

**EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN CONTROLADA DEL GRANO DE
CAFÉ EMPLEANDO LEVADURAS MICROENCAPSULADAS POR MÉTODO
DE EXTRUSIÓN**



Autores:

DAIRO BOLAÑOS CARDONA

SANTIAGO ROJAS SALAZAR

Directora:

CRISTINA RAMÍREZ TORO Ph.D.

Codirector:

JOSE LUIS PLAZA DORADO Ph.D.

Grupo de Investigación: MIBIA

Universidad del Valle

Facultad de Ingeniería

Escuela de Alimentos Programa de Ingeniería de Alimentos

Cali – Colombia

2023

DEDICATORIA

Primeramente, quiero agradecer a Dios por permitirme haber llegado hasta aquí; a pesar de las crisis y dificultades siempre me mantuvo firme con su entusiasmo, misericordia y bondad, poniendo siempre a las personas correctas para guiarme en este propósito y no decaer.

A mis padres, Dario y Elsa, por ser esos promotores de vida, de seguir luchando sin importar los problemas y ser mi apoyo y sustento en todo momento. Gracias por su esfuerzo, paciencia y motivación ya que sin ustedes no hubiera sido posible ser lo que soy ahora, también a enseñarme infinidad de valores que me forman como persona y por depositar esa confianza en mí.

A mi hermana Lina, por ser ese ejemplo que seguir, ser mi apoyo e inspiración de que no hay que dejarse vencer a pesar de los obstáculos y demostrarme que todo es posible si uno se lo propone.

A mi abuela Sabina y a mis tíos Martha y Alberto, por su paciencia, motivación y consejos, enseñándome que hay que seguir con los propósitos que uno se propone.

A Valeria Girón por estar siempre ahí, dándome apoyo moral cuando más lo necesitaba y no dejarme decaer.

Todo ese apoyo incommensurable de ustedes hoy ha dado sus frutos y por eso quiero dedicarles este logro.

Dairo Bolaños Cardona

Dedico este trabajo de grado a mi familia, no sin antes, agradecerle a Dios por darme la oportunidad de culminarlo, el cual me ha permitido ser lo que soy hoy en día, guiándome por el camino de la bondad y misericordia, sin su gracia y orientación este logro no sería posible.

Con gratitud y aprecio dedico este trabajo a mis padres Eliecer y Eliana, por el apoyo incondicional y la influencia académica, sus consejos, amor y sacrificio han sido el motor de mi motivación y perseverancia.

También quiero expresar este agradecimiento a mi madrina Alina y a mis hermanos Víctor y Antonio, quienes siempre estuvieron a mi lado brindando ánimo y aliento cuando más lo necesitaba.

A mis directores de tesis, los profesores Cristina Ramírez y José Luis Plaza, le agradezco sus paciencia, sabiduría y orientación constante durante todo el proceso de investigación. Sus conocimientos y dirección fueron cruciales para llevar a cabo este trabajo de manera exitosa.

Este trabajo de grado es el resultado colectivo y el apoyo de muchas personas especiales en mi vida. Gracias a todos por ser parte de este logro.

Santiago Rojas Salazar

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría expresar nuestra más sincera gratitud a la Universidad del Valle, por permitirnos llevar a cabo este proyecto de investigación. También por su formación académica excepcional, el cual moldeó nuestro carácter y nos preparó para convertirnos en ciudadanos comprometidos en beneficio de la sociedad.

En este sentido, deseamos manifestar nuestro más sincero agradecimiento al grupo de investigación MIBIA, que contribuyeron de manera significativa a la realización de la investigación. Su apoyo, orientación y colaboración han sido esenciales para el éxito de este proyecto.

De igual manera en esta travesía académica, hemos tenido el privilegio de contar con la valiosa guía de nuestros distinguidos profesores Cristina Ramírez y José Luis Plaza y demás profesores, egresados y estudiantes, que cuya experiencia y conocimiento han sido un faro en cada paso de nuestro camino. Sus consejos y direcciones han sido fundamentales para superar los desafíos que se presentaron.

También queremos agradecer, el inmenso apoyo brindado por nuestros padres, familiares y amigos, quienes han estado de nuestro lado ofreciendo su apoyo incondicional y aliento constante.

En conjunto, estas personas han sido pilares fundamentales en nuestro viaje académico y profesional. Les estamos sinceramente agradecidos por su confianza, amistad y compromiso.

Tabla de contenido

Resumen	11
1. Introducción.....	13
2. Planteamiento del Problema	16
3. Justificación.....	18
4. Objetivos.....	19
4.1. Objetivo General.....	19
4.2. Específicos	19
5. Hipótesis	20
6. Marco teórico.....	20
6.1 Generalidades del café	20
6.1.1 Fisiología del cultivo.....	20
6.1.2 Morfología del fruto	21
6.2 Cafés especiales	22
6.2.1 Cafés de origen.....	22
6.2.2 Cafés sostenibles	23
6.2.3 Cafés de preparación	23
6.3 Fermentación del café	23
6.3.1 Sistemas de fermentación del café	24
6.3.2 Microorganismos asociados a la fermentación del café.....	24
6.4 Microencapsulación	29
7. Antecedentes.....	31

8. Materiales y métodos.....	35
8.1 Materiales.....	35
8.1.1 Cultivos Iniciadores.....	35
8.1.2 Medios de cultivo y mantenimiento de los microorganismos.....	35
8.1.3 Materiales de Microencapsulación.....	37
8.1.4 Materia prima	37
8.2 Métodos	37
8.2.1 Pruebas preliminares para la elaboración del inóculo iniciador.....	37
8.2.2 Inhibición de hongos	39
8.2.3 Elaboración de microencapsulado.....	40
8.2.4 Caracterización del microencapsulado.....	41
8.2.5 Fermentación del café y porcentaje de inóculo.....	42
8.2.6 Parámetros de fermentación	43
8.2.7 Pruebas estadísticas	45
9. Análisis de resultados	45
9.1 Cinética de crecimiento	45
9.1.2 pH.....	47
9.1.3 ° Brix, azúcares totales y reductores	48
9.2 Inhibición de hongos.....	50
9.3 Microencapsulado (<i>M. caribbica</i>):	52
9.4. Parámetros de fermentación.....	58

FERMENTACION DEL GRANO DE CAFÉ 6

9.4.1 ° Brix, azúcares reductores y totales	58
9.4.2 pH y acidez.....	60
9.4.3 Estabilidad microbiológica.....	63
10. Conclusiones.....	71
11. Referencias	71
Anexos.....	84

Lista de Tablas

Tabla 1. Antecedentes.....	32
Tabla 2. Medio a base de pulpa de café.....	36
Tabla 3. Diseño completamente al azar para la levadura seleccionada.	43
Tabla 4. Caracterización del microencapsulado	53
Tabla 5. Coliformes fecales durante la fermentación.	69

Lista de Figuras

Figura 1. Morfología del fruto.....	22
Figura 2. <i>Meyerozyma caribbica</i>	26
Figura 3. <i>Pichia kluyveri</i>	27
Figura 4. Curva de calibración para azúcares totales.	38
Figura 5. Curva de calibración para azúcares reductores.	39
Figura 6. Método de microencapsulación.	41
Figura 7. Viabilidad reportada de <i>Meyerozyma caribbica</i> y <i>Pichia kluyveri</i> al cabo de 24 h.	46
Figura 8. Evolución del pH durante la cinética de crecimiento.	47
Figura 9. Evolución de la cinética de los parámetros fisicoquímicos de los diferentes medios EM y CF para las levaduras: 1 y 2. a) °Brix, (b) azúcares reductores y (c) azúcares totales durante la cinética de crecimiento.....	49
Figura 10. Evolución de la <i>Meyerozyma caribbica</i> ante diferentes hongos: (a) <i>Aspergillus niger</i> (b) <i>Aspergillus flavus</i> (c) <i>Syncephalastrum racemosum</i> (d) <i>Cunninghamella spp</i> (e) <i>Penicillium spp</i>	50
Figura 11. Tiempo de liberación del ME (MLR).	56
Figura 12. Cinética de secado del ME.....	57
Figura 13. Evolución de los parámetros de fermentación de los tratamientos: a) °Brix, (b) azúcares totales y (c) azúcares reductores durante el proceso.....	58
Figura 14. Evolución de pH durante los días de fermentación.	61
Figura 15. Evolución de acidez durante los días de fermentación.	62
Figura 16. Estabilidad microbiológica de BAL durante la fermentación. Nota: puntos con superíndices diferentes a los días son significativamente diferentes.	64

Figura 17. Estabilidad microbiológica de Levaduras durante la fermentación. Nota: puntos con superíndices diferentes a los días son significativamente diferentes..	66
Figura 18. Estabilidad microbiológica de mesófilos aerobios durante la fermentación. Nota: puntos con superíndices diferentes a los días son significativamente diferentes. 68	
Figura 19. Análisis estadístico de ° Brix a los 0 días.	84
Figura 20. Análisis estadístico de ° Brix a los 2 días.	85
Figura 21. Análisis estadístico de ° Brix a los 4 días.	85
Figura 22. Análisis estadístico de ° Brix a los 6 días.	85
Figura 23. Análisis estadístico de azúcares reductores a los 0 días.....	85
Figura 24. Análisis estadístico de azúcares reductores a los 2 días.....	85
Figura 25. Análisis estadístico de azúcares reductores a los 4 días.....	86
Figura 26. Análisis estadístico de azúcares reductores a los 6 días.....	86
Figura 27. Análisis estadístico de azúcares totales a los 0 días.....	86
Figura 28. Análisis estadístico de azúcares totales a los 2 días.....	86
Figura 29. Análisis estadístico de azúcares totales a los 4 días.....	86
Figura 30. Análisis estadístico de azúcares totales a los 6 días.....	87
Figura 31. Análisis estadístico de pH a los 0 días.	87
Figura 32. Análisis estadístico de pH a los 2 días.	87
Figura 33. Análisis estadístico de pH a los 4 días.	87
Figura 34. Análisis estadístico de pH a los 6 días.	88
Figura 35. Análisis estadístico de bacterias lácticas a los 0 días.....	88
Figura 36. Análisis estadístico de bacterias lácticas a los 2 días.....	88
Figura 37. Análisis estadístico de bacterias lácticas a los 4 días.....	88
Figura 38. Análisis estadístico de bacterias lácticas a los 6 días.....	88
Figura 39. Análisis estadístico de levaduras a los 0 días.....	89

Figura 40. <i>Análisis estadístico de levaduras a los 2 días.</i>	89
Figura 41. Análisis estadístico de levaduras a los 4 días.....	89
Figura 42. Análisis estadístico de levaduras a los 6 días.....	89
Figura 43. Análisis estadístico de mesófilos aerobios a los 0 días.....	89
Figura 44. Análisis estadístico de mesófilos aerobios a los 2 días.....	90
Figura 45. Análisis estadístico de mesófilos aerobios a los 4 días.....	90
Figura 46. Análisis estadístico de mesófilos aerobios a los 6 días.....	90

Resumen

El estudio se centra en la fermentación del café utilizando una levadura microencapsulada. Para seleccionar la cepa más adecuada se realizó una cinética de crecimiento de 24 h entre dos levaduras (*Meyerozima caribbica* y *Pichia kluyveri*) en dos medios de cultivo diferentes, uno comercial (extracto de malta) y otro desarrollado en el laboratorio a base de café. De modo, que se evaluaron parámetros claves como producción de biomasa, pH, ° Brix, azúcares totales y reductores. Los resultados revelaron que la *Meyerozima caribbica* exhibió un mejor rendimiento en el medio a base de café al cabo de las 20 h (7,40 Log (UFC/g)), un pH de 4,35 y un mayor consumo de ° Brix, azúcares reductores y totales en comparación con la otra cepa.

Posteriormente, se procedió a microencapsular la *Meyerozima caribbica*, logrando un porcentaje de encapsulación de 85,84%. Con la levadura microencapsulada, se llevó a cabo el análisis de la fermentación del café durante 6 días, donde se evaluaron diferentes tratamientos: un control sin levadura (0%), concentraciones de 3% y 5% (*Meyerozima caribbica*), y un tratamiento combinado que consistió en un 3% y 3% de levadura y bacteria láctica (*L. plantarum*) microencapsuladas. En el que se obtuvo que el tratamiento del 5% presentó mejores resultados en cuanto a pH (3,83), % acidez (0,45), y un mayor consumo de ° Brix, azúcares reductores y totales, desarrollando una fermentación más rápida respecto a los otros tratamientos. Por otro lado, los resultados microbiológicos mostraron que había más presencia de levaduras y bacterias lácticas cuando se agregaba inóculo y esto a su vez evitó el crecimiento de hongos y coliformes fecales. Lo anterior respalda la viabilidad de utilizar la *Meyerozima caribbica* como una alternativa prometedora para mejorar el proceso de la

FERMENTACION DEL GRANO DE CAFÉ 12

fermentación del café lo cual conduce a la obtención de un producto de mayor calidad sensorial, microbiológica y fisicoquímica.

Palabras clave: *café, fermentación, levadura, microencapsulado.*

1. Introducción

En la actualidad, el consumo del café ha tenido una evolución rápida hasta el punto de ser la bebida más consumida en el mundo (solo superada por el agua) (Ladino et al., 2016). Esta tendencia ha ido arraigada al crecimiento socioeconómico de diversos países y las nuevas tecnologías de información, que han generado cambios en las perspectivas del consumidor el cual ya no solo se basa en el precio de un producto sino que también opta por su calidad, conocimiento del proceso y experiencia de consumo, produciendo como consecuencia la evolución de un mercado más exigente (López & Alvarez-Herrera, 2017). En los últimos años ha surgido una oferta creciente de cafés de alta calidad, especiales y orgánicos, cuyas cualidades dependen de su preparación y sus etapas de procesamiento industrial. En estas etapas, la fermentación juega un rol fundamental, ya que intervienen microorganismos que afectan el grano y tienen gran repercusión en su calidad sensorial (Ladino et al., 2016).

En ese sentido, una de las especies más producidas de café es la *Coffea Arábica* (café arábigo), que representa cerca del 90% de la producción mundial (Serna et al., 2018). Esta es cultivada entre 1000 y 1200 metros sobre el nivel del mar (msnm) en países alrededor de la línea ecuatorial, dentro de los cuales se destaca Colombia por ser el tercer mayor productor (Rosero et al., 2015). Dentro de esta especie, existe una variedad producida en el país colombiano denominada variedad *Castillo*, la cual es producto de la variedad *Caturra* y el híbrido *Timor*. Este café posee una condición genética que le ofrece características como la estabilidad en sus propiedades agronómicas y la fácil adaptación en zonas que se ven afectadas por la roya del cafeto (hongo *Hemileia vastatrix*) y en zonas donde la enfermedad no posee mayor afectación. En consecuencia, los productores de

este cultivo, pueden obtener los mejores beneficios productivos de la siembra y una buena granulometría en las cerezas (Alvarado et al., 2013).

En Colombia, el café es un importante producto agrícola de exportación, con aproximadamente 12,6 millones de sacos de café verde exportados. Este cultivo representa cerca del 15% del producto interno bruto (PIB) del país y de él dependen más de 545.000 familias rurales, generando más de 2,5 millones de trabajos directos e indirectos (MinAgricultura, 2020). Sin embargo, en el territorio colombiano, se ha encontrado un vacío referente a los programas de desarrollo de cafés especiales, ya que no hay un concepto claro en la estandarización y calidad de los procesos del café, por lo que se requiere un avance en este sector para que se logre una solución de esta problemática y así obtener unos mayores márgenes de utilidad en los productos elaborados (Castro & Fajardo, 2016; Minciencias, 2021). Uno de esos factores que merece una mayor atención son los seguimientos de los procesos de fermentación, puesto que representa una de las mayores repercusiones en la calidad final del café, debido a que, se ha encontrado que las levaduras y diversas bacterias desarrollan procesos metabólicos de interés en los que convierten compuestos químicos, principalmente los azúcares, en sustancias orgánicas más simples como el ácido láctico, butírico, etanol, entre otros compuestos (Puerta, 2013b).

Investigaciones como las de Bressani et al. (2018), de Melo Pereira et al. (2015), Samaniego (2019) han comprobado que la adición de inóculo de levaduras junto con un buen control de proceso tienen una gran influencia en la fermentación del fruto. En consecuencia, esto permite obtener un producto con perfiles sensoriales distintivos y buenas cualidades organolépticas generando a su vez, una bebida con alta calidad sensorial y mayor valor agregado. Asimismo, de acuerdo

con Suárez Manzano (2019) se ha encontrado que es posible microencapsular células de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) como fuentes de probióticos, ya que mediante su estudio pudo determinar una concentración adecuada la cual fue capaz de competir con los microorganismos indeseables, siendo este método de microencapsulación reconocido por darle estabilidad y supervivencia a distintos microorganismos, por medio de capsulas poliméricas de tamaño micrométrico (Pérez-Leonard et al., 2013; Tangarife, Arias, & Zapata, 2021).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue elaborar microencapsulados (ME), preparados con adición de polímero obtenido de bacterias lácticas (*Weissella confusa*), de levaduras seleccionadas del proceso de fermentación del café variedad Castillo, de la zona de Trujillo, Valle del Cauca; con el fin de realizar una fermentación controlada, habiendo establecido las condiciones de fermentación de las levaduras microencapsuladas y después evaluado el efecto del porcentaje de inóculo del ME en la fermentación del grano. (Ríos, 2021).

2. Planteamiento del Problema

En Colombia, la industria cafetera es de gran importancia ya que aporta uno de cada tres empleos rurales, generando 631.000 empleos al año de los cuales alrededor de 2.000.000 de personas que viven directamente de su producción (Minciencias, 2021). En ese sentido, en los últimos años se ha observado un descenso en los precios del café convencional debido a que estos son fijados por el mercado bursátil, afectando principalmente a los pequeños caficultores, debido a que no siempre hay una garantía en la homogeneidad de la calidad del café ya que las practicas no son estandarizadas implicando la mayoría de las veces lotes de baja calidad con elevados costos de producción y una disminución en el margen de utilidad (Castro & Fajardo, 2016).

