



**Impacto de la fermentación controlada sobre el perfil de taza del café producido en la Finca  
La Manchuria**

Yamid Andrés Yepes Londoño

Trabajo de grado presentado para optar al título de Ingeniero Químico

Asesoras

Mariana Peñuela Vásquez, Doctor (PhD) en Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos

Luisa Fernanda Patiño Cervantes, Magíster (MSc) en Ingeniería Química

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Química

Medellín, Antioquia, Colombia

2024

Cita	Yepes Londoño [1]
<b>Referencia</b>	[1] Y.A. Yepes Londoño, “Impacto de la fermentación controlada sobre el perfil de taza del café producido en la Finca La Manchuria”, Trabajo de grado profesional, Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia, 2024.
Estilo IEEE (2020)	



Grupo de Investigación Bioprocesos



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo con especial afecto a mi madre y mi hermano, quienes han sido mi apoyo constante. A Tommy, el ser que estuvo a mi lado en todo momento. A mi pareja, que llegó a mi vida para mostrarme un camino más allá de los miedos. A todas las personas que me han enseñado a creer en mí mismo y han contribuido de diversas formas para que este proyecto llegue a un feliz término. Para todos ustedes.

## **Agradecimientos**

Expreso mi profundo agradecimiento a la Universidad de Antioquia por brindarme la valiosa oportunidad de formarme como profesional en el apasionante campo de las ciencias aplicadas. Mis más sinceros agradecimientos a mis tutoras, cuya paciencia infinita y guía constante fueron fundamentales en este arduo camino de aprendizaje. Agradezco especialmente a la Dra. Mariana

Peñuela por inspirarme a desplegar mis alas y volar alto.

Quiero extender mi gratitud a todos los miembros del grupo de investigación Bioprocesos, quienes contribuyeron significativamente a mi formación con sus conocimientos y enseñanzas.

Mi reconocimiento también se dirige a mi familia, cuyo apoyo y dedicación han sido inquebrantables a lo largo de mi vida.

Este logro no hubiera sido posible sin el respaldo de todas estas personas y estoy profundamente agradecido por su contribución a mi crecimiento académico y profesional.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	13
<b>ABSTRACT</b>	14
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	15
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	18
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	20
<b>IV. OBJETIVOS</b>	21
<b>A. Objetivo general</b>	21
<b>B. Objetivos específicos</b>	21
<b>V. HIPÓTESIS</b>	22
<b>VI. MARCO TEÓRICO</b>	23
<b>A. Generalidades del café</b>	23
<b>B. Condiciones de cultivo</b>	23
1. Temperatura	23
2. Precipitaciones	23
3. Altitud	23
4. Suelo	24
<b>C. Floración y desarrollo del grano</b>	24
<b>D. Procesamiento del grano</b>	25
1. Cosechamiento	25
2. Tratamiento poscosecha	27
<b>E. Secado</b>	34
<b>F. Tostión</b>	34
1. Proceso de secado (hasta 150 °C)	35

2.	<b>Etapa inicial de tostado (150 °C–180 °C)</b>	35
3.	<b>Tostión – Etapa 2 (180 °C–230 °C)</b>	36
4.	<b>Tostión – Etapa 3 (Por encima de 230 °C)</b>	37
<b>VII.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	38
A.	<b>Identificación de las posibles fuentes de contaminación durante el proceso de beneficio húmedo implementado in situ.</b>	38
B.	<b>Caracterización de la fermentación espontánea en el sitio de beneficio.</b>	38
1.	<b>Caracterización biológica.</b>	39
2.	<b>Caracterización química.</b>	40
C.	<b>Caracterización del mucílago</b>	40
D.	<b>Fermentación en Biorreactor</b>	40
E.	<b>Cultivo de microorganismos para realizar los ensayos de fermentación controlada.</b>	41
F.	<b>Determinación de la capacidad de adaptación de los microorganismos al medio de fermentación</b>	41
G.	<b>Determinación de la capacidad pectinolítica de los microorganismos.</b>	42
H.	<b>Determinación de la presencia de microorganismos fermentadores de pentosas.</b>	42
I.	<b>Evaluación método de esterilización in situ.</b>	43
J.	<b>Fermentación controlada.</b>	43
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	45
A.	<b>Identificación de las posibles fuentes de microorganismos en el proceso de beneficio.</b>	45
B.	<b>Caracterización química del mucílago</b>	54
C.	<b>Caracterización química fermentación espontánea</b>	55
D.	<b>Caracterización biológica fermentación espontánea</b>	63
E.	<b>Fermentación en Biorreactor</b>	66

<b>F. Determinación de la capacidad de adaptación de los microorganismos al medio sintético de fermentación</b>	69
<b>1. Comportamiento cinético de la biomasa</b>	70
<b>2. Cinética de azúcares</b>	74
<b>K. Determinación capacidad de hidrólisis de las pectinas por parte de los microorganismos evaluados</b>	76
<b>G. Determinación presencia microorganismos fermentadores de pentosas</b>	79
<b>H. Evaluación esterilización in situ</b>	82
<b>I. Evaluación fermentación controlada con cultivos iniciadores.</b>	83
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	92
<b>X. CONCLUSIONES</b>	97
<b>XI. RECOMENDACIONES</b>	98
<b>REFERENCIAS</b>	99
<b>ANEXOS</b>	104

