó que la especie *Pichia anomala* fermenta correctamente monosacáridos, sucrosa y maltosa. Además, se ha reportado que la especie *Pichia kluyveri* fermenta glucosa y fructosa (Barrera et al., 2013). Siguiendo esta línea, se ha señalado que las cepas del género *Saccharomyces* sp. tienen una gran adaptabilidad a la fermentación, aportando propiedades químicas que contribuyen a la parte sensorial del café, gracias al rendimiento que tienen con la glucosa y fructosa que les permite producir más ácidos orgánicos (Ruta y Farcasanu, 2021). Un resultado a notar es la reducción en mayor proporción de los grados Brix que en el pH, esto debido a que durante los procesos de fermentación el consumo de azúcar es menor en comparación con la producción de ácidos (Aravantinos et al., 1994).

Humedad

Luego de transcurrir los tres días de fermentación, se analizó el porcentaje de humedad, para inferir en la prevalencia de las levaduras. Según el análisis estadístico, el modelo indicó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P \geq 0.05$). De acuerdo con lo observado, el porcentaje de humedad se encontró entre 22.4% y 25.7%. Hay poca evidencia que soporten estos resultados, sin embargo, Jurado et al. (2009) señala que un grano de café, una vez fue lavado, debe contener 53% de humedad. Este aspecto puede estar relacionado a que la fermentación realizada fue del tipo sólida, es decir que no se le agregó agua, lo que pudo provocar la evaporación del contenido de agua en el fruto durante el proceso de fermentación (García, 2016). Para finalizar el procesamiento de este café, se llevó a 11-12% de humedad.

Análisis Sensorial

El modelo estadístico indicó que al menos uno de los tratamientos presentó diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$). Se pudo determinar que entre el inóculo control, con un puntaje de 91.5 y el tratamiento inoculado con *Pichia* sp. nativa, con 91.3, no presentaron diferencias estadísticas entre sí y se consideraron los mejores tratamientos en esta investigación. El tratamiento inoculado con *Saccharomyces* sp. nativa obtuvo el puntaje más bajo en este estudio, pero aun así considerándose un café especial de alta categoría (90.5).

De acuerdo con los atributos calificados durante la catación (Cuadro 7), se determinó que el mejor tratamiento en cuanto aroma y acidez fue el inóculo control con un puntaje de 9.0. En cuanto al sabor no se encontraron diferencias estadísticas entre el inóculo control y el inóculo con *Pichia* sp. nativa, ambos obtuvieron un puntaje de 8.8. En cambio, para el atributo de regusto, el tratamiento inoculado con *Pichia* sp. nativa representó el mejor tratamiento estadísticamente con un puntaje promedio de 8.8. Para el atributo de cuerpo no se encontraron diferencias estadísticas entre los tres tratamientos. En cuanto al balance, *Pichia* sp. nativa representó el mayor puntaje con 8.6. Por último,

el atributo en frío obtuvo el mejor puntaje el inóculo control y el tratamiento inoculado con *Saccharomyces* sp. nativa con 8.6.

Cuadro 7

Resultados del análisis sensorial

Atributos ²	Tratamientos ¹			C.V (%) ³
	Inóculo con <i>Pichia</i> sp. nativa	Inóculo con <i>Saccharomyces</i> sp. nativa	Inóculo control	
Fragancia ⁴	9.9 ± 0.13 ^b	10 ± 0.00 ^a	9.9 ± 0.26 ^b	1.77
Aroma	8.8 ± 0.14 ^b	8.7 ± 0.00 ^c	9.0 ± 0.00 ^a	1.45
Sabor	8.8 ± 0.14 ^a	8.6 ± 0.14 ^b	8.8 ± 0.14 ^a	2.01
Regusto	8.8 ± 0.20 ^a	8.5 ± 0.00 ^c	8.7 ± 0.00 ^b	2.11
Acidez	8.8 ± 0.14 ^b	8.7 ± 0.00 ^c	9.0 ± 0.00 ^a	1.45
Cuerpo	8.8 ± 0.14 ^a	8.7 ± 0.00 ^a	8.7 ± 0.27 ^a	2.01
Balance	8.6 ± 0.14 ^a	8.5 ± 0.00 ^b	8.5 ± 0.00 ^b	1.12
Taza limpia	10 ± 0.00 ^a	10 ± 0.00 ^a	10 ± 0.00 ^a	0.00
Dulzor	10 ± 0.00 ^a	10 ± 0.00 ^a	10 ± 0.00 ^a	0.00
General	8.5 ± 0.14 ^b	8.6 ± 0.00 ^a	8.6 ± 0.14 ^a	1.41
Puntaje final	91.3 ± 0.41 ^a	90.5 ± 0.00 ^b	91.5 ± 0.27 ^a	0.58

Nota. ¹ Cultivo iniciador para cada tratamiento. ² Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

³ Coeficiente de variación. ⁴ Escala de evaluación de 6 a 10 puntos. ^{a-d} Valores seguidos de una letra diferente en cada fila representan diferencia estadística entre tratamiento ($P \leq 0.05$).