En el proceso de elaboración del café, la calidad del grano y la consistencia son factores críticos para obtener un café de alta calidad. Por ende, la uniformidad del grano es esencial para el proceso de fermentación, ya que durante esta etapa se producen una serie de procesos bioquímicos a través de la acción de microorganismos, los cuales contribuyen a las características de calidad y a las propiedades organolépticas del café, como su aroma, sabor y fragancia.(Sanchez De La Cruz, 2018). Además, en el transcurso de la fermentación, que tiene lugar tras el proceso de despulpado en el método de procesamiento húmedo, predominan los efectos de autólisis de la pulpa provocados por la acción de enzimas pectolíticas, de tal manera que emplear procesos que involucren altos contenidos de humedad favorecen el crecimiento de los hongos hidrofílicos como los *Aspergillius*, *Penicillium* y *Clasdosporum*. Dentro de las especies de los *Aspergillius*, algunas son precursores de ocratoxinas, de estas se encuentra la ocratoxina A (OTA), la cual es la forma más relevante y prevalente de este grupo

(Maman et al., 2021). Esta ocratoxina presenta actividad nefrotóxica, hepatotóxica, embriotóxica, teratogénica, neurotóxica, inmunotóxica, genotóxica y cancerígena, además de que este es un contaminante abundante en alimentos y piensos y generalmente se detecta con frecuencia en cereales y subproductos, aunque también es común encontrarla en café, cacao, uvas, entre otros (Young et al., 2019).

En relación con lo anterior, los caficultores siguen un proceso rudimentario para determinar el tiempo de la fermentación, teniendo como consecuencia márgenes de error en el tiempo lo cual genera defectos en la calidad del grano. Por ende, si sobrepasan los tiempos de fermentación se obtiene condiciones indeseables (Puerta & Echeverry, 2015). Cuando los tiempos de fermentación son relativamente prolongados, y no se lleva un proceso controlado y estandarizado, el resultado suele ser la obtención de lotes de calidad inferior. Esto, a su vez, conlleva un aumento en los costos de producción y una disminución en los márgenes de beneficio, impidiendo garantizar una compra perdurable (Sanchez De La Cruz, 2018). Por consiguiente, se requiere emplear un método que permita controlar el proceso de fermentación y con facilidad de manejo en campo, proponiéndose la microencapsulación de inóculos masivos de levaduras microencapsuladas de modo que se tenga control sobre el proceso.

De acuerdo con lo anterior, se formula la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál sería el impacto de los microencapsulados de levaduras en el proceso de fermentación del café?

3. Justificación

Las nuevas dinámicas y tendencias comerciales sumado a las nuevas motivaciones del consumo de alimentos y bebidas, donde la experiencia del consumidor es importante y el aumento de la creciente demanda de cafés especiales, invitan a revisar la oferta nacional y su evolución respecto a estos nuevos tipos de alimentos (Arias et al., 2018). En relación con lo anterior, un café es considerado especial cuando es percibido y valorado por una característica que lo diferencie de los cafés convencionales; esta puede ser su aroma, sabor, suavidad, lugar de origen, entre otros; a diferencia de los cafés convencionales, estos fijan su precio por fuera del mercado bursátil, pero requieren procesos más estandarizados con mayores controles dentro de los mismos, de los cuales la fermentación es uno de los más importantes (Minciencias, 2021).

La fermentación del grano de café es crucial debido a que, a las condiciones de higiene, los controles de clasificación, la temperatura y el tiempo dependerá si la bebida producida contiene aromas y sabores dulces, cítricos, frutales y tostados o, por el contrario, si se sobrepasa el tiempo y no se controlan los factores de la fermentación, se tendrá un producto con defectos en el grano y sabores agrios y a fermento en la bebida. Por lo tanto, es importante emplear controles que permitan atribuirle una calidad al grano de café diferenciadora del tradicional y esto es posible mediante la aplicación de levaduras (Camizán Jaramillo, 2020). De acuerdo con lo anterior, estudios como el de Sanchez De La Cruz (2018), en la utilización de la levadura *Saccharomyces sp* controlando el tiempo de fermentación en el café (*Coffea arabica*) comprueba que es posible realizar un proceso a menor tiempo (12 h) comparado con el tradicional (± 80 h) y con características sensoriales similares, incluso mejores. Además, de acuerdo

con la investigación de Melo Pereira et al. (2015) en la fermentación controlada de granos de café por cultivos iniciadores de la levadura *Pichia fermentans* YC5.2 ha permitido demostrar que este tipo de especies otorgan un sabor distintivo y una alta calidad sensorial en la bebida de café.

Teniendo en cuenta lo anterior, con esta propuesta se pretende aplicar levaduras seleccionadas, provenientes del proceso de fermentación del café variedad Castillo de la zona de Trujillo, Valle del Cauca; que proporcionen calidad microbiológica y aromas deseables en el grano, esto por medio del proceso de microencapsulación, el cual ha sido identificado como un mecanismo que permite dar estabilidad y supervivencia a distintos microorganismos, además, de facilitar el manejo en campo y protección a condiciones ambientales o procesos industriales que involucren temperatura, presión, oxígeno, luz, humedad, entre otros (Pérez-Leonard et al., 2013). De acuerdo con las consideraciones anteriores, este estudio va orientado a mantener la estabilidad del grano durante el proceso de fermentación y calidad del producto final, con el fin de estandarizar el proceso.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Evaluar el proceso de fermentación controlada del café mediante la adición de una cepa de levadura microencapsulada seleccionada.

4.2. Específicos

- Establecer las condiciones de fermentación con aplicación de levadura microencapsulada.
- Evaluar la influencia del porcentaje de inóculo de levadura microencapsulada sobre la calidad microbiológica y las características fisicoquímicas del grano de café.

5. Hipótesis

H₀: el porcentaje de inóculo de levaduras microencapsuladas no tiene efectos en las características fisicoquímicas y microbiológicas de la fermentación del café.

H₁: el porcentaje de inóculo de levaduras microencapsuladas tiene efectos en las características fisicoquímicas y microbiológicas de la fermentación del café.

6. Marco teórico

6.1 Generalidades del café

El café es una planta perenne tropical, perteneciente al género *Coffea* de la familia *Rubiáceas*. Actualmente se reconocen más de 103 especies, existen tres que tienen mayor importancia económicamente a nivel global: *arábica*, *cenophora* y *libérica*. La variedad *arábica* constituye el 90% de café que se comercializa internacionalmente, además es una de las variedades mejor catalogadas por los consumidores, debido a sus excepcionales características organolépticas. Por otra parte, el café *cenophora* y *libérica* corresponde al 9% y 1% del comercio internacional, respectivamente (Serna-Jiménez et al., 2018).

6.1.1 Fisiología del cultivo

Una de las variedades más sembradas en Colombia es el café Castillo con un 24% en los diferentes terrenos del país, debido a que posee unas características fisiológicas que le permiten adaptarse bien a las zonas tropicales de la región andina y, no es tan susceptible a otras enfermedades y plagas producidas por las variaciones climáticas (Fernández-Cortés et al., 2020). En el caso de que se presentan períodos secos, la variedad Castillo presenta mejor resistencia frente a la clorilisis (envejecimiento prematuro) y pérdida de follaje. Por otro lado, si presenta condiciones de neblina y lluvias prolongadas, esta variedad no es tan

susceptible de presentar el crecimiento del hongo *Mycena citricolor*, también conocido como “ojo de gallo”, en las hojas el cual ocasiona debilitamiento en la planta y por ende una caída de los frutos.

6.1.2 Morfología del fruto

El fruto del café es una drupa monoespermico lo que significa que contiene una sola semilla en su interior, del cual es color verde al principio y cuando alcanza su estado de maduración adquiere una tonalidad roja o púrpura y raramente amarilla. Dentro de la morfología del fruto se encuentra los siguientes tejidos (Santos, 2023):

- **Pericarpio:** Adquiere un tono rojo cuando la fruta madura, actúa como una envoltura protectora para las demás estructuras del fruto
- **Mesocarpio:** Es el mucílago y posee una consistencia gelatinosa, se encuentra ubicado por encima de la capa de pectina.
- **Endocarpio:** Es la cascarilla o pergamino de color crema que envuelve a la semilla y tiene un color que varía de crema a marrón.
- **Espermoderma:** Recubrimiento plateado que envuelve a la semilla.
- **Endospermo:** Es la semilla o grano del café previamente constituido.
- **Embrión:** Se localiza en la parte saliente o convexa de la semilla y está constituido por el hipocótilo y dos cotiledones.

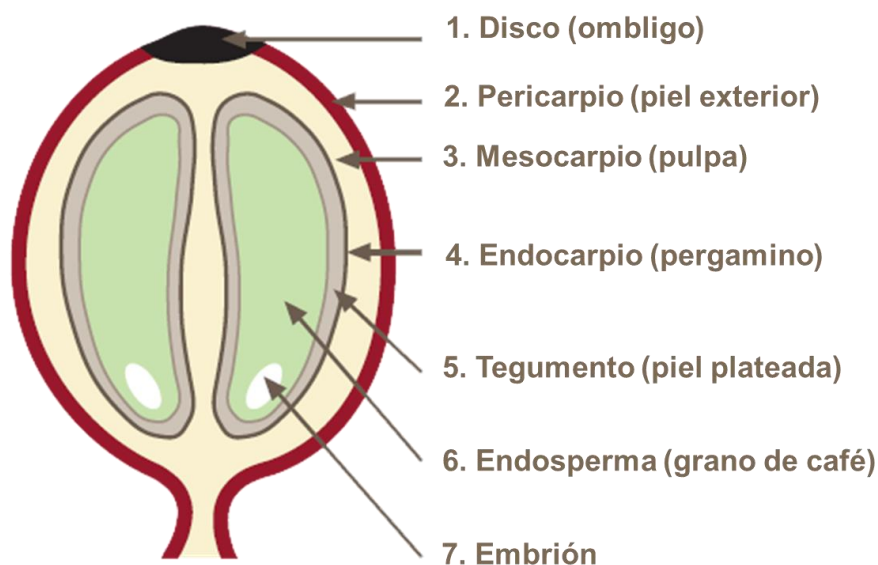


Figura 1. Morfología del fruto. Fuente: (Yara, 2016).

- **Capa de pectina:** se encuentra en las paredes de la semilla y está constituida principalmente de ácido poligalacturónico, que ayuda en la fermentación (Guerra González & Rueda Silva, 2021).

6.2 Cafés especiales

De acuerdo con la Federación Nacional de Cafeteros, el café especial se denomina así debido a que es percibido por los consumidores por alguna cualidad que lo diferencia de un café convencional, aumentando su valor agregado. Por otra parte, la *Specially Coffee Asociación of America*, describe el café especial, como aquel que presenta un tamaño y un secado característico que le otorgue un atributo distintivo (Velásquez-Agudelo & Trávez-Velásquez, 2019).

Dentro de los cafés especiales se dividen 3 grupos:

6.2.1 Cafés de origen

Los cafés de origen suelen ser cafés especiales con notas distintivas, provenientes del lugar de fabricación y no son mezclados con otras cualidades o cafés de otras regiones, de tal manera, la importancia para estos consumidores radica más en el origen que en la marca (Duarte Serrano, 2016).

6.2.2 Cafés sostenibles

Los cafés sostenibles cumplen con certificación y estándares muy altos, dado que estos deben ser sostenibles con el medio ambiente, libres de agroquímicos y cumplir con la certificación *UTZ Rainforest Alliance* (Velásquez-Agudelo & Trávez-Velásquez, 2019).

6.2.3 Cafés de preparación

Estos cumplen con condiciones especiales de tamaño y apariencia dividido en 3 subcategorías:

- **Caracol:** es característico por su acidez y por sus dimensiones anormales (Prado et al., 2015).
- **Supremo:** los granos de café son más grandes respecto al convencional (Velásquez-Agudelo & Trávez-Velásquez, 2019).
- **Premium:** obtienen esta categoría debido a que sus evaluaciones sensoriales como color, aroma, sabor y entre otros, son mejores respecto a las demás (Serna et al., 2018).

6.3 Fermentación del café

Durante el proceso de elaboración de café, la fermentación es una de las etapas concluyentes sobre la calidad del grano, dado que durante esta etapa el grano sufre diferentes reacciones bioquímicas derivadas de levaduras y bacterias del mucílago. A lo largo de la fermentación los microorganismos oxidan los azúcares, teniendo como resultado energía en forma de ATP y otros compuestos como alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas, ésteres y dióxido de carbono. Estos productos tienen un impacto en los cambios físicos y químicos como: el color, olor, densidad, acidez, pH, actividad de agua, los cuales son influyentes sobre la

calidad del grano, y todos estos factores están directamente relacionados con el tiempo de la fermentación (Castro & Fajardo, 2016).

6.3.1 Sistemas de fermentación del café

- **Fermentación en estado sólido (FES):** Este proceso consiste en recrear los sustratos necesarios ricos en nitrógenos y sales mineralizadas, bajo ciertas condiciones específicas de humedad, pH y aireación permitiendo un mejor desarrollo del microorganismo (Borrás-Sandoval & Torres-Vidales, 2016). En el proceso del café, la FES, se realiza en un fermentador. En este entorno, el mucílago actúa como sustrato para el crecimiento del microorganismo, además se controla el desagüe del fermentador evitando derrames del mucílago, con el fin de controlar la fermentación, manteniendo el mucilago lo más cerca del café, lo que es esencial para el desarrollo de sabores y aromas en el grano del café (Puerta & Echeverry, 2015).

- **Fermentación en estado líquido (FEL):** en este tipo de fermentación los inóculos se encuentran sumergidos y los sustratos se encuentran en la superficie del agua en forma líquida, por consiguiente, los microorganismos se desarrollan libremente de forma suspendida o en cúmulos en el volumen del recipiente (Paucar Barreno, 2016). Esta técnica permite tener mejor control en la agitación, pH, humedad, temperatura, entre otras y por ende se desarrollan procesos más estandarizados y mejor producción de biomasa respecto a la FES (Vega-Oliveros et al., 2022).

6.3.2 Microorganismos asociados a la fermentación del café

A continuación, se describen algunos microorganismos presentes en la fermentación del café:

6.3.2.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL han sido reconocidas como microorganismos esenciales en el procesamiento del café, de las cuales se encuentran la *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* que han sido catalogadas como dominantes en la fermentación, debido a que son utilizadas como cultivos iniciadores en los procesos de fermentación (Cruz O'Byrne, 2021).

6.3.2.2 Levaduras

Las levaduras también juegan un papel importante en el proceso de la fermentación y además se ha demostrado que promueve la producción de bebidas del café de alta calidad, dentro de este grupo se encuentran: *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*, dentro de las que destacan *Saccharomyces*, como género líder en la fermentación, debido a su importancia económica al influir en las bebidas atributos dulces, florales y frutales (Cruz O'Byrne, 2021).

La *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad, es una levadura heterótrofa, que obtienen la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa. Puede aislarse con facilidad en plantas y tierras, así como en el tracto gastrointestinal y genital humano (Suárez-Machín et al., 2016).

- ***Meyerozyma caribbica*:** Esta levadura pertenece a la familia de *Debaryomycetaceae* y al género de *Meyerozyma*, sus células se caracterizan por ser ovaladas y esféricas con una membrana celular que los rodea (ver Figura 2). Algunas de las características principales es su versatilidad de consumir diferentes compuestos durante la fermentación para producir compuestos como xilosa y xilitol, y en fermentar diferentes

compuestos, como la glucosa y la xilosa, además de su gran capacidad de producir xilitol (Ayu et al., 2021; Tadioto et al., 2022).

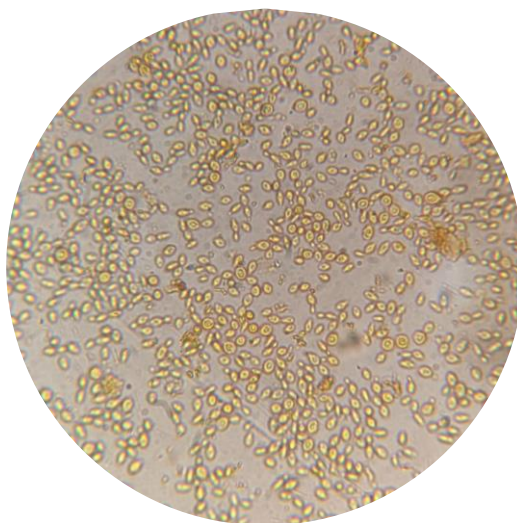


Figura 2. *Meyerozyma caribbica*. Fuente: Elaboración propia.

- ***Pichia kluyveri*:** Es una especie de levadura que pertenece al género *Pichia* y a la familia *Pichiaceae*, sus células son ovaladas y esféricas y un poco alargadas (*ver Figura 3*), es una levadura fermentadora facultativa, lo que significa que obtiene energía a través de la fermentación como de la respiración aeróbica. Una de las características principales es su alto potencial en tecnología vitivinícola, principalmente por su aporte al aroma del vino, glicerol y rendimiento etanólico (Riquelme Toledo, 2023; Vicente et al., 2021).

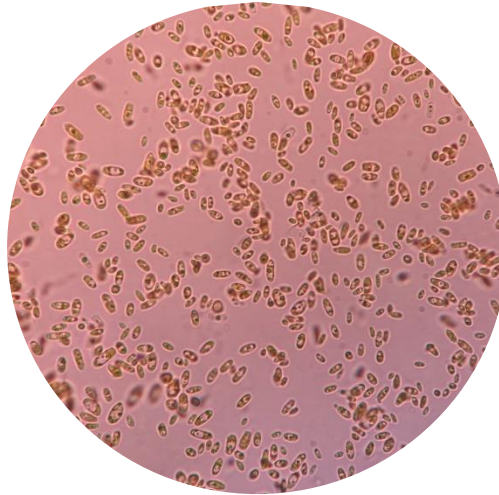


Figura 3. *Pichia kluyveri*. Fuente: Elaboración propia.

6.3.2.3 Hongos

Los hongos son organismos eucariotas que poseen su propio núcleo, membrana celular, retículo endoplasmático y un aparato secretor. Muchos hongos son aerobios obligados o facultativos, se caracterizan por su tipo de reproducción sexual y asexual, a su vez estos organismos son heterótrofos por ende depende de otros organismos que les proporcione nutrientes para su crecimiento ya que no pueden fabricar su propia fuente de carbono mediante la fotosíntesis (Menco Tapia, 2020).

- ***Aspergillus niger*:** Es un hongo filamentoso que pertenece al género *Aspergillus*, es un microorganismo saprófito y ubicuo que se encuentra en el suelo, aire y alimentos. Forma esporas aerotransportadoras altamente pigmentadas que tienen paredes celulares gruesas y baja actividad metabólica lo que le permite soportar condiciones adversas (Cortês et al., 2020). Otra característica de este microorganismo es su influencia en la producción de ocratoxina A (OTA), el cual es un metabolito secundario que contamina una amplia gama de alimentos (Durand

et al., 2009). Estudios como Al-Ghouti et al. (2020) en la determinación de aflatoxinas en el grano de café encontró que de los géneros de hongos dominantes asociados con los granos de café fueron del género *Aspergillus spp.* donde el que muestra mayor incidencia sobre los granos de café es el *A. niger*.