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA I.</b> CANTIDAD DE INÓCULO [ <i>mL</i> ].....	44
<b>TABLA II.</b> CARACTERIZACIÓN DEL MUCÍLAGO.....	54
<b>TABLA III.</b> CARACTERIZACIÓN QUÍMICA MUCILAGO DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS EN LAS FERMENTACIONES. ....	56
<b>TABLA IV.</b> PORCENTAJE DE CONSUMO FINAL DE AZÚCARES.....	59
<b>TABLA V.</b> PORCENTAJE DE DIFERENCIA ENTRE LAS PROPIEDADES MEDIDAS EN BASE AL CAFÉ C. ....	65
<b>TABLA VI.</b> CARACTERIZACIÓN QUÍMICA FERMENTACIÓN EN BIORREACTOR. ....	66
<b>TABLA VII.</b> PORCENTAJE DE DIFERENCIA DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DE LA FERMENTACIÓN IN VITRO CON RESPECTO A LAS FERMENTACIONES ESPONTÁNEAS .....	69
<b>TABLA VIII.</b> CONTEO UFC [LOG(UFC/ <i>mL</i> )].....	82
<b>TABLA IX.</b> RESULTADOS RELEVANTES EN LAS PROPIEDADES DE LA TAZA.....	91

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Posibles vías para mejorar la calidad en taza de la bebida. Las líneas sólidas representan vías presentadas en la literatura y las punteadas vías en desarrollo [1].	20
<b>Figura 2.</b> Proceso de floración y desarrollo del grano [3].	24
<b>Figura 3.</b> Cereza de café [3].	25
<b>Figura 4.</b> Piel de plata o perispermo [14].	25
<b>Figura 5.</b> Granos de café maduros [7].	26
<b>Figura 6.</b> Cosecha manual de café [17].	26
<b>Figura 7.</b> Formas de procesar el café cereza de acuerdo a las características climáticas de cada zona [7].	27
<b>Figura 8.</b> Café pergamino [17].	27
<b>Figura 9.</b> Café procesado con el método de beneficio seco [17].	27
<b>Figura 10.</b> Proceso de beneficio húmedo [4].	29
<b>Figura 11.</b> Precursores de sabor en el café. Los metabolitos secundarios generados durante la fermentación se presentan en línea punteada [1].	30
<b>Figura 12.</b> Estructura de la pectina [22].	31
<b>Figura 13.</b> Estructura primaria y secundaria de la pectina [21].	32
<b>Figura 14.</b> Acción de las enzimas sobre la pectina: (1) PMG/PG – polimetilgalacturonasa o poligalacturonasa; (2) PE – pectin esterasa y (3) PNL/PL - pectina liasa o pectato liasa [24].	34
<b>Figura 15.</b> <i>Secado</i> [25].	35
<b>Figura 16.</b> <i>Etapas inicial de tuestión</i> [25].	35
<b>Figura 17.</b> <i>Acidez del café en función del grado de tuestión</i> [25].	36
<b>Figura 18.</b> Café ligeramente tostado [25].	37
<b>Figura 19.</b> Ponderación de la cantidad de café recolectado.	45
<b>Figura 20.</b> Etapa de unificación de la cosecha diaria en la tolva. <b>a)</b> Personas de pie sobre el café a procesar. <b>b)</b> Café dispuesto a ser transportado.	46
<b>Figura 21.</b> Agua utilizada en el transporte y clasificación de los granos.	47
<b>Figura 22.</b> Granos en el punto de maduración adecuado.	47
<b>Figura 23.</b> Café pasilla.	47

<b>Figura 24.</b> Transporte a la despulpadora. ....	48
<b>Figura 25.</b> Despulpadora. ....	48
<b>Figura 26.</b> Desmucilagador mecánico. <b>a)</b> Equipo para desmucilaginado mecánico. <b>b)</b> Café siendo retirado del módulo de desmucilaginado. ....	49
<b>Figura 27.</b> Tanques de fermentación. <b>a)</b> Escotilla para acceder al tanque de fermentación. <b>b)</b> Café sumergido en el medio de fermentación. <b>c)</b> Tanque de fermentación con masa de café en proceso. <b>d)</b> Llenado de los tanques. ....	50
<b>Figura 28.</b> Vaciado de tanques de fermentación. <b>a)</b> Evacuación del café con agua. <b>b)</b> Ductos de salida de los tanques de fermentación. <b>c)</b> Tanque de fermentación vacío. ....	51
<b>Figura 29.</b> Canales de lavado. <b>a)</b> Café sumergido en el agua de lavado. <b>b)</b> Canales de lavado vacíos. <b>c)</b> Agua de lavado. <b>d)</b> Lugar de tránsito de personas cerca a los canales de lavado. ....	52
<b>Figura 30.</b> Accidentes durante el proceso de beneficio. <b>a)</b> Café que se filtró de las canaletas de lavado. <b>b)</b> Café derramado luego de la explosión de una tubería por obstrucción. <b>c)</b> Café que se retiene en la trampa antes del desecho de las aguas residuales. ....	53
<b>Figura 31.</b> Fuga de agua. ....	54
<b>Figura 32.</b> Extracción pectina. ....	55
<b>Figura 33.</b> Comportamiento cinético de la temperatura. ....	57
<b>Figura 34.</b> Comportamiento cinético del pH en el proceso fermentativo. ....	57
<b>Figura 35.</b> Comportamiento cinético de los ácidos para el café C. ....	57
<b>Figura 36.</b> Comportamiento cinético de los ácidos para el café B. ....	57
<b>Figura 37.</b> Comportamiento cinético de los azúcares reductores totales. ....	58
<b>Figura 38.</b> Comportamiento cinético de los azúcares totales. ....	58
<b>Figura 39.</b> Comportamiento cinético de los azúcares simples para el café B. ....	59
<b>Figura 40.</b> Comportamiento cinético de los azúcares simples para el café C. ....	59
<b>Figura 41.</b> Comportamiento cinético del porcentaje de consumo de azúcares totales. ....	59
<b>Figura 42.</b> Comportamiento cinético de los alcoholes. ....	60
<b>Figura 43.</b> Fermentaciones en el sitio de beneficio. ....	60
<b>Figura 44.</b> Condición abierta de las fermentaciones. ....	60
<b>Figura 45.</b> Proteína en función del tiempo. ....	61
<b>Figura 46.</b> Instante inicial fermentación. ....	61
<b>Figura 47.</b> Instante final de fermentación. ....	61