El tratamiento control fue calificado con leve cítrico, afrutado, dulce, lima y floral. Estos resultados coinciden con estudios previos donde han mencionado la capacidad aromática de *Saccharomyces cerevisiae* relacionándolo a fragancias de rosas (Sotttil et al., 2019). De acuerdo con A. Pereira et al. (2018) la percepción de los aromas del café dependen de la concentración de ciertos compuestos químicos, por ejemplo, el atributo afrutado lo relaciona al compuesto 2-heptanone y el atributo dulce es relacionado a pyrazine-methyl. De igual manera menciona que la presencia de furanos provee notas herbales o afrutadas. Según con el fabricante del producto utilizado, se utiliza una cepa específica para formular este cultivo iniciador, lo que podría explicar por qué sus atributos marcan mayores compuestos en aroma.

Para el caso de *Pichia* sp. se relacionó con un break flojo, especies, poco herbal, nueces, cítricos, limón, dulce, floral, vainilla y bergamota. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde se menciona que levaduras como *Pichia kluyveri* han demostrado un buen desempeño en la

producción de componentes aromáticos como los ésteres, alcoholes, ácidos y otros compuestos volátiles (Chen et al., 2023). De acuerdo con G. Pereira et al. (2014) mencionó la relación del atributo cítrico a la producción de ésteres durante la fermentación. También, se ha determinado que la acidez funciona como potenciador al dulzor del café (Da Mota et al., 2020). Ciertos de los compuestos que brindan notas frutales y florales durante la fermentación han sido encontrado en niveles elevados durante fermentaciones con *Pichia kluyveri*, como es el caso del octanoato de etilo, el acetato de isoamilo y el hexilo (Delac et al., 2022).

En cuanto al tratamiento inoculado con *Saccharomyces* sp. nativa, se describió como cítrico, canela, limón, poco terroso, floral, herbal, insípido. Ciertos de estos atributos fueron de igual manera encontrados en un estudio similar realizado por Elhalis et al. (2021) en donde la características terrosa estaba relacionada a la presencia de pirasinas, pirroles, piridinas, furanos, fenoles y azufrados consecuentes de la reacción de Maillard durante el tostado. Aunque de acuerdo con Batista et al. (2020) los pirroles y furanos estimulan altas concentraciones cuando se despulpa el café, lo que indica que estos compuestos pudieron haber surgido desde antes de la reacción mencionada. Además, se ha mencionado que este género presenta bajas producciones de compuestos aromáticos, aspecto que sí poseen otras levaduras fermentativas (Cordero et al., 2013). El hecho de que esta cepa no obtuviese resultados similares al inóculo control, pudo ser a que la producción de compuestos aromáticos como alcoholes superiores, ácidos grasos y ésteres en cantidades y proporciones distintas, tienden a depender entre especies y cepas obtenidas de *Saccharomyces cerevisiae* (Vejarano y Calderón, 2021).

Fase III. Efecto de las Levaduras Nativas en las Características Químicas del Café

Análisis Químicos

Flavonoides Totales.

Los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran distribuidos en el reino vegetal y se ha demostrado su efecto antioxidante (Ochoa y Ayala, 2004). De acuerdo con Ramirez et al. (2011) la concentración de estos compuestos dependen de la variedad, origen del grano, suelo, condiciones

del ambiente y aspectos genéticos del cultivo. Para este estudio se analizaron los dos tratamientos con mejores evaluaciones sensoriales, inóculo control y el inóculo con *Pichia* sp. nativa. Sin embargo, de acuerdo con el modelo estadístico no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos ($P \geq 0.05$) (Cuadro 8).

El contenido de flavonoides en el café Geisha lavado con el tratamiento del inóculo con *Pichia* sp. fue en promedio de 39.2 mg equivalentes de catequina/g de café tostado y 41.6 mg equivalentes de catequina/g de café tostado para el tratamiento del inóculo control. De acuerdo con el estudio realizado por Vega et al. (2017), quien analizaba el contenido total de flavonoides de cafés puros comerciales de Panamá, determinó que los cafés Geisha grado de exportación, presentaban un contenido de flavonoides promedio de 34.64 mg equivalentes de catequina/g de café tostado. Esto indica que los tratamientos realizados en este estudio presentaron contenidos superiores dentro de la misma variedad y país.