- ***Aspergillus flavus*:** Es un hongo saprófito del suelo que infecta y contamina antes y después de la cosecha con el metabolito secundario cancerígeno llamado aflatoxina (Amaike & Keller, 2011). Hasta ahora se han identificado cuatro tipos de aflatoxinas producidas por este hongo (B1, B2, G1 y G2); donde estudios demuestran que la B1 es la más potente puesto que causa efectos mutagénicos, cancerígenos y teratogénicos, por lo cual es conocido como el agente genotóxico (Domijan et al., 2019).
- ***Penicillium spp.*** Es un hongo filamentoso de la familia *Trichomaceae*, del orden de los eurotiales se caracteriza por producir conidios granulares de bordes lisos verdes y amarillos (Osaba et al., 2021). Algunas especies de *Penicillium* pueden producir micotoxinas, puesto que estudios como el de Ramos (2019) sobre el control de micotoxigénicos en queso maduro, afirman que este hongo es uno de los contaminantes más importantes en quesos maduros dado su capacidad de crecer en condiciones húmedas y pH entre 5,0 y 7,0, así como en presencia de oxígeno(Ramos, 2019).
- ***Syncephalastrum spp.*** Es un género de hongo filamentoso que pertenece a la familia *Syncephalastraceae* y al orden de los

mucorales este se caracteriza por tener una estructura micelial que se ramifica en forma de árbol. Se encuentra presente en distintos tipos de sustratos orgánicos preferentemente en el suelo y estiércol de zonas tropicales y subtropicales (Cruz-Choappa & Vieille, 2021). También se ha demostrado que algunas especies de *Syncephalastrum* pueden producir micotoxinas, como la patulina el cual es un potencial carcinógeno (Carranza-Mesén et al., 2022).

- ***Cunninghamella spp.*** Es un hongo filamentoso que pertenece a la familia *Cunninghamellaceae*, del orden de los mucorales, esta especie se destaca por ser saprófitas y se encuentran comúnmente en alimentos, en restos de vegetales y excrementos de herbívoro (Oyarzo & Choappa, 2020). Además, es un patógeno oportunista causante de las infecciones mucormicosis, las cuales se caracterizan por su gravedad y su alta tasa de mortalidad (Arellano Galicia, 2019).

6.4 Microencapsulación

La microencapsulación se describe como una tecnología de encapsulación de materias sólidas, líquidas y gaseosas con proporciones de nano escala que abarcan los diámetros de 0.2-5000 μm , las cuales tienen como objetivo liberar su contenido a ciertas velocidades bajo unas condiciones específicas (Esquivel-González et al., 2015). El proceso de microencapsulación se puede realizar de diferentes maneras como por ejemplo la coacervación, co-cristalización, polimerización artificial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica, atrapamiento por lipomasas e inclusión molecular. De igual manera este proceso

se puede realizar mediante procesos mecánicos tales como la aspersión, liofilización y extrusión (Jiménez González, 2017).

Una de las técnicas más empleadas en la microencapsulación es el método de extrusión debido a su proceso el cual es relativamente menos complejo y más económico respecto a los otros procesos, puesto que este método consiste en que el material activo a encapsular pasa en forma de gotas por el extrusor a alta presión, y este es recibido sobre un recipiente con alginato de calcio el cual es comúnmente utilizado como material de recubrimiento para diferentes enzimas, ácidos grasos y prebióticos debido a que genera cápsulas menos porosas que el secado por aspersión (Reyna et al., 2015).

7. Antecedentes

En la literatura científica se evidencian trabajos relacionados con la fermentación controlada del café mediante inóculo de levaduras, de los cuales se ha tenido como fin evaluar el efecto de la fermentación asistida en la calidad del grano y el perfil sensorial de la bebida. Es de anotar que no se encuentran investigaciones asociadas a la inoculación mediante microencapsulación. A continuación, en la *Tabla 1* se presentan los artículos encontrados:

Tabla 1. Antecedentes

Autores y año	Producto	Condiciones de proceso	Resultados
Melo Pereira et al. (2015)	Café (<i>Coffea arabica</i> cv. Catuaí)	Levadura <i>Pichia fermentans</i> YC5.2., Fermentación espontánea (no inoculado), inoculado e inoculado con sacarosa 2% (p/v).	- Las cepas seleccionadas mostraron buen uso potencial como cultivos iniciadores durante el procesamiento húmedo del café, otorgándole perfiles sensoriales distintivos de los procesos tradicionales y con capacidad de dominar el mismo. - Las levaduras tuvieron un impacto favorable en las características químicas del grano. - Se comprobó que es posible desarrollar bebidas con alta calidad sensorial, alta acidez y sabores distintivos a partir de la cepa utilizada.
Bressani et al. (2018)	Café (<i>Coffea arabica</i> cv. Catuaí Amarelo)	Método de inoculación: balde (homogeneizado en cubetas de poliestireno), directo (rociado sobre la cereza). Levaduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCMA 0543, <i>Candida parapsilosis</i> CCMA 0544 y <i>Torulospira delbrueckii</i> CCMA 0684.	- Los cultivos iniciadores resultaron una alternativa prometedora y viable económicamente para mejorar la calidad sensorial de la bebida del café y así aumentar su valor de producto final - El método de inoculación dependió de la levadura seleccionada. - La <i>S. cerevisiae</i> CCMA 0543 presentó una diferencia significativa en el análisis sensorial, mostrando un mejor resultado en el método por balde y adicional otorgó sabores característicos como a plátano y marañón.
Cruz & Pivaral (2018)	Café cereza (<i>Coffea arabica</i> L.	Fermentación: abierta y cerrada.	- Las levaduras y bacterias ácidos lácticas (BAL) mostraron mejor crecimiento en la fermentación abierta.

	var. <i>Catuaí</i>)	Tipo de inóculo: sin levadura, cepa L2, L'ORO y Fermipan.	- Todos los tratamientos obtuvieron un perfil final de taza mayor a 84 puntos, lo cual los clasifica dentro de la categoría de cafés especiales. - La utilización de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L'ORO otorgó sabores distintivos (tamarindo, arándanos y bayas) y de alto perfil sensorial, y, asimismo, desarrolló perfiles de azúcares y proximales que permiten diferenciar el producto resultante del obtenido por el sistema de fermentación tradicional.
Sanchez De La Cruz (2018)	Café (<i>Coffea Arabica</i>)	Tiempo de fermentación: 4, 8 y 12 h. Dosis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : 20, 40 y 60 mL	- Hubo un impacto positivo en la calidad del producto asociado a la fermentación controlada. - El mejor tratamiento fue la adición de 60 mL de <i>Saccharomyces sp</i> con un tiempo de 12 h ya que el producto resultante obtuvo las mejores características fisicoquímicas y mejor perfil sensorial. - La adición de levadura permitió completar un proceso en menor tiempo (12 h) con cualidades sensoriales semejantes al proceso habitual (± 80).
Samaniego (2019)	Café (<i>Coffea Arabica</i> var. <i>Geisha</i>)	Tiempo de fermentación: 48 y 60h. Fermentación: con inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y sin inóculo. Inyección de CO ₂ : sí y no.	- La asistencia con inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> afectó positivamente los atributos sensoriales del café - La aplicación de CO₂ aumentó los atributos de balance y cuerpo del grano, aumentando su puntaje final en el perfil final de taza.

			- La utilización de CO₂, el tipo y tiempo de fermentación tuvieron impacto sobre la cafeína, el contenido de grasa y los ácidos clorogénicos del producto. - En el recuento final de microorganismos de la fermentación, las levaduras presentaron mayor concentración, seguida de las BAL y hongos.
Betancur & Zurita (2020)	Café (<i>Coffea Arabica</i> var. <i>Caturra</i>)	Tipo de fermentación: lavado o natural Fermentación: con inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, sin inóculo y sin fermentación.	- La fermentación asistida influyó positivamente la calidad final del café sin depender del tratamiento (lavado o natural). - La adición de inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mejoró satisfactoriamente la calidad del café húmedo. - No se identificaron diferencias en los recuentos de hongos y levaduras. - Hubo una reducción de temperatura, pH en la fermentación controlada y una disminución de los sólidos solubles en los tratamientos inoculados.

Fuente: elaboración propia.

8. Materiales y métodos

8.1 Materiales

8.1.1 Cultivos Iniciadores

Para la elaboración de cultivos iniciadores se utilizaron levaduras autóctonas del grano de café provenientes de tres fincas cafeteras provenientes de la región Trujillo de Valle del Cauca. Estos microorganismos fueron seleccionados de acuerdo con su caracterización morfológica y bioquímica, formación de biomasa y perfil aromático en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología aplicada (MIBIA) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad del Valle dentro del proyecto “Fortalecimiento de la competitividad de los cafés especiales del centro del Valle del Cauca” - CAFINNOVA VALLE en vinculación con Minciencias.

8.1.2 Medios de cultivo y mantenimiento de los microorganismos

Para el crecimiento y mantenimiento de las levaduras que se emplearon como cultivos iniciadores se utilizaron los siguientes medios: medio YPD con modificaciones utilizando pulpa de café (zona de Trujillo del Valle del Cauca) y otros nutrientes (*ver Tabla 2*) y medio comercial de extracto de malta. Estos microorganismos fueron mantenidos en crioconservación a -20 °C y en tubos inclinados a 5 °C para uso inmediato y activación. Además, se usaron medios de cultivo VRB (enterobacterias), PDA (hongos) y MRS (BAL) para la estabilidad y evolución microbiológica de la fermentación en café.

Tabla 2. Medio a base de pulpa de café

Material	Dosificación (%)
Pulpa de café	91,91
Glucosa anhidra	0,37
Extracto de levadura	2,76
Peptona	0,92
Pectina cítrica rápida	0,92
Fructosa	0,37

Fuente: (Hawaz et al., 2023; Judakova et al., 2023).

8.1.2.1 MRS (Man, Rogosa y Sharpe)

Medio enriquecido con nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para el crecimiento de BAL (Torres, 2018). Este se preparó con agua destilada a una concentración de 52.2 g/L, una vez esterilizado, se le adicionó azul de anilina con el objetivo de diferenciar bacterias ácido lácticas. Finalmente se almacenó a 5°C hasta su uso (Muhialdin et al., 2020).

8.1.2.2 Extracto y caldo de Malta

Se utilizó extracto y caldo de malta para incubar las levaduras basándose en el método de Correa (2019) en su estudio de “Caracterización del crecimiento in vitro del hongo *Neofabraea vagabunda*”.

8.1.2.3 VRB (Entéricas)

Se utilizó el medio VRB para el cultivo de microorganismos entéricos, empleando el método seguido por Chiara (2019) en su artículo de “Aislamiento, identificación y evaluación microbiana de la *Escherichia coli* en pollos de engorde”.

8.1.2.4 PDA (Hongos)

Se usó el medio PDA para el cultivo de hongos empleando el método seguido por Correa (2019).

8.1.3 Materiales de Microencapsulación

Se utilizó almidón de maíz de la variedad waxy (Ingredion Colombia S.A), alginato de sodio (con D-manurónico y L-gulurónico, con un peso molecular de entre 80.000 – 120.000 g/mol) (Sigma-Aldrich) (Steinhein, Alemania), exopolisacárido producido por la bacteria *Weisella confusa* y cloruro de calcio (Agenquímicos) (Cali, Colombia) (Briceño-Veléz, 2020).

8.1.3.1. Exopolisacárido (EPS)

Se empleó exopolisacárido obtenido del microorganismo láctico *W. Confusa*, esta es una bacteria ácido-láctica, de alto rendimiento y gran productora de EPS (Du et al., 2022). Este microorganismo pertenece a la colección de cepas del laboratorio MIBIA.

8.1.4 Materia prima

Se utilizó café de la variedad Castillo obtenido de las fincas de la región de Trujillo, Valle del Cauca.

8.2 Métodos

8.2.1 Pruebas preliminares para la elaboración del inóculo iniciador

Se efectuaron ensayos preliminares sobre el desarrollo de las levaduras entregadas (*P. kluyveri* y *M. caribbica*) en los medios de cultivo citados en el ítem 8.1.2, verificando su viabilidad y reportándose la formación de UFC/g en los medios de cultivo. Las verificaciones se hicieron desde que se añadieron las levaduras a los medios, en intervalos de 4 h hasta llegar a las 24 h. Esto determinó la afinidad del microorganismo para su desarrollo en el sustrato propuesto. Basándose en los resultados obtenidos se definió la formulación del medio y la levadura para el microencapsulado y las pruebas de fermentación.

8.2.1.1 pH

La determinación del pH se realizó en un pH-metro (Orion, 710-A) a 20 °C, tomando 10 mL del medio de cultivo homogenizado previamente (Bozkurt & Erkmén, 2002).

8.2.1.2 Consumo de azúcares totales y reductores

Para la cuantificación del consumo de azúcares totales y reductores, se siguieron los métodos de antrona y DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) propuestos por Moran-Mejía et al. (2021), respectivamente. En la *Figura 4* y *Figura 5* se presentan las curvas de calibración correspondientes.

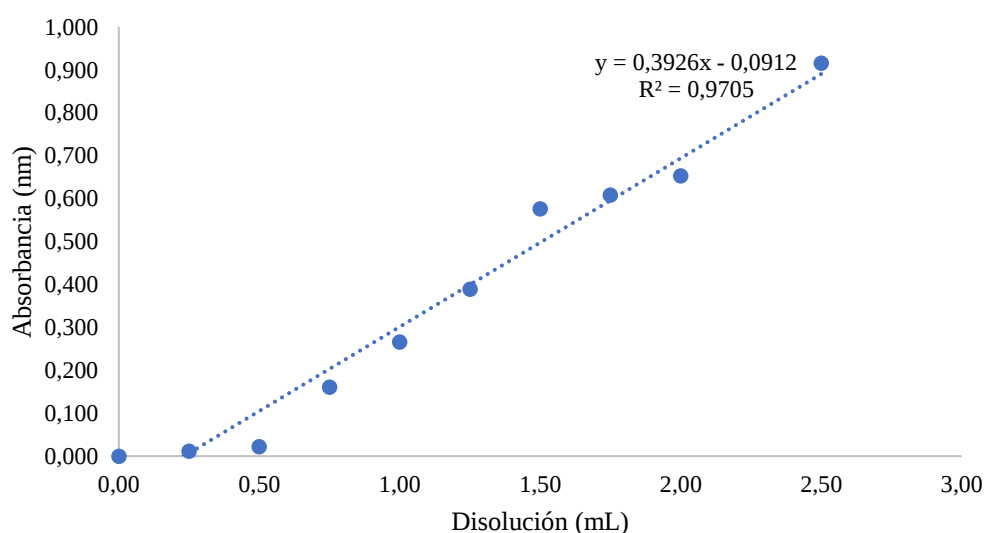


Figura 4. Curva de calibración para azúcares totales. Fuente: Elaboración propia

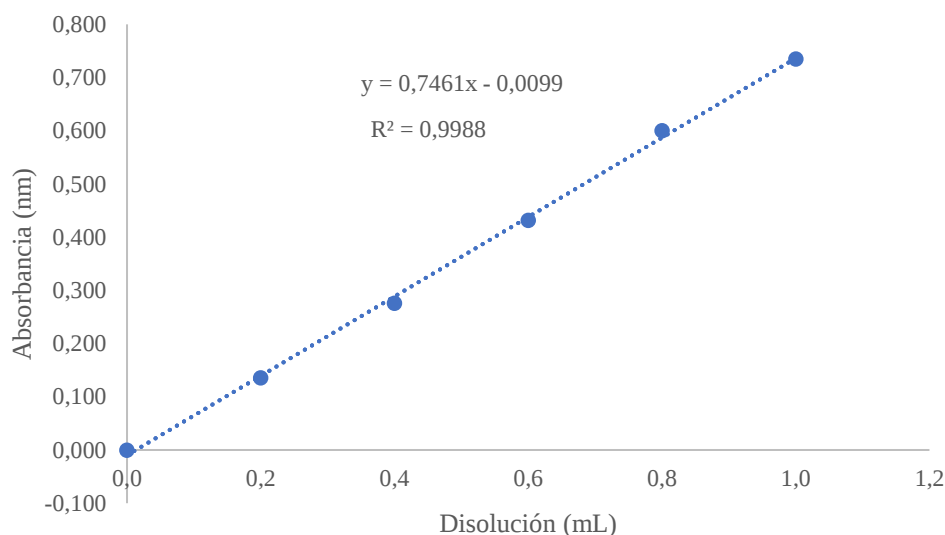


Figura 5. Curva de calibración para azúcares reductores. Fuente: Elaboración propia.

8.2.1.3 Biomasa

Se tomó 1mL de cada medio con su levadura correspondiente hasta llevarlo a una dilución de 10^6 para posterior siembra en extracto de malta e incubación a 37.5°C . Finalmente, al cabo de los 2 días se realizó un conteo microbiológico de las cajas Petri con el fin de identificar que levadura produjo mayor biomasa y cuál fue el tiempo óptimo de mayor crecimiento.

8.2.2 Inhibición de hongos

De acuerdo con los resultados de biomasa se eligió la *M. caribbica* como levadura seleccionada para las pruebas de fermentación. Previamente, a esta levadura se le hizo la prueba de inhibición de hongos con cinco cepas aisladas de la fermentación del café de las fincas de la zona del Trujillo. Después de aislar los hongos, se sembraron en tubos de agar de PDA inclinado mediante un movimiento en zigzag. Una vez que el cultivo alcanzó un crecimiento óptimo, se agregó una solución de agua peptonada para obtener una disolución de 10^{-1} , que luego se llevó

a 10^{-3} para extraer 100 μL y sembrarlos en cajas Petri de PDA, conjuntamente, mediante un isopo estéril se extendió el inóculo hasta su absorción total.

Adicionalmente, en otra caja Petri con extracto de malta se adicionó la levadura hasta alcanzar su pico de crecimiento. De este medio, se tomó un botón con un diámetro de 6 mm, asegurándose de que la cara donde se encuentre el microorganismo este en contacto con la caja del hongo previamente extendido, finalmente se dejó crecer aproximadamente por 48 horas para su posterior análisis.