<b>Figura 48.</b> Medio de fermentación al finalizar la corrida experimental.....	62
<b>Figura 49.</b> Curva cinética de crecimiento de biomasa para el café B. ....	63
<b>Figura 50.</b> Curva cinética de crecimiento de biomasa para el café C. ....	63
<b>Figura 51.</b> Porcentaje de crecimiento para el café B.....	64
<b>Figura 52.</b> Porcentaje de crecimiento para el café C.....	64
<b>Figura 53.</b> Concentración de microorganismos en base al café C .....	64
<b>Figura 54.</b> Sistema de reacción. ....	67
<b>Figura 55.</b> Finalización de la fermentación.....	67
<b>Figura 56.</b> Lavado de café.....	67
<b>Figura 57.</b> Proceso de secado. ....	68
<b>Figura 58.</b> Café seco.....	68
<b>Figura 59.</b> Curva cinética de crecimiento de biomasa para el biorreactor. ....	68
<b>Figura 60.</b> Biomasa en el medio sintético. ....	69
<b>Figura 61.</b> Toma de muestras. ....	70
<b>Figura 62.</b> Comportamiento cinético de células.....	71
<b>Figura 63.</b> Comportamiento cinético de células para los microorganismos más lentos en su crecimiento.....	71
<b>Figura 64.</b> Comportamiento cinético de células para los microorganismos más rápidos en su crecimiento .....	72
<b>Figura 65.</b> Fracción de crecimiento para las levaduras. ....	73
<b>Figura 66.</b> Fracción de crecimiento para las bacterias ácido lácticas. ....	74
<b>Figura 67.</b> ART para CG en función del tiempo.....	75
<b>Figura 68.</b> ART para SC en función del tiempo.....	75
<b>Figura 69.</b> ART para LB en función del tiempo. ....	75
<b>Figura 70.</b> ART para LC en función del tiempo. ....	75
<b>Figura 71.</b> ART para LP en función del tiempo.....	76
<b>Figura 72.</b> ART para LAB B en función del tiempo.....	76
<b>Figura 73.</b> ART para LAB C en función del tiempo.....	76
<b>Figura 74.</b> Actividad pectinolítica <i>Candida Guillermondii</i> . ....	77
<b>Figura 75.</b> Actividad pectinolítica <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .....	77
<b>Figura 76.</b> Actividad pectinolítica YB. ....	77

<b>Figura 77.</b> Actividad pectinolítica YC .....	77
<b>Figura 78.</b> Actividad pectinolítica LP. ....	78
<b>Figura 79.</b> Actividad pectinolítica LAB B. ....	78
<b>Figura 80.</b> Actividad pectinolítica LAB C .....	78
<b>Figura 81.</b> Levaduras (CG, SC, YB, YC) .....	79
<b>Figura 82.</b> Ácido lácticas (LP, LAB B, LAB C).....	80
<b>Figura 83.</b> Microscopía CG (40x) .....	80
<b>Figura 84.</b> Microscopía SC (40x).....	80
<b>Figura 85.</b> Microscopía YB (40x) .....	81
<b>Figura 86.</b> Microscopía YC (40x) .....	81
<b>Figura 87.</b> Microscopía LP (40x).....	81
<b>Figura 88.</b> Microscopía LAB B (40x) .....	81
<b>Figura 89.</b> Microscopía LAB C (40x).....	82
<b>Figura 90.</b> Blancos. ....	83
<b>Figura 91.</b> Fermentación con evidencia clara de microorganismos. ....	84
<b>Figura 92.</b> Fermentación sin evidencia aparente de microorganismos .....	84
<b>Figura 93.</b> Lavado de las muestras.....	84
<b>Figura 94.</b> Secado de las muestras. ....	85
<b>Figura 95.</b> Microscopía muestra seca. <b>a)</b> Cultivo en Petri. <b>b)</b> Cultivo bajo el microscopio .....	86
<b>Figura 96.</b> Microscopía blanco. <b>a)</b> Cultivo en Petri. <b>b)</b> Cultivo bajo el microscopio .....	86
<b>Figura 97.</b> Microscopía muestra 20. <b>a)</b> Cultivo en Petri. <b>b)</b> Cultivo bajo el microscopio .....	87
<b>Figura 98.</b> Microscopía muestra 18. <b>a)</b> Cultivo en Petri. <b>b)</b> Cultivo bajo el microscopio .....	88
<b>Figura 99.</b> Microscopía muestra 16. <b>a)</b> Cultivo en Petri. <b>b)</b> Cultivo bajo el microscopio .....	88
<b>Figura 100.</b> Microscopía muestra 9. <b>a)</b> Cultivo en Petri. <b>b)</b> Cultivo bajo el microscopio .....	89
<b>Figura 101.</b> Presencia de conidios.....	90

## SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

<b>ART</b>	Azúcares reductores totales
<b>AT</b>	Azúcares totales
<b>B</b>	Café variedad Tabi
<b>BL</b>	Bacterias lácticas
<b>C</b>	Café variedad Colombia
<b>CG</b>	<i>Candida Guillermondii</i>
<b>h</b>	Horas
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>kg</b>	Kilogramos
<b>L</b>	Litros
<b>LAB B</b>	Bacterias ácido lácticas café B
<b>LAB C</b>	Bacterias ácido lácticas café C
<b>LP</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<b>m</b>	Metros
<b>min</b>	Minutos
<b>mm</b>	Milímetros
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SC</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>YB</b>	Levaduras café B
<b>YC</b>	Levaduras café C