Cuadro 8

Contenido de flavonoides y polifenoles totales de los mejores tratamientos, expresados en mg equivalentes a catequina/g de café tostado (mg EC/g café) y mg equivalentes a ácido gálico/g de café tostado (mg EAG/g café) respectivamente

Tratamiento ¹	Flavonoides (mg EC/g café) ²	Polifenoles (mg EAG/g café)
Inóculo con <i>Pichia</i> sp. nativa ⁴	39.2 ± 3.17	33.1 ± 2.85
Inóculo control	41.6 ± 0.86	33.1 ± 1.55
C.V (%) ³	4.69	7.04

Nota. ¹ Cultivo iniciador para cada tratamiento. ² Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

³ Coeficiente de variación. ⁴ Valores sin letras indican que no hubo diferencias entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

Esas diferencias pueden explicarse por el nivel de tostado realizado a cada café. Según Hečimović et al. (2011) el tostado tiene un efecto en los resultados de flavonoides totales, siendo el tostado ligero y el mediano los más favorecidos en preservar estos compuestos, mientras los que presentaban mayor tostado, presentaban bajo contenido de flavonoides. Información que concuerda con este estudio debido a que, como se mencionó en la metodología, estos cafés fueron llevados a 58

en la escala Agtron, lo que es considerado un tostado ligero a medio (Specialty Coffee Association, 1996). Además, estos contrastes pueden deberse a que se ha demostrado que en fermentaciones con levaduras específicas inoculadas en café, hay una mejoría en el contenido total de flavonoides hasta cierto punto de la fermentación (Haile y Kang, 2019a). Esto puede deberse a la conversión de los compuestos fenólicos insolubles en flavonoides solubles por parte de las levaduras utilizadas en este estudio, inóculo control y el inóculo con *Pichia* sp. nativa (Lee et al., 2012). Además, se ha mencionado que la producción de ácidos durante la fermentación provocan la liberación de componentes flavonoides unidos y los pasan a ser biodisponibles, lo que provoca un aumento en su concentración (Adetuyi y Ibrahim, 2014).

Polifenoles Totales.

Los polifenoles con moléculas del metabolismo de las plantas, y cuentan con variaciones en su concentración dependiendo del grado de madurez, composición del suelo, localización y condiciones ambientales donde se encuentre el fruto (Avilés et al., 2017).

El modelo estadístico no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos ($P \geq 0.05$) (Cuadro 8). El contenido de polifenoles totales en el café Geisha lavado para el tratamiento del inóculo con *Pichia* sp. fue en promedio de 33.1 mg equivalentes de ácido gálico/g de café tostado para ambos. Vega et al. (2017) demostró que los polifenoles totales del café de la variedad Geisha fueron superiores en comparación a cafés de otras variedades evaluadas en su estudio, siendo de un promedio de 42.19 mg equivalentes a ácido gálico/g de café tostado. Además, en la publicación de Haile y Kang (2019a) en donde se evaluó el efecto de las fermentaciones con levaduras específicas en el contenido de polifenoles totales, se observó como el café que fue fermentado con inóculo tuvo concentraciones mayores de estos compuestos que el café que no fue inoculado. Sin embargo, en el presente estudio se presentaron concentraciones menores, diferencia que pudo estar relacionada a que en la fermentación los polifenoles son hidrolizados a más simples, lo que causa que se extraigan de forma más sencilla en el tostado, esto producido por acción de las enzimas proteolíticas del cultivo

iniciador (Ademiluyi y Oboh, 2011). Lo que lleva a inducir que las levaduras del inóculo control y el inóculo con *Pichia* sp. nativa utilizadas en este estudio, son productoras de enzimas pécticas, factor importante en la degradación del mucílago del café durante las fermentaciones y producción de metabolitos. Otro punto importante en la concentración del contenido de polifenoles totales, es que pudo influir el hecho de que la fermentación en este estudio fue mayor a 48 horas y según esta misma publicación de Haile y Kang (2019a), la concentración de polifenoles totales, empezaba a decrecer luego de este tiempo.

Otro aspecto relevante en esta sección es que tanto el contenido de flavonoides y polifenoles actúan como factor determinante en las características sensoriales. Según el estudio realizado por Stanek et al. (2021) a mayor temperatura de preparación del café, más altos los contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides totales, lo que provocó mayor aroma, sabores intensos, regusto dulce, acidez, equilibrio y mayores puntuaciones generales debido a que los ácidos y aceites fenólicos se degradan y oxidan más rápido.

Actividad Antioxidante.

La actividad antioxidante es de relevancia en el estudio del café ya que funciona como indicador a la presencia de compuestos antioxidantes de importancia en el aporte de características sensoriales, como es el caso de los ácidos clorogénicos (Kamiyama et al., 2015). Para este ensayo se analizaron los dos tratamientos con mejores evaluaciones sensoriales, inóculo control y el inóculo con *Pichia* sp. nativa. Sin embargo, de acuerdo con el modelo estadístico no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos para la actividad antioxidante y el porcentaje de inhibición ($P \geq 0.05$) (Cuadro 9).