8.2.3 Elaboración de microencapsulado

Se siguió el modelo de Briceño-Veléz (2020), el cual se basa en la modificación del método de extrusión sugerido por Turhan *et al.* (2017) y Shaharuddin & Muhamad (2015). Las cepas de levaduras se activaron en el medio escogido de la cinética de crecimiento (medio a base de pulpa de café) a 35°C durante 20 h, posteriormente se centrifugó el caldo de crecimiento a 4000 rpm durante 10 min (Gandomi *et al.*, 2016). El sobrenadante fue retirado y luego lavado el botón con peptona al 0.1%, en el cual se acumulara hasta obtener suspensiones que contengan 9 log UFC/mL. La verificación se efectuó mediante el ajuste a la lectura en escala de McFarland.

Por otro lado, el almidón de maíz, el EPS y alginato de sodio descrito en los ítems 8.1.3 y 8.1.3.1 se sometió a esterilización en autoclave (Market Forget STM-EL, USA) a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, la solución de almidón, EPS y alginato de sodio se mezclaron en una plancha de agitación (Benchmark, H3760-H, USA) con una suspensión celular activa de 10 mL. Las suspensiones se sometieron a un proceso de aspersión utilizando un aspersor (Discover LN-I; mini compresor Discover TC-06, USA) con un diámetro de boquilla de 0.5 mm, recibéndose en una solución estéril con 0.1 M de cloruro de

calcio (CaCl_2) como solución de endurecimiento. Después de 15 minutos de gelificación en CaCl_2 , el material se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, y se secó en un horno de convección natural a 40°C durante 3 horas. Seguidamente, el material fue molido y empacado para posterior uso como inóculo iniciador. En la *Figura 6*, se muestra el procedimiento para la microencapsulación.

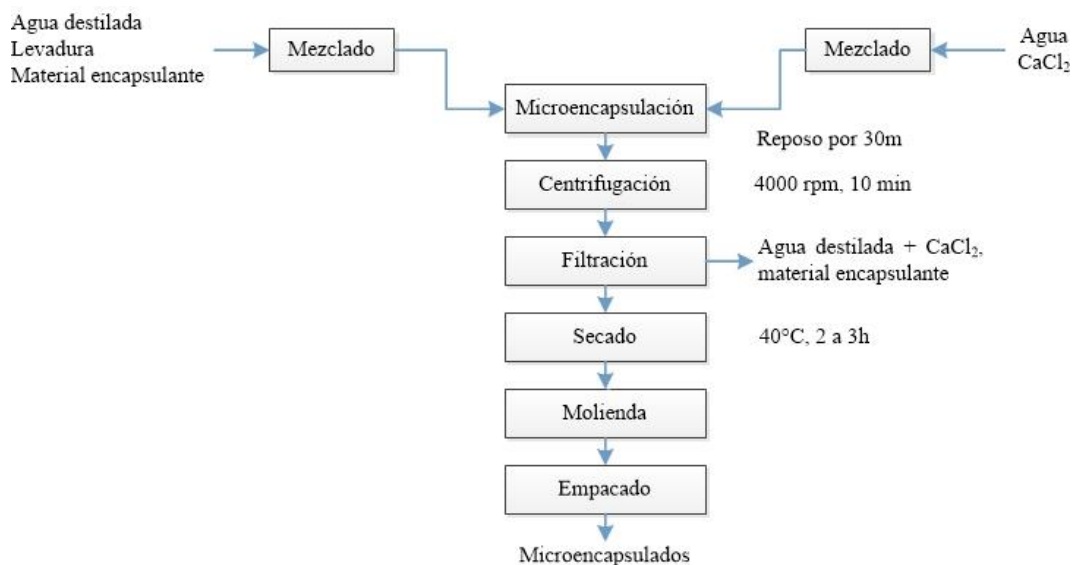


Figura 6. Método de microencapsulación. Fuente: Briceño-Vélez (2020).

8.2.4 Caracterización del microencapsulado

En la caracterización de los ME se emplearon los siguientes métodos planteados por Briceño-Veléz (2020):

8.2.4.1 Porcentaje de microencapsulación (PM)

Para calcular el porcentaje de ME, se usó la siguiente ecuación (ver *Ecuación 1*).

$$\%PM = \frac{N}{N_0} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde N es el número de células ME liberadas de las microcápsulas Log (UFC/g) microcápsulas y N_0 es el número de células liberadas añadidas a la mezcla encapsulante durante la producción de microcápsulas Log (UFC/g).

8.2.4.2 Viabilidad del ME

Para el recuento de células viables se utilizó el método seguido por Briceño-Velez (2020).

8.2.4.3 Tiempo de liberación para los Microencapsulados de Rápida Liberación (MRL)

Se determinó tomando en cuenta que la formulación propuesta era de mecanismo de rápida liberación, ya que se requería que la *M. caribbica* tuviera efecto en la fermentación desde el primer momento.

8.2.5 Fermentación del café y porcentaje de inóculo

Se usó un diseño completamente al azar en donde se evaluaron tres porcentajes de inóculo de *M. caribbica* en el ME (porcentaje de inóculo de levadura: 0, 3 y 5%) (ver Tabla 3). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las variables de respuesta fueron los siguientes parámetros de fermentación: azúcares totales y reductores, características fisicoquímicas (pH, temperatura y acidez total) y la calidad microbiológica (conteo de hongos, levaduras, bacterias lácticas, mesófilos aerobios, coliformes y colonias entéricas) del grano fermentado de café. Adicionalmente, se hizo un tratamiento combinado de 3% levadura más 3% de la bacteria láctica *Lactobacillus plantarum*.

Tabla 3. *Diseño completamente al azar para la levadura seleccionada.*

Variables de proceso	Niveles	Variables de respuesta
% de Inóculo de levadura en ME	0%	Azúcares totales y reductores
	3%	Características fisicoquímicas
	5%	Calidad microbiológica
	3%+3%	

Fuente: elaboración propia.

La fermentación del café se realizó en frascos estériles de 1L (Schott), a los cuales previo al inicio del proceso, se le agregaron 100 g de semilla de café, 45 mL de agua más los ME. Los frascos se mantuvieron en una cámara climática Memmert ICH 750 con temperatura de $20 \pm 0,5$ °C y humedad relativa de $70 \pm 5\%$.

8.2.6 Parámetros de fermentación

Se evaluaron los parámetros de fermentación y, la estabilidad y evolución microbiológica del proceso antes del ME, en proceso con el ME y al finalizar. Lo anterior se hizo con el fin de determinar el efecto del porcentaje de inóculo de levadura en el café.

8.2.6.1 Azúcares totales y reductores

Para determinar el consumo de azúcares totales y reductores, se siguieron los métodos de antrona y DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) propuestos por Moran-Mejía et al. (2021), respectivamente. Para las curvas de calibración se utilizaron las descritas en el ítem 8.2.1.2

8.2.6.2 Características fisicoquímicas

8.2.6.2.1 pH

Se tomaron 10 mL del licor de café homogenizado para posterior medición de pH mediante un pH metro (Orion, 710-A) a 20 °C.

8.2.6.2.2 Temperatura

Se registraron los datos resultantes por la cámara climática Memmert ICH 750.

8.2.6.2.3 Acidez total

Se pusieron 10 mL del licor de café en un erlenmeyer, al cual se le añadió una gota de fenolftaleína y luego se tituló con NaOH al 0.1N hasta obtener una solución con coloración rosada. La acidez se calculó como ácido acético acorde con lo descrito por Granados et al. (2013).

8.2.6.3 Estabilidad y evolución microbiológica de la fermentación en café

Los recuentos que se realizaron se presentan a continuación:

8.2.6.3.1 Recuento de colonias (entéricas, lácticas, hongos y levaduras)

Se tomó 1 mL de muestra al que se le adicionó 9 mL de agua peptona a fin de elaborar una mezcla homogénea mediante un homogeneizador (Intersciencie/minimix®PCC® 100 mL) durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron diluciones de 1 mL de la mezcla mediante tubos de ensayos hasta llegar a la sexta dilución. Seguidamente, se tomaron 100 µL de las tres últimas diluciones para sembrarlas en medio de cultivos MRS con azul de Anilina (bacterias lácticas) (Britania Lab), VRB (entéricas), PDA (hongos) y extracto de malta (levaduras). Finalmente, para el conteo se incubaron a 37.5°C (Kryoven) durante 48 h para las bacterias lácticas y entéricas, y 60 h para los hongos y levaduras.

8.2.6.3.2 Recuento de coliformes totales

Se tomó 1 mL de las tres primeras diluciones nombradas anteriormente para inocularlos por separado en tubos de 9 mL de caldo Sulfato Lauryl, a los cuales se les adicionó la campana de Durham para verificar la producción de gas. Posteriormente, se dejaron en incubación a 37.5° C por 48 h (Kryoven). En caso de observar presencia de gas (burbuja en la campana), se le hacía prueba de Indol usando el reactivo de Kovacs con el fin de verificar si hay existencia de *Escherichia coli*, la cual indica un anillo de color rojo en el tubo (prueba positiva) o color verde (prueba negativa).

8.2.7 Pruebas estadísticas

Se empleó el programa estadístico MiniTab versión 20,3, donde se realizó el ANOVA para el diseño experimental mencionado anteriormente (ver *Tabla 3*) con un nivel de significancia o rechazo ($\alpha = 0,05$).

9. Análisis de resultados

9.1 Cinética de crecimiento

9.1.1 Biomasa

Inicialmente se realizó un análisis preliminar mediante una cinética de crecimiento de las dos levaduras recibidas, *Pichia kluyveri* (1) y *Meyerozyma caribbica* (2), en dos medios de cultivo, extracto de malta (EM) y medio a base de pulpa de café (CF). Los datos se encuentran en la *Figura 7*.

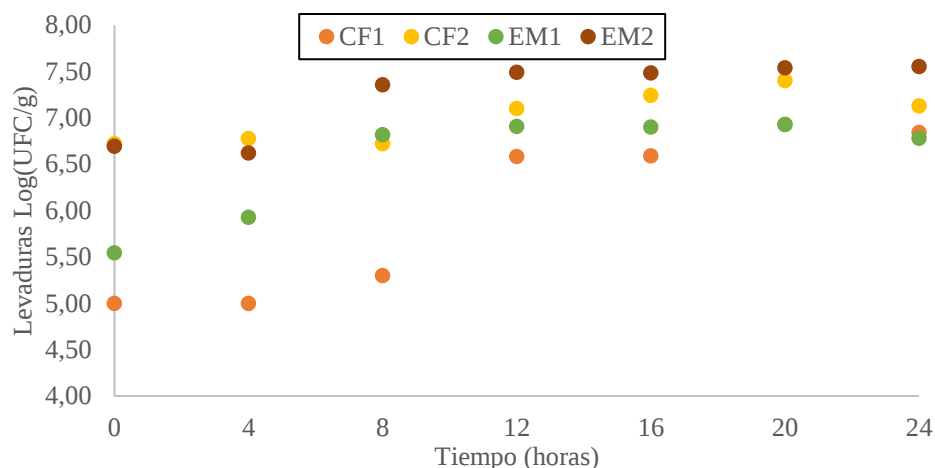


Figura 7. Viabilidad reportada de *Meyerozyma caribbica* y *Pichia kluyveri* al cabo de 24 h. Fuente: elaboración propia.

De la *Figura 7* se observa que el medio EM con la levadura 2 se obtiene la mayor cantidad de biomasa a partir de las 8 horas aproximadamente donde posterior a este tiempo adquiere un comportamiento constante, dado que al emplear un medio comercial como el EM que es generalmente nutritivo y compuesto de azúcares simples (enfocado para el crecimiento de microorganismos), se tienen mejores resultados (Palacio & Ramírez, 2020). Adicionalmente, estudios recientes como el de Kaur *et al.* (2023), sobre la evaluación potencial de producción de xilitol en paja de arroz, han demostrado que la *Meyerozyma Caribbica* puede producir cantidades de biomasa considerables en condiciones óptimas, por lo que tiene gran capacidad para crecer rápidamente, tal como sucede en la cinética de los dos medios.

De igual manera se observa en la *Figura 7* que al cabo de las 20 horas empleando el medio CF con la levadura 2, se tiene un comportamiento semejante al extracto de malta con esta levadura, debido a que el medio a base de café, es una modificación del medio YPD el cual contiene extracto de levadura y peptona que aportan vitaminas, nutrientes, aminoácidos, péptidos y proteínas que estimulan el crecimiento (Hawaz *et al.*, 2023). Asimismo, como complemento de

fuelle de energía, se suele usar glucosa dextrosa, sin embargo, durante la investigación se usó glucosa anhidra debido a que es un compuesto estable y fácilmente disponible, adicional a esto, se agregó pectina cítrica, fructosa y pulpa de café, como estimulantes en la acidez (Judakova *et al.*, 2023).

Por lo tanto, del estudio de viabilidad realizado se encontró que la levadura 2 tiene un crecimiento más rápido que la 1 (*ver Figura 7*), asimismo que tiene un desarrollo óptimo a las 20 h y que no tiene gran diferencia en el número de colonias desarrolladas en los dos medios al cabo de ese tiempo.

9.1.2 pH

De la *Figura 8* se observa que a medida que transcurre el tiempo las levaduras reducen el pH de los medios.

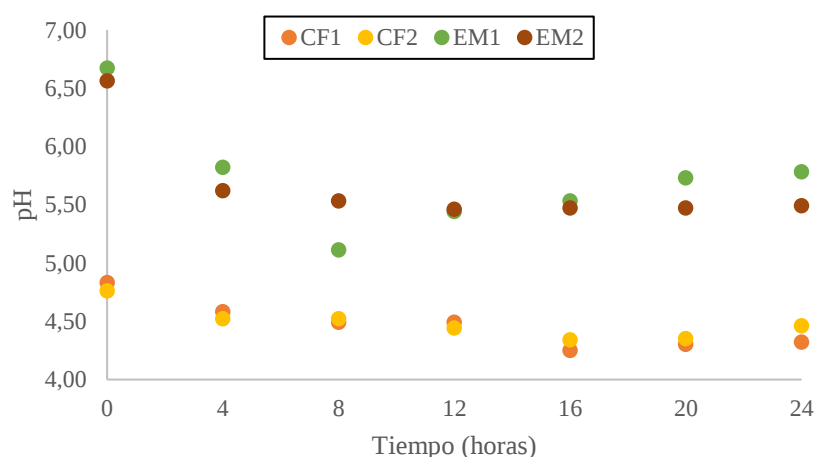


Figura 8. Evolución del pH durante la cinética de crecimiento. Fuente: elaboración propia.

Este fenómeno se debe a la capacidad de las levaduras de consumir los azúcares presentes en los medios y producir ácidos orgánicos tales como málico, acético, láctico, entre otros, que contribuyen a disminuir el pH del medio o generalmente el de una fermentación (Rosero *et al.*, 2015). De igual manera empleando un medio CF se obtienen valores de 4,50 cercanos a una fermentación del café, donde Mahingsapun *et al.* (2022) en su estudio acerca de la mejora de la

calidad del café Arábica bajo fermentación controlada, obtuvo en la muestra control un pH de 4,61 al cabo de 24 h.

9.1.3 ° Brix, azúcares totales y reductores

En la *Figura 9 (a)* se observa como las levaduras van transformando los sólidos solubles del medio de cultivo CF, donde se aprecia que en este medio la tendencia es decreciente el cual es un comportamiento ideal dado que las levaduras tienen la capacidad de consumir los azúcares como la glucosa y fructosa, para la producción de energía (Hawaz et al., 2023). Por otro lado, en los medios EM se difiere el comportamiento, donde una de las posibles causas es la hidrólisis del extracto de malta donde los carbohidratos presentes en él se descomponen en unidades más pequeñas de azúcares simples como la maltosa y glucosa, liberando más azúcares, y a su vez estas levaduras las consumen para producir alcohol y CO₂ (Figuerola Acedo, 2019). Es de destacar, que este medio está compuesto por extracto de malta (en composición, 75-80% ° Brix y 50-65% azúcares reductores), dextrina, glicerina, peptona de gelatina, y agar lo cual le rinda condiciones óptimas de crecimiento a los microorganismos para el cual fue diseñado, en este caso levaduras (Palacio & Ramírez, 2020).

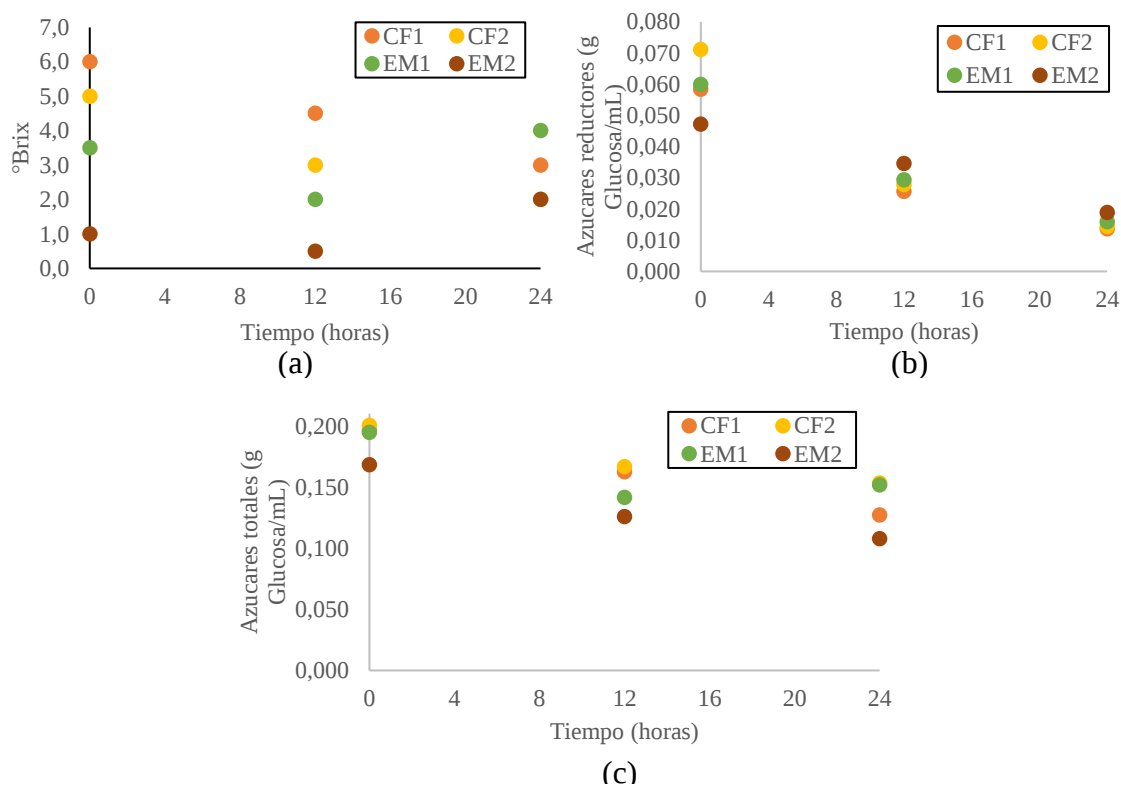


Figura 9. Evolución de la cinética de los parámetros fisicoquímicos de los diferentes medios EM y CF para las levaduras: 1 y 2. a) °Brix, (b) azúcares reductores y (c) azúcares totales durante la cinética de crecimiento. Fuente: elaboración propia.