---

## RESUMEN

El café, originario de las zonas tropicales de África, ha sido cultivado por décadas en Colombia llegando a destacarse en el marco de la identidad nacional. En este sentido, el café colombiano se ha posicionado a nivel mundial como uno de los cafés de mayor calidad y valor comercial. En el contexto de la producción cafetera en Colombia, este estudio aborda los desafíos asociados con el beneficio húmedo del café. Dicho proceso implica una serie de etapas, entre las cuales se encuentran el despulpado y la fermentación, que son fundamentales para garantizar la calidad del producto final. Por lo tanto, se pretende evaluar el efecto de las fermentaciones controladas sobre el perfil de taza del café. Esta evaluación abarca la identificación de las fuentes de contaminación biológica que impacten los procesos fermentativos, el análisis de fermentaciones espontáneas y controladas, y la evaluación de la capacidad pectinolítica de los microorganismos involucrados.

Los resultados obtenidos revelaron la influencia de las altitudes de cultivo en las fermentaciones y subrayan el potencial del mucílago como fuente valiosa de nutrientes para la obtención de metabolitos que se configuran como precursores de mejores propiedades organolépticas de la bebida. Asimismo, la implementación de fermentaciones controladas con cultivos iniciadores, que incluyen levaduras y bacterias ácido lácticas, demostraron mejoras sustanciales en la calidad del café procesado. Se destaca la necesidad de un control preciso de las poblaciones microbianas en el proceso de fermentación. De esta manera se ofrecen perspectivas de interés para la industria cafetera colombiana.

***Palabras clave* — Café, beneficio húmedo, fermentación controlada, levaduras, bacterias ácido lácticas, mucílago, pectina, calidad del café.**

---

## ABSTRACT

Coffee, originally from the tropical areas of Africa, has been cultivated for decades in Colombia, standing out within the framework of national identity. In this sense, Colombian coffee has positioned itself worldwide as one of the coffees with the highest quality and commercial value. In the context of coffee production in Colombia, this study addresses the challenges associated with wet processing of coffee. This process involves a series of stages, among which are pulping and fermentation, which are essential to guarantee the quality of the final product. Therefore, the aim is to evaluate the effect of controlled fermentations on the coffee cup profile. This evaluation covers the identification of sources of biological contamination that impact fermentation processes, the analysis of spontaneous and controlled fermentations, and the evaluation of the pectinolytic capacity of the microorganisms involved.

The obtained results revealed the influence of cultivation altitudes on fermentations and underline the potential of mucilage as a valuable source of nutrients for obtaining metabolites that are precursors of better organoleptic properties of the drink. Likewise, the implementation of controlled fermentations with starter cultures, which include yeasts and lactic acid bacteria, demonstrated substantial improvements in the quality of processed coffee. The need for precise control of microbial populations in the fermentation process is highlighted. In this way, perspectives of interest for the Colombian coffee industry are offered.

***Keywords* — Coffee, wet processing, controlled fermentation, yeasts, lactic acid bacteria, mucilage, pectin, coffee quality.**

---

## I. INTRODUCCIÓN

El café, oriundo de África, ha sido cultivado a lo largo de los siglos por sus excepcionales características, siendo la especie *Coffea arabica L.* la de mayor relevancia en Colombia. En este país, el café se ha convertido en un elemento central de su identidad, especialmente con variedades como Típica, Borbón, Maragogipe, Tabi, Caturra y Variedad Colombia, reconocidas por su calidad y valor comercial. La obtención de la codiciada bebida de café implica un proceso fundamental conocido como beneficio, donde los granos, a través de métodos: húmedo o seco, se transforman desde el estado de café cereza hasta llegar al pergamino seco.

El beneficio húmedo, destacado por su sofisticación, prevalece en Colombia, contribuyendo a la obtención de cafés de mayor valor en el mercado. Este proceso implica la eliminación del mucílago que rodea los granos después del despulpado, una etapa crucial que, de no realizarse adecuadamente, podría afectar negativamente la calidad final del café. La fermentación se presenta como un componente esencial en este proceso, donde factores como el tiempo, la temperatura y las poblaciones microbiológicas desempeñan un papel crucial.

A pesar de la importancia de la fermentación en la calidad del café, su implementación presenta desafíos, especialmente en términos de control y trazabilidad. Este estudio aborda estas cuestiones, destacando la influencia de las poblaciones microbianas y proponiendo enfoques mejorados para la fermentación, con énfasis en la utilización de cultivos iniciadores. Además, se exploran oportunidades para aprovechar el mucílago como una fuente valiosa de nutrientes, promoviendo así tecnologías que mejoren la eficiencia en la producción de café.

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar el impacto de las fermentaciones controladas en el proceso de beneficio húmedo del café analizando como variable respuesta el perfil de taza. Se busca determinar las condiciones fisicoquímicas presentes en las fermentaciones espontáneas y analizar el aporte de diferentes poblaciones microbianas al perfil de taza durante la fermentación controlada; entendiendo el perfil de taza como la descripción de las características sensoriales de un café, estas características incluyen el aroma y el sabor. Las actividades realizadas para alcanzar estos objetivos incluyeron la caracterización del proceso de beneficio húmedo, el estudio de fermentaciones espontáneas y controladas, así como la evaluación de la capacidad pectinolítica de los microorganismos involucrados.