De acuerdo con Fukushima et al. (2009) la actividad antioxidante está fuertemente correlacionada con los contenidos de polifenoles totales. Según lo discutido en la sección de polifenoles totales, esto explicaría la baja actividad antioxidante y por lo tanto, sus bajos porcentajes de inhibición en ambos tratamientos. Hay poca literatura al respecto en cuanto al café tostado, sin

embargo, Jiménez et al. (2012) demostró presentar alta capacidad antioxidante con un porcentaje de inhibición al 50%, esto relacionado al tipo de extracción realizada al café y a su país de procedencia.

Cuadro 9

Actividad antioxidante en mg equivalentes a ácido gálico/g de café tostado (mg EAG/g café) y porcentaje de inhibición

Tratamiento ¹	Actividad antioxidante (mg EAG/g café) ²	Porcentaje de inhibición
Inóculo con <i>Pichia</i> sp. nativa ⁴	13.6 ± 0.27	38.8 ± 0.83
Inóculo control	14.3 ± 0.15	40.8 ± 0.44
C.V (%) ³	3.54	2.14

Nota. ¹ Cultivo iniciador para cada tratamiento. ² Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

³ Coeficiente de variación. ⁴ Valores sin letras indican que no hubo diferencias entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

De acuerdo a A. Pereira et al. (2018) el uso de *Saccharomyces cerevisiae* como inóculo brindó altas concentraciones de compuestos antioxidantes como los ácidos clorogénicos en el café. De igual forma, *Pichia kudriavzevii* (S R et al., 2022), sin embargo, también se ha demostrado que la mezcla de estas levaduras producen mayor actividad antioxidante (Liu et al., 2023). Cabe mencionar que en ninguno de estos estudios se hace el análisis control sin las inoculaciones, lo que podría no comprobar el efecto del uso de levaduras en las características química del café.

Conclusiones

Se logró identificar 13 morfoespecies de levaduras, pertenecientes a seis géneros. *Pichia* sp. fue el género más predominante en el café Geisha natural estudiado, demostrando la diversidad de estas durante el proceso de fermentación y secado.

Se observó la presencia del género *Candida* sp. durante el procesamiento del café lavado Geisha, a pesar de no ser inoculado.

Se demostró que las levaduras nativas provenientes del mosto del café Geisha tienen el potencial de mejorar la calidad sensorial del mismo.

Se determinó que la diversidad de levaduras no tuvo influencia en el contenido de flavonoides, polifenoles totales y la actividad antioxidante del café lavado Geisha.

Recomendaciones

Realizar prueba de Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación para corroborar la identidad de las levaduras estudiadas.

Aumentar la concentración de células viables a inocular, con el objetivo de verificar su efecto en la calidad sensorial.

Hacer el mismo estudio con variedades de Geisha sometidas a diferentes condiciones ambientales y geográficas.

Formular mezclas de levaduras nativas para determinar su aporte al desarrollo en la calidad del café.

Referencias

- Ademiluyi, A. y Oboh, G. (2011). Antioxidant properties of condiment produced from fermented bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc). *Journal of Food Biochemistry*, 35(4), 1145–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00441.x>
- Adetuyi, F. O. y Ibrahim, T. A. (2014). Effect of fermentation time on the phenolic, flavonoid and vitamin C contents and antioxidant activities of okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. *Nigerian Food Journal*, 32(2), 128–137. [https://doi.org/10.1016/S0189-7241\(15\)30128-4](https://doi.org/10.1016/S0189-7241(15)30128-4)
- Andrews, W. y Hammack, T. (2022). BAM Chapter 1: Food sampling/preparation of sample homogenate. *Food and Drug Administration (FDA)*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-1-food-sampling-preparation-sample-homogenate>
- Aravantinos, G., Tzia, C., Oreopoulou, V. y Thomopoulos, C. D. (1994). Fermentation of orange processing wastes for citric acid production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(1), 117–120. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740650117>
- Avilés, E., Figueroa, I., Martínez, E., Bartolomé, M., Martínez, H. y García, M. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*(16), 15–29. <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/quimica/article/view/1583>
- Barrera, J., Cordón, J., Coronel, A., Fernández, C. y Santos, C. (2013). Cepa de *Pichia kluyveri* y sus aplicaciones(2 382 843). España. <https://patentimages.storage.googleapis.com/67/f4/31/93cf16918a614a/ES2382843B1.pdf>
- Batista, M., Batista, N., Sances, M., Ribeiro, D., Borém, F. y Schwan, R. (2020). Influence of fermentation conditions on the sensorial quality of coffee inoculated with yeast. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 136, 109482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109482>
- Carvalho Neto, D., Melo Pereira, G. de, Tanobe, V., Thomaz Soccol, V., Da G. Silva, B., Rodrigues, C. y Soccol, C. (2017). Yeast diversity and physicochemical characteristics associated with coffee bean fermentation from the Brazilian cerrado Mineiro region. *Fermentation*, 3(1), 11. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010011>
- Chen, L., Li, K., Chen, H. y Li, Z. (2023). Reviewing the source, physiological characteristics, and aroma production mechanisms of aroma-producing yeasts. *Foods*, 12(18), 3501. <https://doi.org/10.3390/foods12183501>
- Cordero, G., Esteve, B., Cabellos, J. M., Gil, M. y Arroyo, T. (2013). Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *European Food Research and Technology*, 236(1), 193–207. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1874-9>
- Corrales, L., Antolínez, D., Bohórquez, J. y Corredor, A. (2015). Bacterias aerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 13(23), 55–81. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n24/v13n24a06.pdf>
- Cruz-O'Byrne, R., Piraneque-Gambasica, N. y Aguirre-Forero, S. (2021). Microbial diversity associated with spontaneous coffee bean fermentation process and specialty coffee production in northern Colombia. *International Journal of Food Microbiology*, 354, 109282. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109282>