Del mismo modo, en las demás figuras (b) y (c) se observan los cambios de los azúcares reductores y totales, los cuales permiten estudiar la actividad metabólica de los microorganismos y su capacidad de utilizarlos como fuentes de energía. En ese orden de ideas, los reductores se degradan mediante hidrólisis en el medio ácido y luego se oxidan parcialmente por las levaduras y bacterias ácidos lácticas con el fin de producir etanol, ácido láctico, dióxido de carbono y otros compuestos (Puerta, 2013a). De este modo, se obtiene un comportamiento similar a los ° brix donde al inicio coincide con la cantidad de nutrientes que poseen los medios diluidos en agua y con el pasar de las horas se va evidenciando, como estos, son consumidos por las levaduras a medida que se van produciendo los ácidos resultantes y se disminuye el pH (ver Figura 8) (Rodríguez, 2015).

Por lo tanto, de los datos obtenidos del análisis preliminar se concluyó que la levadura a utilizar para el microencapsulado fue la *M. caribbica* debido a que tuvo un mejor crecimiento que la *P. kluyveri* conforme pasaba el tiempo, asimismo, que se empleó el medio de café ya que presentó una viabilidad similar al cabo de las 20 horas y es un medio menos costoso para su utilización.

9.2 Inhibición de hongos

Consecutivamente, en la *Figura* se observa la evolución de la *M. caribbica* en la prueba de hongos realizada con las cepas aisladas de la fermentación del café.

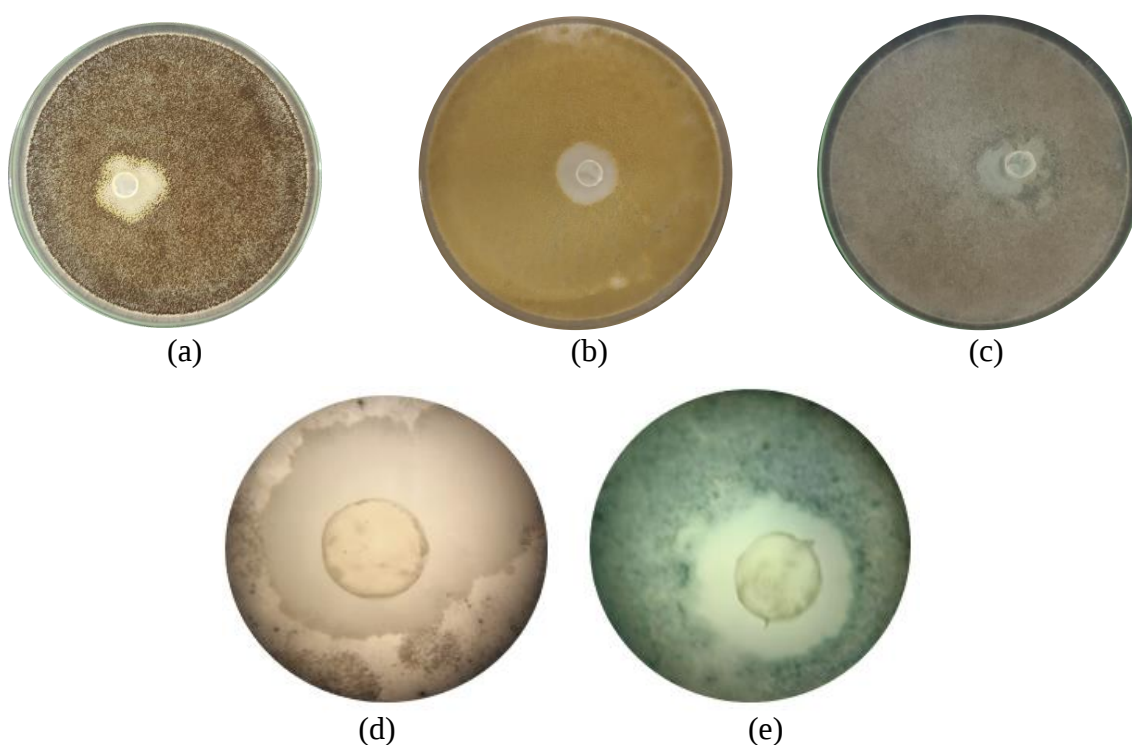


Figura 1. Evolución de la *Meyerozyma caribbica* ante diferentes hongos: (a) *Aspergillus niger* (b) *Aspergillus flavus* (c) *Syncephalastrum racemosum* (d) *Cunninghamella* spp (e) *Penicillium* spp. Fuente: elaboración propia.

Una cereza de café contiene entre 50-55% humedad y una a_w entre 0,97-0,98, por lo que posee un riesgo de ser afectado por alteraciones microbiológicas, entre ellas enfermedades fúngicas que pueden disminuir su producción y rendimiento (Moran Carpio, 2023). Entre los principales hongos que se han encontrado después de 48 horas de fermentación, géneros como el *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium* representan un 42.6% de su aparición, asimismo, pueden presentarse mohos de los *Rhizopus*, *Trichoderma* y *Mucor* (Puerta *et al.*, 2015). Es por ello, que deben emplearse buenas prácticas de manufactura y de sanitización en el procesamiento agrícola del café.

Por otro lado, estudios relacionados con el potencial inhibitorio de fitopatógenos por parte de la *M. caribbica*; Bautista-Rosales *et al.* (2013) ha comprobado que la levadura presenta mecanismos de acción aptos para contrarrestar el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* que afecta la postcosecha del mango, inhibiendo en un 86,7% el hongo. De igual forma, Xu *et al.* (2013) en su investigación sobre la pudrición en la postcosecha de duraznos generada por *Rhizopus* ha demostrado que el biocontrol con *M. caribbica* reduce significativamente las lesiones producidas por el hongo. En este sentido, ambos estudios indican que la cepa tratada proporciona un mecanismo de competencia por espacio y nutrientes óptimo para el tratamiento de infecciones causadas por estos fitopatógenos en frutas y hortalizas, ya que se ha demostrado que estas levaduras forman muescas en el micelio de los hongos, distorsionándolo y eventualmente causando rupturas en sus células; a través de las enzimas glucanasa, quitinasa y proteasa.

En relación con lo anterior, en la *Figura* se observa como la *M. caribbica* inhibe todas las cepas en el punto de origen donde fue sembrada, por lo que aparte

de tener una buena producción de biomasa puede combatir gran variedad de hongos que afectan el procesamiento del café y así obtener mejores rendimientos en su producción. En ese orden de ideas, estudios como el de Cruz & Pivaral (2018) explica que la utilización de levaduras como cultivos iniciadores crea un ambiente de competitividad de espacio y nutrientes, entre ellas y los microorganismos patógenos, disminuyendo la presencia de hongos y obteniendo productos muchos más inocuos y estables en términos de calidad, por lo que al añadir más concentración de levaduras se reduce el riesgo de producción de toxinas micóticas, ya que actúan con un efecto antagónico (Samaniego, 2019).

9.3 Microencapsulado (*M. caribbica*):

A partir del microencapsulado realizado se hizo la caracterización de este, para conocer con qué condiciones se trabajaba antes de la fermentación. Los datos se registraron en la *Tabla 4*.

Tabla 4. *Caracterización del microencapsulado*

a_w	%CH_{bh}	Viabilidad	%Microencapsulado	Solubilidad (%)	Humectabilidad (s)	Densidad (g/mL)
0,479	1,299	1,25E+07	85,84	51,76	34,22	3,85

Fuente: elaboración propia

De los datos de *Tabla 4* se tiene un porcentaje de microencapsulado de 85,84% para la levadura en cuestión, indicando que el proceso utilizado en el estudio ha demostrado ser efectivo, puesto que otros autores como Martins *et al.* (2022) en su investigación sobre “microencapsulación de levaduras epífitas del café mediante secado por aspersión” obtuvieron un rendimiento inferior al 50%, dado que la tolerancia de temperatura de la levadura se sitúa alrededor de los 28-30°C y al emplear temperaturas relativamente altas, estas inhiben su crecimiento. Respecto a la a_w del microencapsulado se obtuvo un valor de 0,479, altamente beneficiosa, ya que contribuye a la conservación y calidad del producto, puesto que delimita la proliferación de microorganismos no deseados, además que, al reducir la disponibilidad de agua, se ralentizan los procesos de deterioro y se prolongan la vida de útil del producto (Velez *et al.*, 2021). El valor obtenido de a_w en el microencapsulado es relevante en el contexto de la literatura científica pues otros autores como Köprüalan *et al.* (2022) y Velez-Erazo *et al.* (2021) obtuvieron una a_w de 0,21 y 0,288 respectivamente, destacando los beneficios de una a_w baja en la conservación y calidad del producto.

En relación con la humectabilidad del microencapsulado se tiene un valor de 34,22 s el cual indica que hay una buena interacción entre el líquido circundante y el microencapsulado, teniendo una liberación controlada de la levadura. En comparación con otros estudios Köprüalan *et al.* (2022) reportó un valor de 57,48 s al microencapsular extracto oleoso de cúrcuma, del cual deducen que el tiempo es bajo es debido a que el polvo obtenido es hidrófilo gracias a la maltodextrina. En el caso del microencapsulado obtenido en la investigación, el almidón waxy utilizado es altamente hidrofílico debido a su alto contenido de amilosa, por

consiguiente se tiene un producto con buena humectabilidad (Arboleda-Murillo et al., 2022).

Por otra parte, para la solubilidad se obtuvo un valor de 51,76% corroborando que el producto obtenido es soluble en agua. Asimismo, otra de las causas por cual se tiene buena afinidad con el agua, es la correlación que existe con el tamaño de partícula de los polvos, cuanto menor su tamaño, mayor será la superficie de hidratación. No obstante, a pesar de que los microencapsulados tienen tamaños pequeños, este porcentaje se ve afectado por la aglomeración de las partículas. Comportamiento semejante a Nthimole *et al.* (2022), quienes encapsularon jugo de frambuesa utilizando maltodextrina, goma arábica y almidón waxy como agentes encapsulantes, reportando solubilidades de $60.83 \pm 0.08\%$, $60.25 \pm 0.14\%$ y $54.52 \pm 0.03\%$, respectivamente. Del cual mencionaban que la solubilidad era afectada por la aglomeración de los polvos.

Adicionalmente, se hizo una prueba del tiempo de liberación del microencapsulado, teniendo en cuenta que la composición de los componentes con que se realizó era para obtener un producto de liberación rápida. Este tiempo de liberación depende de varios factores como lo son el tipo y geometría de la partícula, la difusión del compuesto volátil a través de la matriz, la transferencia de la matriz al medio ambiente, y la degradación/disolución del material de la matriz. En ese sentido, tener una liberación controlada del proceso contiene múltiples beneficios, ya que permite tener los ingredientes activos durante periodos prolongados de tiempo a velocidades adecuadas, evitar o reducir pérdidas de nutrientes durante el procesamiento, además de que se pueden separar componentes reactivos o incompatibles (Cruz de la Cruz, 2018). En ese sentido, como se observa en la *Figura 10* la primera cápsula se libera a los 5 min y se

mantiene mayor a 6 Log UFC/g durante el tiempo; este tiempo es adecuado para la fermentación del café puesto que según Castro & Fajardo (2016) en su investigación relacionada con los procesos tradicionales de fermentación del café en Nariño, al usar los tiempos de fermentación definidos por los caficultores de 17 fincas diferentes de la región, se encontraron tiempos de fermentación promedio de $18,94 \pm 3,4$ horas para la cereza de café variedad Caturra y Castillo, respectivamente. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre las variedades, pero si por los clústeres agroclimáticos (clúster A ≤ 1650 y B $\leq 1651 - 2100$ msnm) en los tiempos de fermentación. En ese orden de ideas, acorde con Puerta, (2015) explica que el tiempo de fermentación debe ser un parámetro establecido por cada finca, según la altura de la zona, la temperatura del lugar, el grado de madurez del fruto, el tipo de fermentación, entre otros factores; de modo que se evite la sobre fermentación del grano, que puede afectar los aspectos sensoriales del producto. Por lo tanto, se necesita que el microencapsulado actúe de manera rápida y finalmente su tiempo de liberación cumple con esta condición (5 minutos).

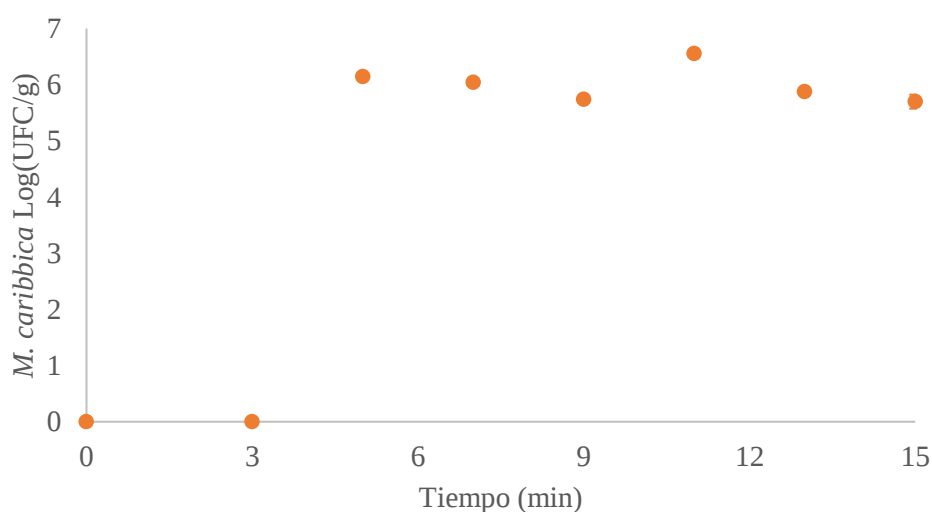


Figura 10. Tiempo de liberación del ME (MLR). Fuente: elaboración propia.

Por último, en la *Figura 11* se tiene la curva de secado del microencapsulado donde se observa que a las 2:10h se tiene un peso casi que constante, lo cual es un tiempo bajo para obtener un producto con condiciones de conservación favorables (*ver Tabla 4*).

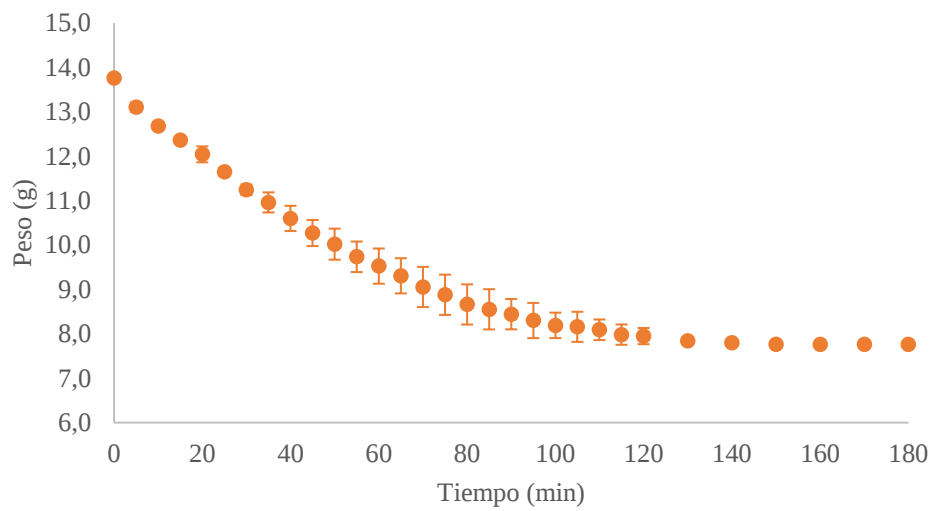


Figura 11. *Cinética de secado del ME. Fuente: elaboración propia.*

9.4. Parámetros de fermentación

9.4.1 ° Brix, azúcares reductores y totales

En la *Figura 12* (a), (b) y (c) se observa la evolución de los ° Brix, azúcares totales y reductores, respectivamente, durante los días de fermentación empleando diferentes concentraciones de la *M. caribbica* microencapsulada.

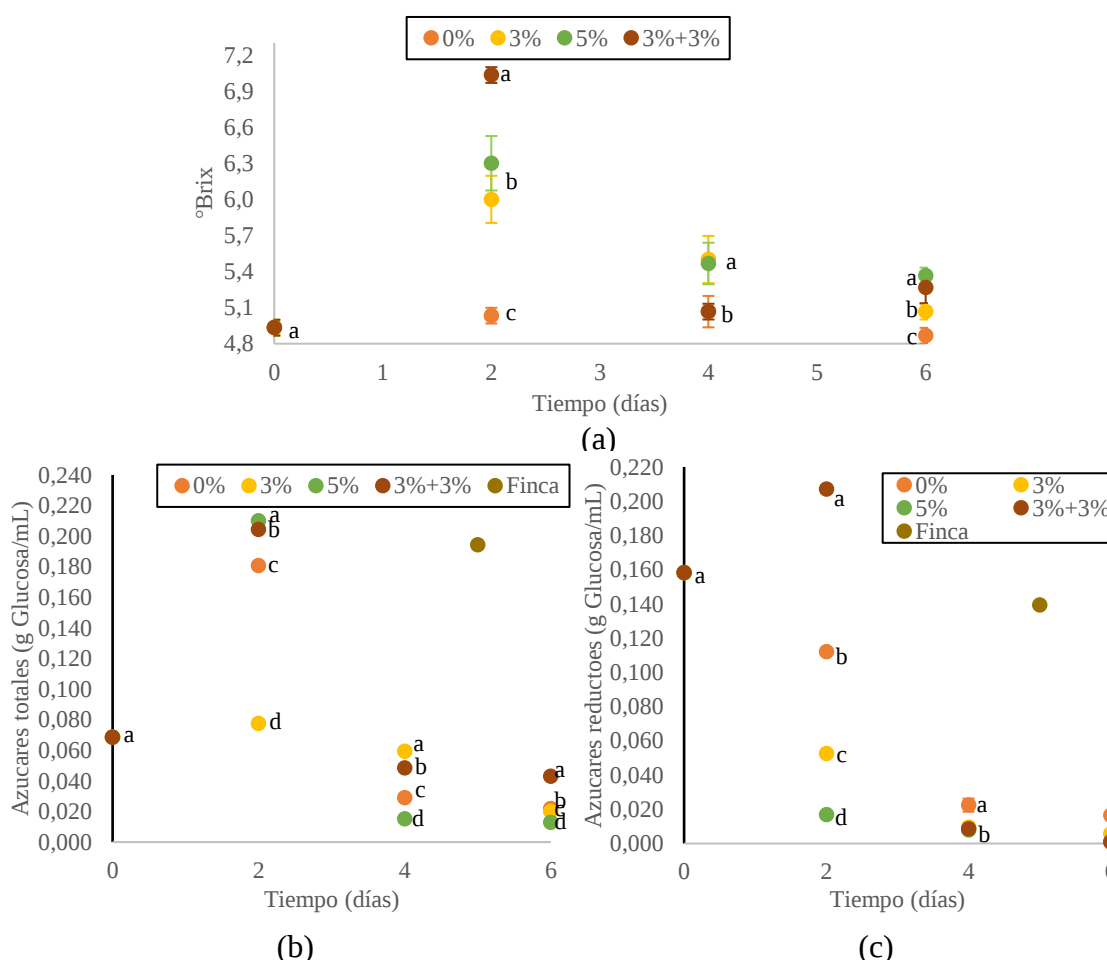


Figura 12. Evolución de los parámetros de fermentación de los tratamientos: a) °Brix, (b) azúcares totales y (c) azúcares reductores durante el proceso. Nota: puntos con superíndices diferentes a los días son significativamente diferentes. Fuente: elaboración propia.