Este estudio busca contribuir al conocimiento actual sobre la fermentación en el beneficio húmedo del café, proporcionando perspectivas valiosas para mejorar la calidad y trazabilidad del producto final. Con un enfoque mixto que combina análisis biológicos y químicos, se pretende ofrecer una visión integral de los procesos fermentativos, promoviendo así avances significativos en la producción cafetera colombiana

La evaluación detallada del proceso de beneficio húmedo implementado in situ reveló etapas cruciales que podrían ser fuentes potenciales de microorganismos involucrados en la fermentación. Estos hallazgos incluyen etapas como la recolección manual de los granos, el transporte de la cosecha y el estado de los tanques destinados a las fermentaciones. Estas situaciones, junto con posibles accidentes que se presentan en el lugar de beneficio, como derrames de agua que pueden modificar el medio de fermentación, hacen que el proceso fermentativo no sea determinista, sino más bien estocástico.

La evaluación química del mucílago resaltó su potencial como una valiosa fuente de nutrientes, al identificar azúcares, alcoholes, pectinas y otras sustancias orgánicas. Estas características ofrecen oportunidades para aprovechar biotecnológicamente este componente en procesos relacionados con el café. Asimismo, la capacidad pectinolítica de los microorganismos presentes en las fermentaciones se evaluó mediante el cultivo en medios específicos. Los resultados destacaron la presencia de levaduras y bacterias con habilidades pectinolíticas, subrayando la importancia de comprender las capacidades metabólicas de estos microorganismos en el contexto de la fermentación del café.

En términos generales, los procesos fermentativos, ya sean espontáneos o controlados, mejoran las propiedades finales del café al promover la secreción de metabolitos secundarios que migran al interior del grano y se expresan durante la tostión, lo que se traduce en un perfil de taza superior. Además, contribuyen a la degradación de las sustancias pécticas, facilitando las etapas posteriores del proceso. Por otra parte, las fermentaciones espontáneas de las variedades Colombia y Tabi revelaron diferencias significativas en su composición microbiológica y química, destacando la influencia de la altitud del cultivo en la variedad de microorganismos presentes y, por ende, en la calidad final del café. De esto modo, la implementación de fermentaciones controladas con cultivos iniciadores, incluyendo levaduras y bacterias ácido lácticas, se reveló como una estrategia efectiva para mejorar propiedades del café procesado, subrayando la importancia del control preciso sobre las poblaciones microbianas en la fermentación. Este estudio

amplía la comprensión de los procesos fermentativos en el beneficio húmedo del café y destaca la necesidad de considerar la influencia de las altitudes de cultivo, aprovechar el mucílago como sustrato para obtener metabolitos secundarios y aplicar fermentaciones controladas para mejorar la rentabilidad en la caficultura. También resalta la importancia de comprender las capacidades pectinolíticas de los microorganismos para dirigir la fermentación y favorecer microorganismos de interés.

En conjunto, estos hallazgos ofrecen perspectivas valiosas para la mejora continua de los procesos de beneficio húmedo del café. Se sugiere la implementación de estrategias que aprovechen las altitudes de cultivo, optimicen el uso del mucílago y promuevan la aplicación controlada de microorganismos para obtener cafés de calidad superior en el mercado internacional.

---

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

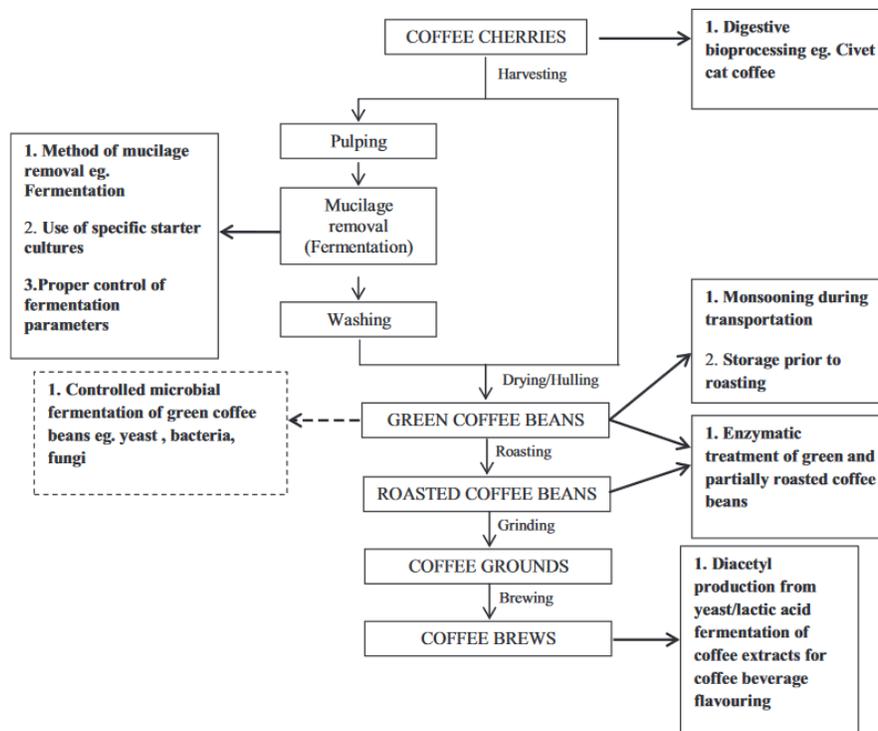
El café, originario de África, es una planta perteneciente al género *Coffea*, dentro del cual se destaca la especie *C. arabica L.*, por su bebida suave y su valor comercial. En Colombia se cultivan únicamente variedades pertenecientes a esta especie, tales como Típica, Borbón, Maragogipe, Tabi, Caturra y Variedad Colombia. Para obtener la mundialmente conocida bebida de café, el grano debe someterse primero a un proceso conocido como beneficio. Este procedimiento, que engloba las etapas poscosecha, implica la transformación del café cereza a pergamino seco, utilizando principalmente dos métodos: vía húmeda y vía seca. El beneficio húmedo, un proceso más sofisticado que el beneficio seco, conduce a la obtención de café de mayor valor comercial, siendo el método predominante en Colombia. Para el beneficio húmedo, se requieren granos en el estado de maduración apropiado, logrado mediante la clasificación por densidad en el lugar de beneficio. Después de clasificar, se realiza el despulpado, donde el grano se despoja del epicarpio y el mesocarpio, dejando las semillas cubiertas por el mucílago y el endocarpio. La remoción completa del mucílago es crucial antes de avanzar en el proceso, ya que su capacidad para retener agua y su textura resbaladiza pueden afectar negativamente las etapas subsiguientes. Esta eliminación se puede llevar a cabo de manera fermentativa o mecánica [1].