Da Mota, M. C. B., Batista, N. N., Rabelo, M. H. S., Ribeiro, D. E., Borém, F. M. y Schwan, R. F. (2020). Influence of fermentation conditions on the sensorial quality of coffee inoculated with yeast. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 136, 109482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109482>

Da Silva, A., Balla, G., Rodrigues, L. R. S., Carvalho Neto, D. P. de, Soccol, C. R. y Melo Pereira, G. V. de (2022). Understanding the effects of self-induced anaerobic fermentation on coffee beans quality: Microbiological, metabolic, and sensory studies. *Foods*, 12(1), 37. <https://doi.org/10.3390/foods12010037>

Da Silva, A., Melo Pereira, G. V. de, Carvalho Neto, D. P. de, Rodrigues, C., Pagnoncelli, M. G. B. y Soccol, C. R. (2019). Effect of co-inoculation with *Pichia fermentans* and *Pediococcus acidilactici* on metabolite produced during fermentation and volatile composition of coffee beans. *Fermentation*, 5(3), 67. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030067>

D'Amore, T., Russell, I. y Stewart, G. (1989). Sugar utilization by yeast during fermentation. *Journal of Industrial Microbiology*, 4(4), 315–324. <https://doi.org/10.1007/BF01577355>

Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C. y Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, 14(6), 826–832. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12161>

Deak, T. (2007). *Handbook of food spoilage yeasts*. CRC Press.

Delac, D., Horvat, I., Hranilovic, A., Plavska, T., Radeka, S., Pakovic, I. y Lukic, I. (2022). Diversity of volatile aroma compound composition produced by non- *Saccharomyces* yeasts in the early phase of grape must fermentation. *Foods*, 11(19), 3088. <https://doi.org/10.3390/foods11193088>

Delgado, J., Triboletti, S., Alessandria, V., Serio, A., Sergi, M., Paparella, A., Rantsiou, K. y Chaves-López, C. (2020). Functional biodiversity of yeasts isolated from colombian fermented and dry cocoa beans. *Microorganisms*, 8(7), 1086. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071086>

Díaz, C., Molina, A. M., Nähring, J. y Fischer, R. (2013). Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae. *BioMed Research International*, 2013, 540465. <https://doi.org/10.1155/2013/540465>

Elhalis, H., Cox, J., Frank, D. y Zhao, J. (2021). Microbiological and chemical characteristics of wet coffee fermentation inoculated with *Hansinasporea uvarum* and *Pichia kudriavzevii* and their impact on coffee sensory quality. *Frontiers in Microbiology*, 12, 713969. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713969>

Elhalis, H., Cox, J. y Zhao, J. (2020). Ecological diversity, evolution and metabolism of microbial communities in the wet fermentation of Australian coffee beans. *International Journal of Food Microbiology*, 321, 108544. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108544>

Escalante, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E. y Hatta, B. (2011). Estudio de la actividad fermentativa de *Hansenula anomala* y producción de compuestos químicos de importancia sensorial. *Revista Peruana De Biología*, 18(3). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332011000300010

Evangelista, S., Da Cruz, M., Ferreira, C., Marques, A. y Freitas, R. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>

Evangelista, S., Da Cruz, M., Souza, C. de, Ferreira, C., Marques, A. y Freitas, R. (2014). Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Food Microbiology*, 44, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.013>

Evangelista, S., Ferreira, C., Pedrozo, M., Souza, C. de, Marques, A., Ferreira, W. y Freitas, R. (2013). Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*, 61, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.033>

Fukushima, Y., Ohie, T., Yonekawa, Y., Yonemoto, K., Aizawa, H., Mori, Y., Watanabe, M., Takeuchi, M., Hasegawa, M., Taguchi, C. y Kondo, K. (2009). Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1253–1259. <https://doi.org/10.1021/jf802418j>