En relación con los 2 días de tratamiento se obtiene un aumento progresivo en los ° Brix y azúcares totales para las concentraciones de 3%, 5% y 3% + 3% con diferencias significativas durante los días (ver *Figura 18*, *Figura 19*, *Figura*

20 y Figura 21 de Anexos), pero siguiendo el mismo comportamiento conforme aumenta la cantidad de inóculo. Este comportamiento está asociado al mucílago del fruto, el cual varía de acuerdo con su madurez, en promedio 10,4% para un fruto maduro, tal como fueron las cerezas tratadas, y su composición química es de 85-91% de agua y 6,2 a 7,4% de azúcares (principal componente de su materia seca), de los cuales el 63% son aproximadamente reductores (Ríos, 2021). Dado que este es una sustancia viscosa que se encuentra en la pulpa del fruto y contiene debajo una capa de pectina que posee gran cantidad de azúcares, al solubilizarse al cabo del tiempo, permite que las bacterias y levaduras degraden y fermentan sus proteínas, azúcares, lípidos y ácidos que luego son transformados en otros ácidos, alcoholes, ésteres, cetonas y azúcares más simples para después consumirlos (Salazar *et al.*, 2022). Por ende, al estar presente en los primeros días en el fruto y no disuelta en el agua, las levaduras no van a poder consumir los azúcares presentes en la pulpa hasta que se encuentre una concentración idónea para realizar sus procesos metabólicos.

Posterior al día cero, los compuestos del mucílago como los biopolímeros (pectina, arabinogalactana y xilana), proteínas, azúcares y lípidos se encuentran disueltos en el agua aumentando los azúcares disponibles y así la disponibilidad de estos compuestos a las levaduras, que, por medio de sus enzimas, como la glucosa oxidasa y glucosa isomerasa, las cuales desempeñan un papel catalítico, mejoran la conversión de los azúcares simples como la glucosa y fructosa en alcohol, conllevando una reducción de los ° Brix y azúcares después del día 2, en el que observa un desarrollo más rápido de la fermentación en los tratamientos 3%+3% y 5% (Sunmonu & Sanusi, 2022). Lo anterior coincide con el estudio de Betancur & Zurita (2020) relacionado con la fermentación controlada del café

adicionando *Saccharomyces cerevisiae*, donde se obtuvo que los tratamientos inoculados presentaron una disminución de ° Brix al cabo del tiempo y que a su vez es influenciado por la temperatura externa, asimismo concuerda con la investigación de Titisunta Vaca (2023) en la influencia de diferentes tipos de fermentación, en el que encontró que un tratamiento con agua tiene una degradación de azúcares más rápida que uno sin agua. Del mismo modo, la evolución de ° Brix de los tratamientos con inóculo al día 2, coincide con los rangos que indica Puerta (2013a) para una fermentación de sustrato sumergido en sistema abierto con alrededor de 30% de agua, los cuales oscilan entre 5,8 y 7,9%, pese a que se les adicionó 15% más de líquido y no tienen sacarosa añadida como la muestra en finca. Por tanto, se puede finalizar la fermentación en ese día.

9.4.2 pH y acidez

Seguidamente se procedió a evaluar la evolución del pH para los diferentes tratamientos empleados donde los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 13*, de la cual se observa la variación del pH a medida que transcurre el proceso de fermentación. Estos resultados son de gran importancia ya que este es un parámetro crucial que influye en los diversos aspectos de la fermentación como la producción de compuestos aromáticos y el tiempo óptimo de este proceso.

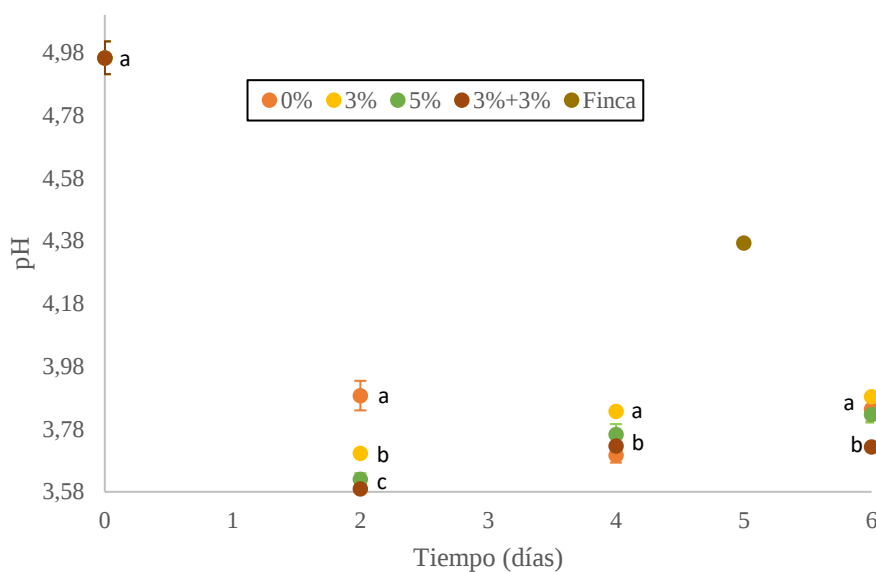


Figura 13. Evolución de pH durante los días de fermentación. Nota: puntos con superíndices diferentes a los días son significativamente diferentes. Fuente: elaboración propia.

Respecto a los tratamientos empleados, la adición de las levaduras disminuyó más el pH comparado con el 0% al cabo de 2 días, donde se observan diferencias significativas del 0% respecto a los otros tratamientos (*ver Figura 31 de Anexos*), posterior a este tiempo adquiere una tendencia constante finalizando con unos valores de 3,8 y 3,7 para los tratamientos, sin embargo la fermentación se puede detener entre los días 2 y 4 ya que durante este periodo se tienen resultados óptimos para detener este proceso, puesto que según autores como Medina-Cruz (2018) afirma que rangos entre 3,7 y 4,1 son considerados adecuados para interrumpir la fermentación y llevar acabo el lavado del café. Este decrecimiento está asociado a la actividad metabólica de la levadura, que metaboliza los azúcares presentes en el medio y produce varios compuestos como alcohol, CO₂ y ácidos orgánicos como el acético, láctico y clorogénico; teniendo como efecto la inhibición de microorganismos no deseados que no toleren ambientes ácidos (Ramirez, 2021).

Conjuntamente, en la *Figura 14* se evidencia la evolución de acidez del licor de café al cabo del tiempo.

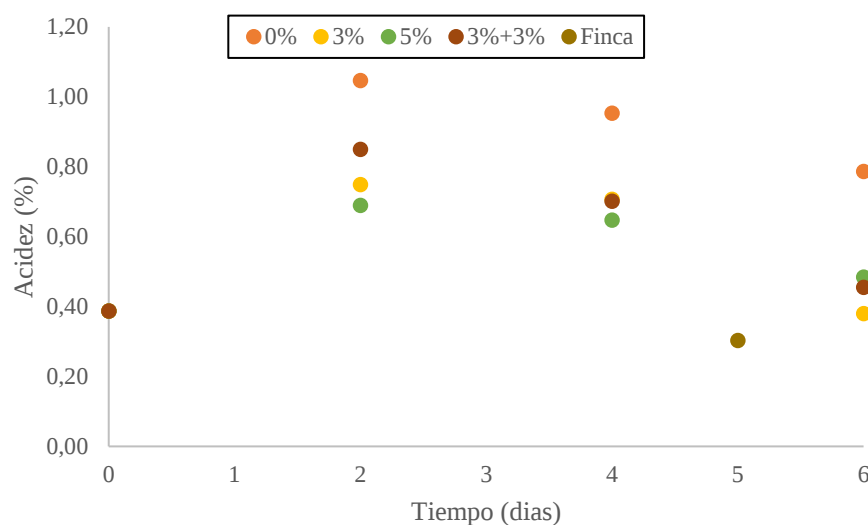


Figura 14. Evolución de acidez durante los días de fermentación. Fuente: elaboración propia.

La fermentación de café puede afectar la acidez del café, así como los atributos sensoriales. Estudios como el de Muñoz *et al.* (2019) que evaluaron las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del café fermentado con rumen y *Saccharomices cerevisiae* han encontrado que la acidez del café fermentado tiene una calificación hedónica entre los atributos sensoriales de la bebida, otros estudios como el de Rivas Hermann (2006), determinaron y cuantificaron los ácidos carboxílicos presentes en el mucílago del café arábica mediante HPLC, del cual la presencia de estos ácidos ha sido relacionada, por un lado, con la aparición de sabores adversos y, por otro lado, con la manifestación de perfiles sensoriales distintivos.

Respecto a la *Figura 14* se aprecia la variación de la acidez en un rango de 0 a 6 días para los tratamientos empleados. Al cabo de los 2 días, la acidez aumenta debido a la disolución del mucílago en el medio acuoso, dado que cuando se diluye el mucílago durante el proceso de la fermentación, los ácidos solubles

presentes se dispersan en un mayor volumen, por ende, la concentración de estos ácidos aumenta en comparación con el mucilago original (Pardo et al., 2022). De igual manera, en el estudio de Pardo et al. (2022) encontraron que el efecto de fermentaciones prolongadas de mucilago de café tiene un efecto directo en el aumento de la acidez que a su vez conlleva en la generación de atributos sensoriales únicos en la bebida. Seguidamente, al cabo de los 2 días la acidez empieza a disminuir a causa del consumo de los ácidos orgánicos por parte del microorganismo puesto que estudios como el de Peñuela-Martínez *et al.* (2018) en la evaluación de diferentes métodos de fermentación café, encontraron que en las condiciones del biorreactor, los tratamientos a 17°C mostraron una ligera disminución de ácido quínico, sugiriendo que en estas condiciones, los microorganismos utilizan este compuesto como sustrato, para sus procesos metabólicos.

9.4.3 Estabilidad microbiológica

Consecutivamente, se midieron los parámetros microbiológicos (BAL, levaduras, mesófilos aerobios, coliformes totales y hongos) del licor de café de los tratamientos.

9.4.3.1 Bacterias lácticas (BAL)

Las BAL son organismos microaerófilos con forma cocoide o bacilar, grampositivos, no pigmentados, no formadores de esporas, no productores de catalasa, ni reductoras de nitritos, que exhiben una amplia variedad de características genéticas (Ladino, 2016). Estas poseen enzimas que les permite desdoblar polisacáridos, lípidos, proteínas y otros compuestos para su posterior transformación en alcoholes, azúcares simples y ácidos (láctico, acético, butírico, cítrico y málico), que influyen en los aromas y sabores agradables del café.

Asimismo, pueden sobrevivir a concentraciones inferiores al 10% de O₂ y cuando la presencia de este es casi nula, fermentan los azúcares iniciando el proceso de fermentación (Samaniego, 2019).

En la *Figura 15* se refleja la evolución de las BAL en los tratamientos, donde posterior al día 0 los tratamientos presentan diferencias significativas (ver *Figura 35 de Anexos*).

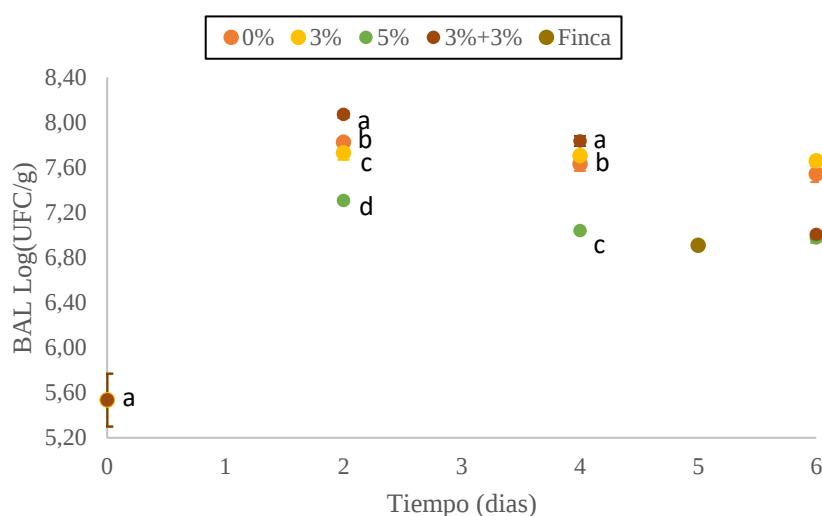


Figura 15. Estabilidad microbiológica de BAL durante la fermentación. Nota: puntos con superíndices diferentes a los días son significativamente diferentes. Fuente: elaboración propia.

De la figura anterior se observa que a partir del día 2, el tratamiento 3%+3% contiene la carga microbiana más alta de BAL, seguida del 0%, esto debido a que posee parte de estos microorganismos encapsulados y que hay menos diferencias significativas conforme pasa el tiempo. De igual forma se evidencia como los tratamientos con más inóculo adicionado alcanzan un pico máximo de crecimiento y después de este, los microorganismos empiezan a morir por la competencia de nutrientes. Por otro lado, dentro las causas que afectan el crecimiento de las BAL está la temperatura interna del grano, pH inicial y final del sustrato, y el tipo de sistema de fermentación empleado, ya que el café puede

estar expuesto al clima y a la colonización microbiana de ambientes invadidos por aire, agua, suelo e insectos que actúan como vectores de microorganismos (Cruz & Pivaral, 2018).

En otro sentido, estudios como el de Samaniego (2019) en la inyección de CO₂ y adición de levaduras, explican que en el crecimiento de BAL los factores que más influyen es el CO₂ y el tiempo, ya que durante este proceso se producen alcoholes, ácidos y CO₂ en cantidades significantes hasta alcanzar una concentración definida de modo que inhiben su crecimiento, asimismo, que la inyección de CO₂ ocasionaba recuentos más bajos. En esa secuencia, Cruz & Pivaral (2018) observaron que la fermentación con sistema abiertos tenía mayor crecimiento microbiano que un sistema cerrado, ya que las temperaturas alcanzadas internamente podrían alcanzar hasta los 45°C y así limitar las condiciones de crecimiento de las BAL. No obstante, en ambos estudios se identifica que el tipo de cepa de levadura no es un factor significativo en el crecimiento de las BAL.

9.4.3.2 Levaduras

Del mismo modo, se realizó el seguimiento de la evolución de las levaduras por Log (UFC/g) al cabo del tiempo. Los datos se registran en la *Figura 16*.

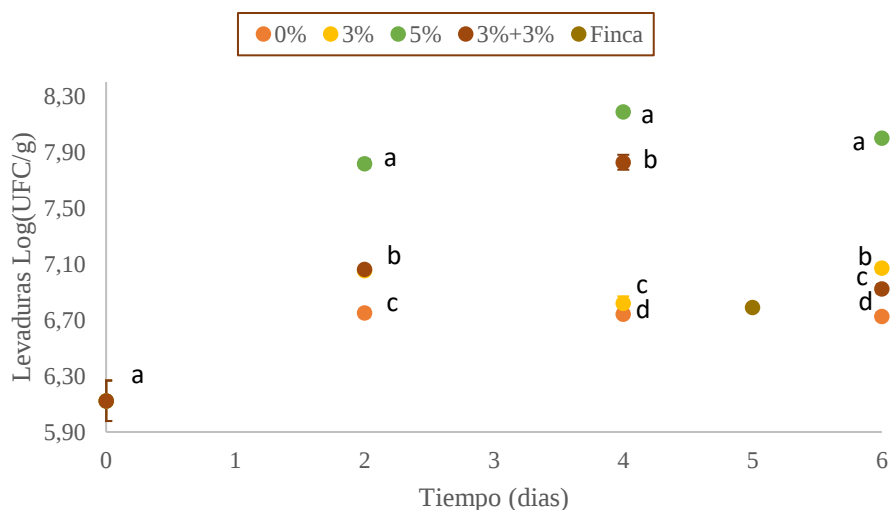


Figura 16. Estabilidad microbiológica de Levaduras durante la fermentación.
 Nota: puntos con superíndices diferentes a los días son significativamente diferentes. Fuente: elaboración propia.

Como se observa en la gráfica de levaduras Log (UFC /g) vs tiempo (días), los tratamientos con adición de levadura muestran mayor concentración de microorganismos a partir de los 2 días, donde se observan diferencias significativas para los diferentes tratamientos (*ver Figura 39 de Anexos*), esto es atribuido al uso del medio sólido de extracto de malta (análisis microbiológico) que posee azúcares simples como la maltosa, glucosa y fructosa que son utilizadas como fuente de energía, facilitando su crecimiento respecto al 0%. En particular, el tratamiento de 5% exhibe una alta concentración microbiana, por motivo de una mayor concentración de levaduras que proporciona un mayor número de metabolitos y enzimas que facilitan la degradación de sustratos y, por lo tanto, promueven un mayor crecimiento, favoreciendo la fermentación (Elhalis *et al.*, 2021). Posterior al día 4 se aprecia un descenso para todos los tratamientos empleados, lo cual puede deberse a la falta de sustratos disponibles, lo que conlleva a competir a los microorganismos entre sí por los pocos nutrientes, generando la muerte de algunos de ellos (Lucero, 2015).