En la fermentación, el mucílago se descompone mediante reacciones químicas y biológicas, ya sea naturalmente o con microorganismos/enzimas adicionales. Durante este proceso se da una reducción de pH debido al aumento de ácidos en el medio, y un aumento de la temperatura debido a la fermentación alcohólica. La duración de las fermentaciones aplicadas en el proceso de beneficio húmedo tradicionalmente oscila entre 12 y 72 h según la temperatura; lastimosamente, estos procesos se enfrentan a desafíos relacionados con el control deficiente por parte de los productores. Por ejemplo, la determinación del punto final de la fermentación a menudo se basa en información visual, lo que puede resultar en dos escenarios problemáticos: la sobrefermentación, que puede dar como resultado un café con características organolépticas indeseables y un perfil alcohólico, o la fermentación incompleta, que propicia el crecimiento de microorganismos indeseables, afectando la calidad del café. A pesar de la posible controversia sobre el papel de la fermentación en la mejora del aroma del café, es innegable que un control deficiente de este proceso podría tener repercusiones negativas en las características aromáticas del producto final [1][2][3][4][5].

Este trabajo busca contribuir al entendimiento de los procesos de fermentación utilizados tradicionalmente en la caficultura colombiana mediante la caracterización química y biológica de la fermentación de dos variedades de café distintas. Además, busca resaltar la importancia del mucílago como sustrato para la aplicación de procesos biotecnológicos, con el propósito de avanzar en metodologías que permitan obtener café de mayor calidad. También se pretende evaluar el impacto de la microbiota presente en las fermentaciones en el perfil de taza obtenido a través del beneficio húmedo, mediante la implementación de procesos fermentativos con cultivos iniciadores. En síntesis, se busca establecer las bases que permitan la formulación de futuros trabajos con el objetivo de mejorar la calidad de la bebida obtenida en los procesos de producción nacional.

### III. JUSTIFICACIÓN

La implementación de tecnologías en diversas etapas de la producción puede mejorar significativamente la calidad del café (**Figura 1**). La fermentación controlada, ya sea en vía húmeda o seca, contribuye a la obtención de bebidas con perfiles de aroma y sabor diferenciados, ofreciendo experiencias sensoriales de mayor calidad al consumidor. En este proceso, especialmente en condiciones de sumersión, el uso de cultivos iniciadores, generalmente levaduras aisladas del café, permite influir en la producción de compuestos aromáticos que regulan las características sensoriales durante la cata en taza. Los cultivos iniciadores, seleccionados como simples o múltiples cepas, se emplean para asegurar un mejor control de la fermentación y previsibilidad del producto final. Además, se puede recurrir al uso de enzimas, como la poligalacturonasa (PG), la pectina liasa (PL) y la pectina metilesterasa (PME), para degradar el mucílago en azúcares libres. En la fermentación controlada, se monitorean parámetros críticos como la concentración de azúcar, disponibilidad de oxígeno, temperatura, acidez y tiempo, siendo el tiempo y la temperatura los factores cruciales en este proceso [1][6][7][8][9].



**Figura 1.** Posibles vías para mejorar la calidad en taza de la bebida. Las líneas sólidas representan vías presentadas en la literatura y las punteadas vías en desarrollo [1].

## **IV. OBJETIVOS**

### **A. Objetivo general**

Evaluar el impacto de la fermentación controlada en el proceso de beneficio húmedo del café sobre el perfil de taza.

### **B. Objetivos específicos**

- Determinar las condiciones fisicoquímicas presentes en las fermentaciones espontáneas realizadas en el lugar de beneficio.
- Identificar el aporte de diferentes poblaciones microbianas al perfil de taza durante la fermentación controlada.

## V. HIPÓTESIS

Los microorganismos que son partícipes de la fermentación son especies autóctonas que se originan como contaminantes naturales del proceso, incluidas levaduras, bacterias y rara vez se encuentran hongos filamentosos. Estos microorganismos provienen mayoritariamente de la cáscara del grano, aunque, también se encuentran microorganismos provenientes del agua utilizada en el proceso de fermentación y del suelo donde se realiza el cultivo. Dentro de las levaduras responsables del proceso fermentativo se encuentran los géneros *Pichia*, *Debaromyces*, *Sacharomyces* y *Candida*; para el caso de las bacterias se encuentran miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, además de bacterias *acido lácticas* y *Bacillus spp*; dentro de los hongos filamentosos se tienen los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos microorganismos utilizan cerca del 60% de los azúcares como sustrato para su crecimiento y liberan metabolitos como etanol y ácidos acético y láctico, lo que produce una disminución en el pH [10].