García, A. (2016). *Marco conceptual sobre la influencia de la temperatura, humedad relativa en la fermentación sólida del grano de café arábica sobre el contenido del ácido 5-o-cafeoilquinico* [Tesis de maestría]. Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín. <https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/3150/Marco%20conceptual%20sobre%20la%20influencia%20de%20la%20temperatura%20y%20la%20humedad%20relativa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

González, A. (2021). *Análisis teórico de las fases de crecimiento de Saccharomyces cerevisiae con mediación de las tecnologías del aprendizaje y el conocimiento* [Tesis de maestría]. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia. <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/5602/AN%C3%81LISIS%20TE%20C%93RICO%20DE%20LAS%20FASES%20DE%20CRECIMIENTO%20DE%20SACCHAROMYCES%20CEREVISIAE%20CON%20MEDIACION%20DE%20LAS%20TECNOLOG%C3%8DAS%20DEL%20APRENDIZAJE%20Y%20EL%20CONOCIMIENTO.docx.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Guimarães, E., Castro, L. de y Carvalho, H. (2016). A terceira onda do café em Minas Gerais. *Revista Organizações Rurais & Agroindustriais*, 18(3). <http://www.revista.dae.ufla.br/index.php/ora/article/view/1108>

Haile, M. y Kang, W. (2019a). Antioxidant activity, total polyphenol, flavonoid and tannin contents of fermented green coffee beans with selected yeasts. *Fermentation*, 5(1), 29. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010029>

Haile, M. y Kang, W. (2019b). Isolation, identification, and characterization of pectinolytic yeasts for starter culture in coffee fermentation. *Microorganisms*, 7(10), 401. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100401>

Haile, M. y Kang, W. (2019c). The role of microbes in coffee fermentation and their impact on coffee quality. *Journal of Food Quality*, 2019(4836709). <https://doi.org/10.1155/2019/4836709>

Hečimović, I., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D. y Komes, D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, 129(3), 991–1000. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.059>

Jeszka-Skowron, M., Sentkowska, A., Pyrzyńska, K. y Peña, M. P. de (2016). Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: Influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1403–1409. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2643-y>

Jiménez, A., Sánchez, M. y Martínez, M. (2012). Optimización del método captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café. *Anales De Veterinaria De Murcia*, 28, 67–78. <https://doi.org/10.6018/j/188731>

Jurado, J., Montoya, E., Oliveros, C. y García, J. (2009). Método para medir el contenido de humedad del café pergamino en el secado solar. *Centro Nacional De Investigaciones De Café*, 60(2), 135–147. <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc060%2802%29135-147.pdf>

Kamiyama, M., Moon, J.-K., Jang, H. W. y Shibamoto, T. (2015). Role of degradation products of chlorogenic acid in the antioxidant activity of roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 1996–2005. <https://doi.org/10.1021/jf5060563>

Lallemant Inc. (2019). Lalcafé ORO. Canadá. Lallemant. <https://www.lalcafeyeast.com/en/products/lalcafe-oro/>

Lee, K., Lee, S. I., Kim, J. S., Yang, H. S., Lee, I. A., Kim, S. D. y Suh, J. W. (2012). Antioxidant activity of green tea fermented with *Monascus pilosus*. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 55(1), 19–25. <https://doi.org/10.3839/jabc.2011.054>

Liu, W., Ji, R., Aimaier, A., Sun, J [Jinkui], Pu, X., Shi, X., Cheng, W. y Wang, B. (2023). Adjustment of impact phenolic compounds, antioxidant activity and aroma profile in Cabernet Sauvignon wine by mixed fermentation of *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry: X*, 18, 100685. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100685>

Machado, T., Pereira, M., Anastácia, L., Borchardt, V., Gomes, T., Soares, M., Megmuni, M., Moreli, A. y Pereira, L. (2019). Isolamento e contagem da microbiota da casca e polpa do fruto de café (*Coffea arabica* L.) em dois estágios de desenvolvimento. *X Simpósio De Pesquisa Dos Cafés O Brasil*, 1984–9249. <http://www.consorciopesquisacafe.com.br/ojs/index.php/SimpósioCafe2019/article/view/482/432#>

Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

Marques, D., Pereira, G., Ferreira, C., Batista, L. y Freitas, R. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27, 1128–1135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>

Martinez, E., Machado, P., Oliveira, A. de [Ana], Batista, N., Franco, S., Ribeiro, D [Disney] y Freitas, R. (2023). Influence of anaerobic fermentation and yeast inoculation on the viability, chemical composition, and quality of coffee. *Food Bioscience*, 51, 102218. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102218>

Martinez, S. J., Bressani, A. P. P., Dias, D. R., Simão, J. B. P. y Schwan, R. F. (2019). Effect of bacterial and yeast starters on the formation of volatile and organic acid compounds in coffee beans and selection of flavors markers precursors during wet fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1287. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01287>