Por otro lado, investigaciones demuestran que existen diferentes factores para el crecimiento y rendimiento óptimo de las levaduras, uno de ellos es el de Anglès *et al.* (2019) sobre la evaluación de diferentes fuentes de azúcar para la segunda fermentación de vinos espumosos. Este estudio ha mostrado que al adicionar una fuente de azúcar simple es posible una correcta fermentación de la botella, uno de estos es la glucosa, que, debido a su fácil estructura química, permite una fácil metabolización por parte de los microorganismos. De igual manera, otro de los factores que afectan el crecimiento de estos microorganismos, son las fuentes de carbono y nitrógeno, dado que Barajas-Solano *et al.* (2020) encontró que al ajustar las fuentes de concentración de carbono y nitrógeno en microalgas, es posible aumentar la producción de biomasa en una cepa de *Scenedesmus sp.*, dado que estos nutrientes le permiten sintetizar nuevos componentes celulares y mantener un metabolismo activo.

9.4.3.3 Mesófilos aerobios y coliformes totales

Los mesófilos aerobios son microorganismos que se pueden encontrar en alimentos y otros materiales orgánicos, estos se caracterizan por que su crecimiento óptimo se da en temperaturas moderadas (30-37°C) y en presencia de oxígeno. El recuento de este tipo de microorganismo permite conocer el grado de contaminación de una muestra (Ramírez Cruz, 2017). En la *Figura 17* se registró la evolución de estos microorganismos durante la fermentación.

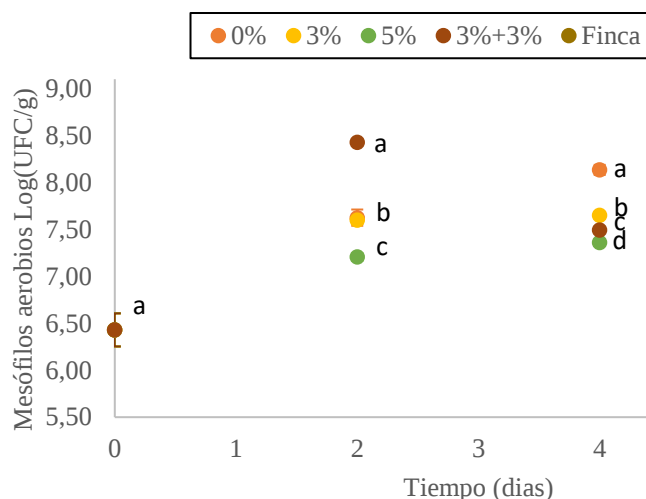


Figura 17. Estabilidad microbiológica de mesófilos aerobios durante la fermentación. Nota: puntos con superíndices diferentes a los días son significativamente diferentes. Fuente: elaboración propia.

Los coliformes totales son un grupo de bacterias que se encuentran en el medio ambiente, estas bacterias son indicadores de la calidad microbiológica del agua y de los alimentos (Vallejo & Castro, 2018). Por otro lado, los coliformes fecales son un subgrupo de las coliformes totales; la presencia de estos microorganismos es un indicador de contaminación fecal ya que estas bacterias pueden causar enfermedades gastro intestinales (Zegarra & Benavente, 2011). En la *Tabla 5*, se observa los resultados obtenidos para los coliformes totales y fecales para todos los tratamientos empleados en el rango de 0 a 6 días de fermentación

Tabla 5. *Coliformes fecales durante la fermentación.*

Tratamiento								
Días	0%		3%		5%		3%+3%	
0	2400>	+	2400>	+	2400>	+	2400>	+
2	2400>	+	210	+	120	+	150	+
4	<3	-	7,3	-	<3	-	<3	-
6	<3	-	6,2	-	<3	-	<3	-
Finca	2400>	+						

Nota: (+): positivo; (-): negativo. Fuente: elaboración propia.

En relación con la *Figura 17* se observa que al cabo de los 2 días la actividad microbiana aumenta donde alcanza un punto máximo para todos los tratamientos, presentando diferencias significativas (*ver Figura 43 de Anexos*), el cual es atribuido por varias razones como la presencia adecuada de temperatura y nutrientes que favorece y multiplica su crecimiento. En ese sentido, en los tratamientos 3%, 5% y 3+3% se presenta un aumento por la adición de inóculo, esto es debido a que tanto las bacterias como levaduras son mesófilas (Ramírez Cruz, 2017), asimismo, el medio empleado para este análisis como el PCA (Plate Count Agar) favorece su crecimiento al tener los sustratos idóneos. Este comportamiento también puede verse reflejado en la Tabla 5 donde se muestra los resultados obtenidos para coliformes fecales dado que al cabo de los 2 días se muestra positivo para todos los tratamientos empleados indicando la presencia de coliformes fecales, posterior a estos días se tienen resultados negativos dado que la presencia de levaduras más bacterias lácticas puede competir con otros microorganismos, incluido los coliformes fecales, por nutrientes. Además, las levaduras pueden producir sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos y péptidos que tienen propiedades inhibitorias sobre estos microorganismos (Susá Gomez, 2015).

Por otro lado, durante la práctica se observaba gas en las campanas de Durham, al adicionar el reactivo Indol (confirmación de presencia de *E. coli*). Sin embargo, se obtenía un resultado negativo puesto que el gas formado era CO₂ generado por las levaduras.

En otro sentido, en el recuento de hongos no se encontró crecimiento al cabo de los 5 días en los tratamientos inoculados con *M. caribbica*, esto confirma

el uso potencial de esta levadura como control fitopatógeno de diferentes especies que pueden afectar el procesamiento del café, tal como se describió en el ítem 9.2.

10. Conclusiones

- ✓ Se eligió la levadura *M. Caribbica* de acuerdo con los parámetros de crecimiento (biomasa, pH, ° Brix, azúcares totales y reductores) presentados.
- ✓ Se encontró que el medio a base de pulpa de café funciona como un reemplazo óptimo del extracto de malta, en el crecimiento de la *M. caribbica*.
- ✓ La *M. Caribbica* resultó una levadura óptima a encapsular, dado el gran porcentaje de está que queda después del proceso, además de su solubilidad y humectabilidad que le permiten un tiempo de liberación de 5 minutos para la fermentación.
- ✓ La adición de la levadura *M. caribbica* en la fermentación del café demostró tener una influencia positiva en términos de tiempo de fermentación, condiciones fisicoquímicas y estabilidad microbiológica. Estos hallazgos respaldan el uso de esta levadura como una opción prometedora para mejorar el proceso de fermentación del café y obtener un producto de mayor calidad sensorial.
- ✓ La viabilidad económica de llevar a cabo la microencapsulación es un asunto que requiere un análisis detallado, sin embargo, adoptar esta nueva tecnología permitirá a los caficultores beneficios significativos en términos de mejora en la calidad sensorial del café, facilidad de manejo en campo de los cultivos y la eficiencia en la fermentación.

11. Referencias

Al-Ghouti, M. A., AlHusaini, A., Abu-Dieyeh, M. H., Abd Elkhabeer, M., & Alam, M. M. (2020). Determination of aflatoxins in coffee by means of ultra-high performance liquid chromatography-fluorescence detector and fungi isolation. *International*

Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1–16.

- Alvarado, G., Posada, H. E., & Cortina, H. A. (2013). *Castillo: Nueva variedad de café con resistencia a la roya*. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).
- Amaiike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 107–133.
- Anglès, G., Carbó Moliner, R., Gordún Quiles, E., & Ginovart Gisbert, M. (2019). Evaluación de diferentes fuentes de azúcar para la segunda fermentación de los vinos espumosos tipo cava. *Enovicultura*, 60, 10–23.
- Arboleda-Murillo, J. A., Cañon-Ibarra, A. F., Baena-Jurado, N., Sanchez, L. T., & Villa, C. C. (2022). Caracterización del almidón de plátano pompo rayado (Mussa Manini). *Revista de Investigaciones Universidad Del Quindío*, 34(S4), 43–47.
- Arellano Galicia, L. J. (2019). *Detección de hongos e identificación de micotoxinas en granos de maíz almacenados*.
- Arias, F., Ruiz, A., & Londoño, J. (2018). Análisis del mercado de cafés especiales y el posicionamiento colombiano en las nuevas tendencias mundiales. *Journal of Research, Education and Society*, 1–4.
- Ayu, N. P. F., Nurhayati, N., Thontowi, A., Kusdiyantini, E., Kanti, A., & Hermiati, E. (2021). Produksi Xilitol Menggunakan Hidrolisat Tongkol Jagung (*Zea mays*) Oleh *Meyerozyma caribbica* InaCC Y67. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 23(1), 71–77.
- Barajas-Solano, A. F., Guarín-Villegas, E., Remolina-Páez, L. M., Bermúdez-Castro, J. P., Mogollón-Londoño, S. O., Contreras-Roperó, J. E., & García-Martínez, J. B. (2020). Efecto de la relación carbono/Nitrógeno en la producción de carotenoides en microalgas. *Ingeniería y Competividad*, 22(1), NA-NA.

- Bautista-Rosales, P. U., Calderon-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvarez, N. A., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2013). Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological Control*, 65(3), 293–301.
- Betancur, J., & Zurita, M. S. (2020). *Evaluación de la fermentación controlada con inoculación de levaduras (Saccharomyces cerevisiae) y su efecto en la calidad del café (Coffea arabica)*. 3–4, 17.
- Borrás-Sandoval, L. M., & Torres-Vidales, G. (2016). Producción de alimentos para animales a través de fermentación en estado sólido–FES. *Orinoquia*, 20(2), 49.
- Bozkurt, H., & Erkmen, O. (2002). Formations of biogenic amines in Turkish style sausage during ripening and storage periods. *Journal of Food Quality*, 25(4), 317–332.
- Bressani, A. P. P., Martinez, S. J., Evangelista, S. R., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2018). Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. *LWT*, 92, 212–219.
- Briceño-Veléz, D. (2020). *Efecto de las bacterias lácticas microencapsuladas en la calidad microbiológica y en las propiedades fisicoquímicas de salchichas cocidas*. 27–28.
- Camizán Jaramillo, R. E. (2020). *Evaluación del tiempo de fermentación de café (Coffea Arábica L.), en relación a la calidad organoléptica*. 16.
- Carranza-Mesén, F., Blanco-Meneses, M., del Milagro Granados-Montero, M., & Meneses, M. V. (2022). Especies de *Aspergillus* asociadas a granos de maní (*Arachis hypogaea* L.) y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados en Costa Rica.

Agronomy Mesoamerican, 33(Especial), 50810.

Castro, N. M. C., & Fajardo, J. E. G. (2016). Caracterización de los procesos tradicionales de fermentación de café en el departamento de Nariño. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 14(2), 2, 77.

Chiara, F. E. (2019). *Aislamiento, identificación y evaluación de la resistencia antimicrobiana de Escherichia coli en pollos de engorde*. 16.

Correa, J. M. (2019). *Caracterización del crecimiento in vitro del hongo Neofabrae vagabunda, agente causal de la enfermedad “ojo de buey” en manzanas*. 11.

Cortês, M., De Haas, A., Unterbusch, R., Fujimori, A., Schütze, T., Meyer, V., & Moeller, R. (2020). *Aspergillus niger* spores are highly resistant to space radiation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 560.

Cruz-Choappa, R., & Vieille, P. (2021). *Syncephalastrum racemosum* Cohn. *Revista Chilena de Infectología*, 38(3), 381–382.

Cruz de la Cruz, V. de la. (2018). *Efecto de las matrices biopoliméricas en la cinética de liberación in vitro de antioxidantes microencapsulados con membranas líquidas y sólidas*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Cruz, J. E., & Pivaral, R. O. (2018). *Evaluación del efecto de Saccharomyces cerevisiae sobre la caracterización sensorial del café en dos sistemas de fermentación*. 3–7, 18–19.

Cruz O’Byrne, R. (2021). *Caracterización de la diversidad microbiana presente en el proceso de fermentación de Coffea arabica L. y su influencia en la calidad sensorial de la bebida en la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM)* (p. 17). Universidad del Magdalena.

- de Melo Pereira, G. V., Neto, E., Soccol, V. T., Medeiros, A. B. P., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2015). Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research International*, 75, 348–356.
- Domijan, A.-M., Marjanović Čermak, A. M., Vulić, A., Tartaro Bujak, I., Pavičić, I., Pleadin, J., Markov, K., & Mihaljević, B. (2019). Cytotoxicity of gamma irradiated aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(3), 155–162.
- Du, R., Pei, F., Kang, J., Zhang, W., Wang, S., Ping, W., Ling, H., & Ge, J. (2022). Analysis of the structure and properties of dextran produced by *Weissella confusa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1.
- Duarte Serrano, A. (2016). *Cafés especiales: una oportunidad en el mercado global*. 18.
- Durand, N., El Sheikha, A., Fontana-Tachon, A., & Montet, D. (2009). *Dynamics and biodiversity of microorganisms (fungi, yeast and bacteria) by PCR-DGGE, influencing OTA production on coffee beans*.
- Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., & Zhao, J. (2021). Microbiological and chemical characteristics of wet coffee fermentation inoculated with *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kudriavzevii* and their impact on coffee sensory quality. *Frontiers in Microbiology*, 12, 713969.
- Esquivel-González, B. E., Martínez, L. A. O., & Rutiaga-Quiñones, O. M. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(2), 180–192.
- Fernández-Cortés, Y., Sotto-Rodríguez, K. D., & Vargas-Marín, L. A. (2020). Impactos

ambientales de la producción del café, y el aprovechamiento sustentable de los residuos generados. *Producción+ Limpia*, 15(1), 100.

Figuerola Acedo, R. (2019). *Efecto de la agitación mecánica en la fermentación alcohólica de extracto malta* (pp. 35–39). Figuerola Acedo, Rubén.

Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 365–371.

Granados, C., Torrenegra, M. E., Acevedo, D., & Romero, P. (2013). Evaluación fisicoquímica y microbiológica del aperitivo vínico de lulo (*Solanum quitoense* L.). *Información Tecnológica*, 24(6), 35–40.

Guerra González, M. C., & Rueda Silva, D. C. (2021). *Producción de una biopelícula a partir de las pectinas extraídas del mucílago de café* (pp. 17–18). Fundación Universidad de América.

Hawaz, E., Tafesse, M., Tesfaye, A., Kiros, S., Beyene, D., Kebede, G., Boekhout, T., Groenwald, M., Theelen, B., & Degefe, A. (2023). Optimization of bioethanol production from sugarcane molasses by the response surface methodology using *Meyerozyma caribbica* isolate MJTm3. *Annals of Microbiology*, 73(1), 4.

Jiménez González, O. (2017). *Obtención, evaluación de pigmentos microencapsulados a partir de frutos xkijit (Renealmia alpinia) e incorporación en una matriz alimenticia* (p. 25). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Judakova, Z., Radil, R., Janousek, L., & Pobocikova, I. (2023). Sensitivity of Cell Cultures on Time-Varying Low-Frequency Magnetic Field Changes. *Applied*

Sciences, 13(3), 1777.

- Kaur, S., Guleria, P., & Yadav, S. K. (2023). Evaluation of Fermentative Xylitol Production Potential of Adapted Strains of *Meyerozyma Caribbica* and *Candida Tropicalis* from Rice Straw Hemicellulosic Hydrolysate. *Fermentation*, 9(2), 181.
- Köprüalan, Ö., İlter, I., Akyıl, S., Koç, M., & Kaymak Ertekin, F. (2022). Improving the stability of oily turmeric extract by microencapsulation using spray drying technique. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 43(14), 2240–2249.
- Ladino, W. (2016). *Caracterización de las bacterias ácido lácticas (BAL), hongos y levaduras que inciden durante el proceso de fermentación de café arábica (Coffea arabica) y su influencia en el análisis sensorial y calidad de la taza* (pp. 38–41). UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA.
- Ladino, W., Cortés, E. T., Gutiérrez, N., & Amorocho, C. (2016). Calidad de taza de café (*Coffea arabica* L.) procesado en fermentación semi-seca. *Agronomía Colombiana*, 34(1 supl), S281–S283.
- López, O. L. O., & Alvarez-Herrera, L. M. (2017). Tendencia de la producción y el consumo del café en Colombia. *Apuntes Del CENES*, 36(64), 143–145.
- Lucero, P. D. (2015). *Efecto del uso de levaduras y concentración de Brix en las características fisicoquímicas y sensoriales de vino de fresa con miel*.
- Mahingsapun, R., Tantayotai, P., Panyachanakul, T., Samosorn, S., Dolsophon, K., Jiamjariyatam, R., Lorliam, W., Srisuk, N., & Krajangsang, S. (2022). Enhancement of Arabica coffee quality with selected potential microbial starter culture under controlled fermentation in wet process. *Food Bioscience*, 48.
- Maman, M., Sangchote, S., Piasai, O., Leesutthiphonchai, W., Sukorini, H., &

- Khewkhom, N. (2021). Storage fungi and ochratoxin A associated with arabica coffee bean in postharvest processes in Northern Thailand. *Food Control*, 130, 108351.
- Martins, P. M. M., Batista, N. N., Santos, L. D., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2022). Microencapsulation of epiphytic coffee yeasts by spray drying using different wall materials: Implementation in coffee medium. *International Journal of Food Microbiology*, 379, 109839.
- Medina-Cruz, D. (2018). *Evaluación de procesos de fermentación natural del café* (pp. 2–4).
- Menco Tapia, Y. (2020). *Estudio del comportamiento cinético de hongos y su relación con las características fisicoquímicas en el proceso de fermentación del mucílago de café (Coffea Arabica L.) en la Sierra Nevada de Santa Marta*.
- MinAgricultura. (2020). *Cosecha cafetera de 2020 cerraría con un valor de \$9 billones, superior en 20% a 2019 y una de las más altas en 20 años*.
- Minciencias. (2021). *Fortalecimiento de la competitividad de los cafés especiales del Centro del Valle del Cauca- CAFINNOVA VALLE* (pp. 16–35).
- Moran-Mejía, A. F., Guillén-Garcés, R. A., Moeller-Chávez, G. E., Hernández-Romano, J., Chávez-Béjar, M. I., Olvera-Carranza, C., & Treviño-Quintanilla, L. G. (2021). Potencial de la levadura oleaginosa *Clavispora lusitaniae* Hi2 en la conversión de residuos agroindustriales a lípidos. *Revista Iberoamericana de Micología*.
- Moran Carpio, N. de J. (2023). *Manejo de los factores de producción del cultivo de café (Coffea arabica) en el Ecuador*. BABAHOYO: UTB, 2023.
- Muhialdin, B. J., Algboory, H. L., Kadum, H., Mohammed, N. K., Saari, N., Hassan, Z.,