La influencia de diversos microorganismos durante la fermentación afecta las características finales del café. Se han llevado a cabo investigaciones para controlar este proceso y mejorar la calidad mediante el uso de cultivos iniciadores [11]. Estos cultivos iniciadores son microorganismos que aceleran y mejoran la fermentación del café [12]. La elección de estos cultivos iniciadores para la fermentación debe fundamentarse en la producción de pectinasas y compuestos metabólicos, dado que estos elementos afectan la calidad última de la bebida [13]. Adicionalmente, se espera que los microorganismos seleccionados como cultivos iniciadores posean características como fácil adaptación al sustrato y al proceso, mejora en la calidad sensorial de la bebida, reducción del tiempo y la energía durante la producción, inhibición de microorganismos patógenos relacionados con el café, y que presenten propiedades no patógenas y no toxigénicas [10]. La presencia de diversos microorganismos durante la fermentación ha demostrado afectar las características finales de la bebida, impulsando así investigaciones orientadas a controlar la fermentación y mejorar la calidad mediante el uso de cultivos iniciadores [11].

---

## VI. MARCO TEÓRICO

### A. *Generalidades del café*

El café, originario de las zonas tropicales de África, pertenece a la familia botánica *Rubiaceae* y al género *Coffea*. Se ubica en el subreino científicamente conocido como *Angiospermae*, lo que indica que se reproduce mediante semillas encerradas en un ovario en la base de la flor. Aunque existen más de 100 especies dentro del género *Coffea*, sólo dos tienen relevancia comercial: *C. arabica* L. y *C. canephora* Pierre [1]. En Colombia, se cultiva exclusivamente la especie *C. arabica* L., caracterizada por producir un café suave, altamente aceptado en el mercado mundial y de mayor valor. Las variedades de esta especie cultivadas en Colombia incluyen *Típica*, *Borbón*, *Maragogipe*, *Tabi*, *Caturra* y *Variedad Colombia* [2].

### B. *Condiciones de cultivo*

#### 1. *Temperatura*

El café es una planta perenne que prolifera en el sotobosque de la selva tropical, con intervalos de temperatura óptimos para las distintas especies que se asemejan a los de su hábitat natural. Para la especie arábica, el rango de temperatura óptimo es de 15 a 24 °C, mientras que para la especie robusta, este rango se sitúa entre 24 y 30 °C [3].

#### 2. *Precipitaciones*

La distribución de las precipitaciones es igualmente crucial, ya que los cambios estacionales de húmedo a seco y viceversa afectan el inicio de la floración, la interrupción del letargo floral y la estimulación del crecimiento vegetativo [3].

#### 3. *Altitud*

En relación con la altitud, existe una estrecha vinculación con la temperatura. En las zonas ecuatoriales, la especie arábica se cultiva en tierras altas, a una altitud que varía entre 1000 y 2000 m, mientras que la especie robusta se desarrolla desde el nivel del mar hasta los 700 m [3].

#### 4. *Suelo*

Añadiendo a lo mencionado previamente, las características fisicoquímicas del suelo son esenciales para el cultivo del café, ya que esta planta puede prosperar en suelos que abarcan desde extremadamente ácidos (con un pH inferior a 4.0) hasta ligeramente alcalinos (con un pH de hasta 8.0) [3].

#### C. *Floración y desarrollo del grano*

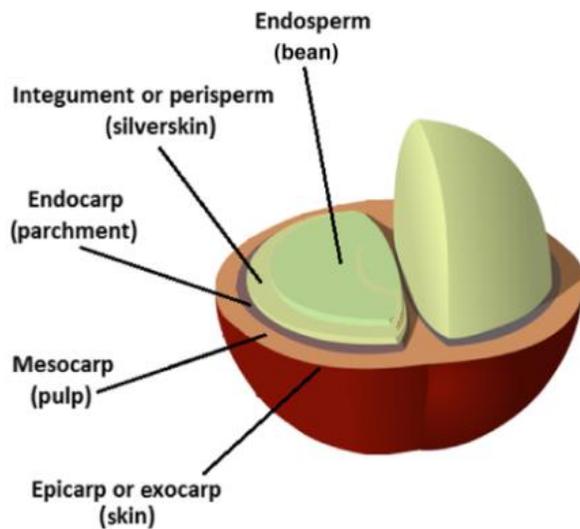
El ciclo de floración del café en las zonas ecuatoriales, como Colombia, suele ocurrir dos veces al año. Sin embargo, en las regiones no ecuatoriales, este ciclo de floración se presenta anualmente. En cada ciclo pueden tener lugar múltiples eventos de floración, y cuanto mayor sea su número y más largos los intervalos de tiempo entre ellos, menos uniformes serán los granos en la cosecha. La floración, representada en la **Figura 2**, consta de dos procesos distintos: la iniciación del capullo y la apertura de la flor, también conocida como antesis. Es importante señalar que las flores del café se forman en plantas con una edad igual o superior a tres años [14][15].



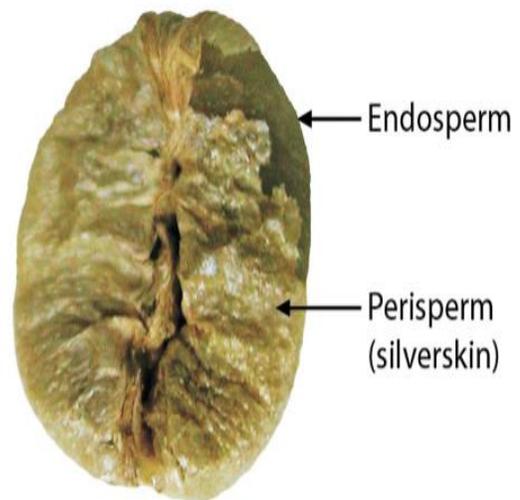
**Figura 2.** Proceso de floración y desarrollo del grano [3].