Martínez, S., Pereira, A., Ribeiro, D [Disney], Pavesi, J. y Freitas, R. (2019). Effect of bacterial and yeast starters on the formation of volatile and organic acid compounds in coffee beans and selection of flavors markers precursors during wet fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10, Artículo 1287. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01287>

Martins, V., Costa, L., Soares, R., Ayogu, P., Teixeira, A. y Gerós, H. (2022). A catalogue of cultivable yeasts from the microbiota of grape berries cv. Vinhão and Loureiro. *OENO One Vine and Wine*, 56(3), 247–260. <https://doi.org/10.20870/oenone.2022.56.3.5462>

Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L. y Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast (Chichester, England)*, 21(7), 549–556. <https://doi.org/10.1002/yea.1124>

Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G. y Verstrepen, K. J. (2016). Tuning chocolate flavor through development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures with increased acetate ester production. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 732–746. <https://doi.org/10.1128/AEM.02556-15>

Ochoa, C. y Ayala, A. (2004). Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. *Ingeniería Y Competitividad*, 6(2). <https://doi.org/10.25100/iyc.v6i2.2280>

Oliveira, A. de [A.], Melo Pereira, G., Medina, J., Alvear, M., Rosero, R., Carvalho, D. de, Enríquez, H. y Soccol, C. (2019). First description of bacterial and fungal communities in Colombian coffee beans fermentation analysed using Illumina-based amplicon sequencing. *Scientific Reports*, 9, 8794. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45002-8>

Pereira, A., Martínez, S., Reis, S., Ribeiro, D [Disney] y Freitas, R. (2018). Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. *LWT-Food Science and Technology*, 92, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.029>

Pereira, G., Da Miguel, M. G. C. P., Ramos, C. L. y Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5395–5405. <https://doi.org/10.1128/AEM.01144-12>

Pereira, G., Soccol, V., Pandey, A., Medeiros, A., Andrade, J., Gollo, A. y Soccol, C. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>

Pereira, T., Batista, N., Santos, L., Martinez, S., Ribeiro, L., Oliveira, J. y Schwan, R. (2022). Self-induced anaerobiosis coffee fermentation: Impact on microbial communities, chemical composition and sensory quality of coffee. *Food Microbiology*, 103, 103962. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103962>

Péter, G., Takashima, M. y Čadež, N. (2017). Yeast habitats: Different but global. En *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology* (pp. 39–71). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2_2

Puerta, G. (Ed.). (2012). *Ciencia, tecnología e innovación para la caficultura colombiana. Factores, procesos y controles en la fermentación de café.*

Puerta, G. y Ríos, S. (2011). Composición química del mucílago del café según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Centro Nacional De Investigaciones De Café*, 62(2), 23–40. <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/478/1/arc062%2802%2923-40.pdf>

Puerta, Q., Marin, J. y Osorio, B. (2015). Microbiología de la fermentación del mucílago de café según su madurez y selección. *Cenicafé*, 63(2), 58–78. <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/536>

Ramirez, M., Plaza, M. L., Azeredo, A., Balaban, M. O. y Marshall, M. R. (2011). Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science*, 76(3), C428-35. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02091.x>

Ramos, C. L., Dias, D. R., Da Miguel, M. G. C. P. y Schwan, R. F. (2014). Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. Cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 64, 908–918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>

Ramos, L., Mokus, L., Frota, H. F., Santos, M. V., Oliveira, S. S. C., Oliveira, M. M. E., Costa, G. L., Alves, A. L., Bernardes-Engemann, A. R., Orofino-Costa, R., Aor, A. C., Branquinha, M. H. y Santos, A. L. S. (2023). Sars-CoV-2 Post-infection and sepsis by *Saccharomyces cerevisiae*: A fatal case report-focus on fungal susceptibility and potential virulence attributes. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(2), 99. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020099>

Ribeiro, L. S., Da Miguel, M. G. C. P., Evangelista, S. R., Martins, P. M. M., van Mullem, J., Belizario, M. H. y Schwan, R. F. (2017). Behavior of yeast inoculated during semi-dry coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final beverage. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 92, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.011>

Ricci, A., Teslic, N., Petropolus, V.-I., Parpinello, G. P. y Versari, A. (2019). Fast analysis of total polyphenol content and antioxidant activity in wines and oenological tannins using a flow injection system with tandem diode array and electrochemical detections. *Food Analytical Methods*, 12(2), 347–354. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1366-z>

Ruta, L. y Farcasanu, I. (2021). Coffee and yeasts: from flavor to biotechnology. *Fermentation*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010009>

S R, S., HP, S., Prakash, I., Khan, M., H N, P. K., Om, H., Basavaraj, K. y Murthy, P. S. (2022). Microbial ecology and functional coffee fermentation dynamics with *Pichia kudriavzevii*. *Food Microbiology*, 105, 104012. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104012>

Salfinger, Y. y Tortorello, M. L. (Eds.). (2015). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (5^a ed.). American Public Health Association. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222>

Secretaría de Salud; Secretaría de medio ambiente, recursos naturales y pesca; Instituto Politécnico Nacional (1994). *Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. (Norma, NOM-111-SSA1-1994). México, D.F.