- & Hussin, A. S. M. (2020). Antifungal activity determination for the peptides generated by *Lactobacillus plantarum* TE10 against *Aspergillus flavus* in maize seeds. *Food Control*, 109, 106898.
- Muñoz, S. V. O., Ramírez, M. S., & Cachay, N. O. (2019). Evaluación fisicoquímica y organoléptica de café (*Coffea arabica* L.) fermentado con rumen y *Saccharomyces cerevisiae* a diferente temperatura. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(2), 9–16.
- Nthimole, C. T., Kaseke, T., & Fawole, O. A. (2022). Micro-Encapsulation and Characterization of Anthocyanin-Rich Raspberry Juice Powder for Potential Applications in the Food Industry. *Processes*, 10(5), 1038.
- Osaba, M., Castro, S. N. C., Becerra, G. J. U., Santana, L. A. S., Gutiérrez, J. A. M., & Vinueza, C. C. V. (2021). Queratoplastia penetrante en un paciente con queratitis micótica mixta por *penicillium* y *fusarium*. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(4), 4892–4899.
- Oyarzo, P. V., & Choappa, R. C. (2020). Diagnóstico de *Cunninghamella bertholletiae* Stadel. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(4), 1–10.
- Palacio, M., & Ramírez, L. (2020). *Efecto de macronutrientes en la producción de biomasa de Amauroderma omphalodes en cultivo sumergido*. Universidad Eafit.
- Pardo, L. M. F., Castillo, N. V., Durán, Y. M. V., Rosero, J. A. J., & Moreno, J. A. L. (2022). Comprehensive analysis of ethanol production from coffee mucilage under sustainability indicators. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 182, 109183.
- Paucar Barreno, C. A. (2016). *Caracterización de una bebida nutritiva y biomasa para*

- alimentación animal mediante fermentación sumergida con microorganismos tibetanos*. (pp. 4–5). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Peñuela-Martínez, A. E., Zapata-Zapata, A. D., & Durango-Restrepo, D. L. (2018). *Performance of different fermentation methods and the effect on coffee quality (Coffea arabica L.)*.
- Pérez, H., Bueno, G., Brizuela, M., Tortoló, K., & Gastón, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 47(1), 14–25.
- Prado, E. E., Rosado, O. R., Colmenero, A. Z., & Hernández, V. A. G. (2015). Calidad en variedades de café orgánico en tres regiones de México. *Revista de Geografía Agrícola*, 55, 49.
- Puerta, G. I. (2013a). *Factores procesos y controles en la fermentación del café*. 1–2.
- Puerta, G. I. (2013b). *Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café*. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).
- Puerta, G. I. (2015). *Cinética química de la fermentación del mucílago de café a temperatura ambiente*. 43–57.
- Puerta, G. I., & Echeverry, J. G. (2015). *Fermentación controlada del café: Tecnología para agregar valor a la calidad*. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).
- Puerta, G. I., Marín, J., & Osorio, G. A. (2015). *Microbiología de la fermentación del mucílago de café según su madurez y selección*. 5, 15–17.
- Ramírez Cruz, K. A. (2017). *Determinación de Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales en el cultivo de espinaca (Spinacia oleracea L.), producido en*

tres municipios del Estado de México.

- Ramírez, S. (2021). *Influencia de la adición de un probiótico y prebiótico en la vida útil de una bebida funcional a base de manzana (Malus domestica) y kiwi (Actinidia deliciosa)*. Universidad Agraria del Ecuador.
- Ramos, J. (2019). *Biocontrol de "Penicillium" alterantes y micotoxigénicos en queso madurado (tipo Castellano) mediante el uso de bacterias ácido-lácticas como cultivos protectores*. Universidad de León.
- Reyna, E. N., Álvarez, G. M., Iliná, A., & Hernández, J. L. M. (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigación y Ciencia*, 23(66), 65.
- Ríos, J. (2021). *Obtención de micro cápsulas de mucílago de café mediante secado por aspersión usando almidón de plátano modificado químicamente y maltodextrina*. 33.
- Riquelme Toledo, F. A. (2023). *Encapsulación y evaluación de la cepa de Pichia kluyveri YCPUC83 en co-fermentaciones con S. cerevisiae EC1118 en mosto sintético*.
- Rivas Hermann, R. (2006). *Determinación y cuantificación mediante HPLC de los ácidos carboxílicos del mucílago de Coffea arabica a diferentes pH durante la etapa de fermentación*. Universidad Centroamericana.
- Rodríguez, N. (2015). *Producción de alcohol a partir de la pulpa de café*. 85–86.
- Rosero, P. Y. G., Sánchez, S. A. M., & Narváez, I. E. P. (2015). Caracterización física de café especial (Coffea Arabica) en el municipio de Chachagüí (Nariño, Colombia). *Revista Lasallista de Investigación*, 12(3), 90–98.
- Salazar, B. M. V., Monroy, C. A. R., & Ramírez, L. A. B. (2022). Determinación del pH y tiempo de fermentación teniendo en cuenta la temperatura ambiental durante el

- beneficio de café de variedad castillo. *Revista Matices Tecnológicos*, 14, 19–24.
- Samaniego, M. A. (2019). *Evaluación de maceración carbónica y adición de levaduras (Saccharomyces cerevisiae) durante el lavado de café Geisha (Coffea arabica)*. 3–6, 21.
- Sanchez De La Cruz, I. G. (2018). *Efecto de la adición de levadura (saccharomyces sp) en el proceso de fermentación de café (coffea arábica)*. 10, 13, 18, 30.
- Santos, S. (2023). *Evaluación morfológica de genotipos de café arábigo (Coffea arábica L) en la aplicación de tres láminas de riego*. Jipijapa-Unesum.
- Serna, J., Torres, L., Martínez, K., & Hernández, M. (2018). Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. *Revista Ion*, 31(1), 40.
- Shaharuddin, S., & Muhamad, I. I. (2015). Microencapsulation of alginate-immobilized bagasse with Lactobacillus rhamnosus NRRL 442: Enhancement of survivability and thermotolerance. *Carbohydrate Polymers*, 119, 173–181.
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 50(1), 21.
- Sunmonu, M. O., & Sanusi, M. S. (2022). Prospects and Challenges in Food-Grade Enzymes Industrial Production. *Novel Food Grade Enzymes: Applications in Food Processing and Preservation Industries*, 439–453.
- Susá Gomez, J. M. (2015). *Aplicación sinérgica de agentes orgánicos en la inhibición y reducción de carga microbiana para harinas de pescado para exportación*. Espol.
- Tadioto, V., Milani, L. M., Barrilli, É. T., Baptista, C. W., Bohn, L., Dresch, A., Harakava, R., Fogolari, O., Mibielli, G. M., & Bender, J. P. (2022). Analysis of

- glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(2), 35.
- Tangarife, D. P. C., Arias, L. P. P., & Zapata, A. M. O. (2021). Aspectos tecnológicos de la microencapsulación de compuestos bioactivos en alimentos mediante secado por aspersión. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(1), 2–3.
- Titisunta Vaca, B. E. (2023). *Evaluación del efecto de diferentes tipos de fermentación sobre la calidad de café (Coffea arabica L. var. típica y caturra)*.
- Torres, M. del R. (2018). Evaluación tecnológica del proceso de obtención de biomasa de microorganismos probióticos en medio de cultivo formulado con suero lácteo suplementado. *Departamento de Ingeniería Química*, 5, 16–18, 28.
- Turhan, E., Erginkaya, Z., Polat, S., & Özer, E. A. (2017). Design of probiotic dry fermented sausage (sucuk) production with microencapsulated and free cells of *Lactobacillus rhamnosus*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41(5), 598–603.
- Vallejo, C. F. C., & Castro, J. C. J. (2018). Modelación de la concentración de coliformes fecales en el río Bermúdez, municipio de Chachagüí, Nariño. *Boletín Informativo CEI*, 5(3), 81–86.
- Vega-Oliveros, C., Rico-Rodríguez, F., & Nieto-Ramírez, I. (2022). Aspectos sensoriales de un néctar de fruta con adición de micelios obtenidos por fermentación sumergida. *Revista Ing-Nova*, 1(1), 33.
- Velásquez-Agudelo, C., & Trávez-Velásquez, M. (2019). *Café especial, una alternativa para el sector cafetero en Colombia* (pp. 15, 17). Universidad EAFIT.

- Velez, E. M., Saturno, R. P., Marson, G. V., & Hubinger, M. D. (2021). Spent brewer's yeast proteins and cell debris as innovative emulsifiers and carrier materials for edible oil microencapsulation. *Food Research International*, 140, 109853.
- Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S. (2021). High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1196.
- Xu, B., Zhang, H., Chen, K., Xu, Q., Yao, Y., & Gao, H. (2013). Biocontrol of postharvest *Rhizopus* decay of peaches with *Pichia caribbica*. *Current Microbiology*, 67, 255–261.
- Yara. (2016). *Glosario del café*.
- Young, G. D., Rodríguez, F. J., & Piedra, J. M. S. (2019). Ocratoxina A en café. *Revista Ciencia y Salud Integrando Conocimientos*, 3(3), 22.
- Zegarra, J. C. E. C., & Benavente, O. A. R. (2011). Control de calidad microbiológico, identificado presencia de coliformes fecales en la leche fresca recepcionada por las ie del programa del PRONAA-TACNA 2010. *Revista Medica Basadrina*, 5(2), 6–7.

Anexos

A continuación, se presentan los análisis estadísticos realizados en MiniTab versión 20,3 de los distintos factores en cada tiempo:

- ° Brix

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,000000	0,000000	0,00	1,000		
Error	8	0,026667	0,003333				
Total	11	0,026667					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	4,93333	A
3,0%	3	4,93333	A
5,0%	3	4,93333	A
6,0%	3	4,93333	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 18. Análisis estadístico de ° Brix a los 0 días.

FERMENTACION DEL GRANO DE CAFÉ 85

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	6,1758		2,05861		107,41	0,000
Error	8	0,1533		0,01917			
Total	11	6,3292					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
6,0%	3	7,03333	A
5,0%	3	6,30000	B
3,0%	3	6,00000	B
0,0%	3	5,03333	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 19. Análisis estadístico de ° Brix a los 2 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,5225		0,17417		9,95	0,004
Error	8	0,1400		0,01750			
Total	11	0,6625					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3,0%	3	5,50000	A
5,0%	3	5,46667	A
0,0%	3	5,06667	B
6,0%	3	5,06667	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 20. Análisis estadístico de ° Brix a los 4 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,44250		0,147500		25,29	0,000
Error	8	0,04667		0,005833			
Total	11	0,48917					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
5,0%	3	5,36667	A
6,0%	3	5,26667	A
3,0%	3	5,06667	B
0,0%	3	4,86667	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 21. Análisis estadístico de ° Brix a los 6 días.

- Azúcares reductores

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,000000		0,000000		0,00	1,000
Error	8	0,000008		0,000001			
Total	11	0,000008					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	0,158231	A
3,0%	3	0,158231	A
5,0%	3	0,158231	A
6,0%	3	0,158231	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 22. Análisis estadístico de azúcares reductores a los 0 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,062231		0,020744		10072,75	0,000
Error	8	0,000016		0,000002			
Total	11	0,062247					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
6,0%	3	0,206974	A
0,0%	3	0,111970	B
3,0%	3	0,052523	C
5,0%	3	0,016708	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 23. Análisis estadístico de azúcares reductores a los 2 días.

FERMENTACION DEL GRANO DE CAFÉ 86

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,000436		0,000145		83,82	0,000
Error	8	0,000014		0,000002			
Total	11	0,000450					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	0,0224332	A
3,0%	3	0,0094950	B
6,0%	3	0,0085001	B
5,0%	3	0,0077540	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 24. Análisis estadístico de azúcares reductores a los 4 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,000477		0,000159		209,23	0,000
Error	8	0,000006		0,000001			
Total	11	0,000483					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	0,0164641	A
3,0%	3	0,0055155	B
5,0%	3	0,0012874	C
6,0%	3	0,0007900	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 25. Análisis estadístico de azúcares reductores a los 6 días.

- Azúcares totales:

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,000000		0,000000		0,00	1,000
Error	8	0,000005		0,000001			
Total	11	0,000005					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	0,0685615	A
3,0%	3	0,0685615	A
5,0%	3	0,0685615	A
6,0%	3	0,0685615	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 26. Análisis estadístico de azúcares totales a los 0 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,034227		0,011409		23369,01	0,000
Error	8	0,000004		0,000000			
Total	11	0,034231					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
5,0%	3	0,209915	A
6,0%	3	0,204287	B
0,0%	3	0,180728	C
3,0%	3	0,077592	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 27. Análisis estadístico de azúcares totales a los 2 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,003495		0,001165		3126,71	0,000
Error	8	0,000003		0,000000			
Total	11	0,003498					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3,0%	3	0,0592688	A
6,0%	3	0,0484055	B
0,0%	3	0,0289039	C
5,0%	3	0,0151612	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 28. Análisis estadístico de azúcares totales a los 4 días.

FERMENTACION DEL GRANO DE CAFÉ 87

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,001500		0,000500		1296,92	0,000
Error	8	0,000003		0,000000			
Total	11	0,001503					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
6,0%	3	0,0429084	A
0,0%	3	0,0218363	B
3,0%	3	0,0200039	C
5,0%	3	0,0129362	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 29. Análisis estadístico de azúcares totales a los 6 días.

- pH

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,000000		0,000000		0,00	1,000
Error	8	0,017067		0,002133			
Total	11	0,017067					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	4,96333	A
3,0%	3	4,96333	A
5,0%	3	4,96333	A
6,0%	3	4,96333	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 30. Análisis estadístico de pH a los 0 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,160067		0,053356		98,50	0,000
Error	8	0,004333		0,000542			
Total	11	0,164400					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	3,88667	A
3,0%	3	3,70333	B
5,0%	3	3,62000	C
6,0%	3	3,59000	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 31. Análisis estadístico de pH a los 2 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,032825		0,010942		32,83	0,000
Error	8	0,002667		0,000333			
Total	11	0,035492					

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3,0%	3	3,83667	A
5,0%	3	3,76333	B
6,0%	3	3,72667	B C
0,0%	3	3,69667	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 32. Análisis estadístico de pH a los 4 días.

FERMENTACION DEL GRANO DE CAFÉ 88

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,041825	0,013942	30,42	0,000
Error	8	0,003667	0,000458		
Total	11	0,045492			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3,0%	3	3,88333	A
0,0%	3	3,84333	A B
5,0%	3	3,82667	B
6,0%	3	3,72333	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 33. Análisis estadístico de pH a los 6 días.

- Bacterias lácticas (BAL)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,000000	0,000000	0,00	1,000
Error	8	0,344489	0,043061		
Total	11	0,344489			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	5,53402	A
3,0%	3	5,53402	A
5,0%	3	5,53402	A
6,0%	3	5,53402	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 34. Análisis estadístico de bacterias lácticas a los 0 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,913849	0,304616	279,70	0,000
Error	8	0,008713	0,001089		
Total	11	0,922562			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
6,0%	3	8,06898	A
0,0%	3	7,82338	B
3,0%	3	7,73005	C
5,0%	3	7,30456	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 35. Análisis estadístico de bacterias lácticas a los 2 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	1,12019	0,373396	298,53	0,000
Error	8	0,01001	0,001251		
Total	11	1,13019			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
6,0%	3	7,83555	A
3,0%	3	7,70442	B
0,0%	3	7,63124	B
5,0%	3	7,03869	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 36. Análisis estadístico de bacterias lácticas a los 4 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	1,14256	0,380852	216,85	0,000
Error	8	0,01405	0,001756		
Total	11	1,15661			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3,0%	3	7,65863	A
0,0%	3	7,54108	B
6,0%	3	7,00414	C
5,0%	3	6,97333	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 37. Análisis estadístico de bacterias lácticas a los 6 días.

- **Levaduras****Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,000000	0,000000	0,00	1,000
Error	8	0,130828	0,016354		
Total	11	0,130828			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	6,12307	A
3,0%	3	6,12307	A
5,0%	3	6,12307	A
6,0%	3	6,12307	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 38. Análisis estadístico de levaduras a los 0 días.**Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	1,86010	0,620034	1189,99	0,000
Error	8	0,00417	0,000521		
Total	11	1,86427			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
5,0%	3	7,81680	A
6,0%	3	7,06168	B
3,0%	3	7,05286	B
0,0%	3	6,75021	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 39. Análisis estadístico de levaduras a los 2 días.**Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	4,71238	1,57079	1280,90	0,000
Error	8	0,00981	0,00123		
Total	11	4,72219			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
5,0%	3	8,18805	A
6,0%	3	7,82650	B
3,0%	3	6,82035	C
0,0%	3	6,74274	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 40. Análisis estadístico de levaduras a los 4 días.**Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	2,86224	0,954081	1488,46	0,000
Error	8	0,00513	0,000641		
Total	11	2,86737			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
5,0%	3	7,99837	A
3,0%	3	7,06998	B
6,0%	3	6,92192	C
0,0%	3	6,72652	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 41. Análisis estadístico de levaduras a los 6 días.- **Mesófilos aerobios****Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0,000000	0,000000	0,00	1,000
Error	8	0,194807	0,024351		
Total	11	0,194807			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	6,42957	A
3,0%	3	6,42957	A
5,0%	3	6,42957	A
6,0%	3	6,42957	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 42. Análisis estadístico de mesófilos aerobios a los 0 días.

FERMENTACION DEL GRANO DE CAFÉ 90

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	2,35985	0,786616	386,14	0,000
Error	8	0,01630	0,002037		
Total	11	2,37615			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
6,0%	3	8,42728	A
0,0%	3	7,62555	B
3,0%	3	7,60170	B
5,0%	3	7,20663	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 43. Análisis estadístico de mesófilos aerobios a los 2 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	1,02223	0,340744	445,35	0,000
Error	8	0,00612	0,000765		
Total	11	1,02835			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0,0%	3	8,13397	A
3,0%	3	7,65300	B
6,0%	3	7,49581	C
5,0%	3	7,36152	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 44. Análisis estadístico de mesófilos aerobios a los 4 días.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	2,78866	0,929554	190,27	0,000
Error	8	0,03908	0,004885		
Total	11	2,82775			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3,0%	3	7,80529	A
5,0%	3	7,54300	B
0,0%	3	7,51828	B
6,0%	3	6,53963	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 45. Análisis estadístico de mesófilos aerobios a los 6 días.