Silva, C., Marques, D., Souza, C. de, Ferreira, W., Ribeiro, D [Disney] y Freitas, R. (2013). Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*(29), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1175-2>

Silva, C., Schwan, R., Sousa, E. y Wheals, A. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)

Singleton, V., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Smets, B., Ghillebert, R., Snijder, P. de, Binda, M., Swinnen, E., Virgilio, C. de y Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: Adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 56(1), 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0287-1>

Soderberg, D. (Ed.). (2006). *Meat and meat products: AOAC official method 950.46.b: Moisture in meat* (22^a ed.). Association of Analytical Communities.

https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/QAD%20610E%20Exhibit_AOAC%20Official%20Method.pdf

Sottil, C., Salor, J., Moreno, J [Jaime], Moreno, J [Juan] y Gracia, T. (2019). Using *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. *European Food Research and Technology*, 245, 2705–2714. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03384-z>

Specialty Coffee Association. (1996). *Bean roast level*. https://www.specialtycoffee.com.hk/index.php?option=com_content&view=article&id=3&lang=en

Specialty Coffee Association. (2015). *SCAA Protocols: Cupping specialty coffee*. SCAA. <https://www.scaa.org/PDF/resources/cupping-protocols.pdf>

Stanek, N., Zarębska, M., Biłos, Ł., Barabosz, K., Nowakowska-Bogdan, E., Semeniuk, I., Błaszkiwicz, J., Kulesza, R., Matejuk, R. y Szkutnik, K. (2021). Influence of coffee brewing methods on the chromatographic and spectroscopic profiles, antioxidant and sensory properties. *Scientific Reports*, 11(1), 21377. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01001-2>

Toledo, D. (Ed.). (2020). *Coffee: production and research*. IntechOpen.

Tournas, V., Stack, M., Mislivec, P., Koch, H. y Bandler, R. (1998). BAM chapter 18: yeasts, molds and mycotoxins. En Food & Drug (Ed.), *Bacteriological Analytical Manual. Bacteriological Analytical Manual (BAM)* (8^a ed.). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>

Trandafir, I., Nour, V. y Ionica, M. E. (2013). Antioxidant capacity, phenolic acids and caffeine contents of some commercial coffees available on the Romanian market. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*, 63(1), 87–94. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24167962/>

Tucker, C. (2018). *Coffee culture: local experiences, global connections* (2^a ed.). Routledge. <https://www.book2look.com/embed/9781317392248>

Vaughan, M., Mitchell, T. y McSpadden, B. (2015). What's inside that seed we brew? A new approach to mining the coffee microbiome. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01933-15>

Vega, A., León, J. de y Reyes, S. (2017). Determinación del contenido de polifenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante de 34 cafés comerciales de Panamá. *Información Tecnológica*, 28(4). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000400005>

Vejarano, R. y Calderón, A. (2021). Commercially available non-*Saccharomyces* yeasts for winemaking: current market, advantages over *Saccharomyces*, biocompatibility, and safety. *Fermentation*, 7(3), 171. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030171>

Vilela, D., Pereira, Gilberto Vinícius de M., Silva, C. F., Batista, L. R. y Schwan, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128–1135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>

Virgilio, C. de (2012). The essence of yeast quiescence. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 306–339. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00287.x>

Wang, C., Sun, J [Jingcan], Lassabliere, B., Yu, B. y Liu, S. Q. (2020). Coffee flavour modification through controlled fermentation of green coffee beans by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia*

kluyveri: Part II. Mixed cultures with or without lactic acid bacteria. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 136, 109452. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109452>

Wolfe, K., Wu, X. y Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 609–614. <https://doi.org/10.1021/jf020782a>

Wulan, R., Astuti, R. I., Rukayadi, Y. y Meryandini, A. (2021). Evaluation of indigenous *Pichia kudriavzevii* from cocoa fermentation for a probiotic candidate. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(3). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220331>

Zhang, S., Zoerkler, N., Genevaz, A., Roubaty, C., Pollien, P., Bordeaux, M., Mestdagh, F. y Moccand, C. (2023). Unlocking the aromatic potential of native coffee yeasts: from isolation to a biovolatile platform. *J. Agric. Food Chem.*, 71, 4665–4674. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08263>

Zhishen, J., Mengcheng, T. y Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

Anexos

Anexo A

Resultados microscópicos de las morfoespecies estudiadas