Después de la floración, se inicia el proceso de polinización que antecede a la formación del fruto de café. Este fruto, comúnmente conocido como cereza, tiene una longitud de 10 a 15 *mm* y alberga en su interior dos semillas protegidas por cuatro capas (**Figura 3**). La capa externa constituye la piel del grano, también llamada epicarpio o exocarpo. La segunda capa, conocida como mesocarpo, en términos coloquiales pulpa, es la parte carnosa del grano que separa el endocarpo del epicarpio. En los granos verdes, esta capa es dura (**Figura 3**); sin embargo, durante

la maduración, las enzimas pectinolíticas cortan las cadenas de pectinas presentes en la parte interior del mesocarpio, generando una sustancia viscosa rica en azúcares y pectinas llamada mucílago (**Figura 10**), este mucilago sirve como fuente de energía en el proceso de germinación del grano [3].



**Figura 3.** Cereza de café [3].



**Figura 4.** Piel de plata o perispermo [14]

El mucílago, presente en los granos maduros, es una capa que se adhiere al endocarpio (**Figura 10**) y facilita el proceso de despulpado debido a su viscosidad. Esta capa mucilaginosa actúa como barrera entre la pulpa (mesocarpio) y las semillas contenidas al interior de la cereza (endospermo), pero a su vez, dificulta el proceso de secado debido a su capacidad para retener agua. La tercera capa es el pergamino o endocarpio, y la última capa, adherida a la semilla, se denomina piel de plata o perispermo (**Figura 4**) [14][16][3][15].

## D. *Procesamiento del grano*

### 1. *Cosechamiento*

La cosecha representa un paso de suma importancia en la producción de un café de alta calidad, siendo crítico el grado de maduración de los frutos. Mientras que los frutos maduros tienden a generar una bebida de mejor calidad, aquellos que están inmaduros o demasiado maduros pueden resultar en bebidas de baja calidad. En el proceso de cosechamiento, es fundamental realizar

la recolección de los granos en el estado de maduración adecuado para garantizar la calidad comercial del producto. La cosecha se inicia cuando la mayoría de los frutos alcanzan la madurez (**Figura 5**).



**Figura 5.** Granos de café maduros [7]



**Figura 6.** Cosecha manual de café [17]

El proceso de cosechamiento puede llevarse a cabo de manera manual o mecánica. La cosecha manual (**Figura 6**), se puede realizar recogiendo los granos uno por uno o mediante un raspado de las ramas que recolecta todas las frutas, incluyendo las maduras, las verdes y las demasiado maduras. En cambio, la recolección mecánica se lleva a cabo sacudiendo los árboles o despojando las ramas mediante un dispositivo similar a un peine flexible [3][4].

Luego, los granos son sometidos a un proceso poscosecha en el cual las semillas son separadas de las capas exteriores que las cubren. Este procedimiento debe ejecutarse de manera que el café no adquiera características indeseables que afecten la calidad del producto final. Existen diversos métodos de procesamiento poscosecha, cada uno con sus propias ventajas y desventajas. La elección de un método u otro dependerá de las posibilidades y preferencias del productor (**Figura 7**) [4].



## *b) Beneficio húmedo*

### *(1) Generalidades*

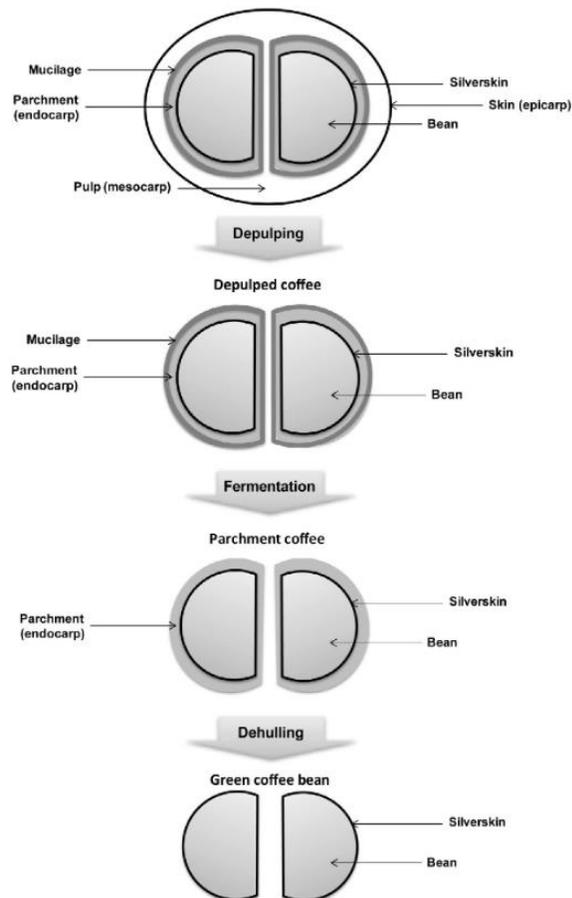
El beneficio húmedo (**Figura 10**) es un proceso de mayor sofisticación en comparación con el beneficio seco, lo que resulta en la obtención de un café de mayor valor comercial. Este método de procesamiento poscosecha se utiliza principalmente en frutos de la especie *C. arabica L.*, por lo que tradicionalmente ha sido el método preferido en Colombia [4][5].

Para llevar a cabo el beneficio húmedo, se requieren granos en el estado de maduración apropiado, idealmente logrado desde el momento de la recolección. Sin embargo, debido a la heterogeneidad en el grado de maduración en las plantaciones, se emplea un método de clasificación de los granos en el lugar de beneficio según su densidad. Los granos que están en el grado de maduración adecuado presentan una densidad mayor a la del agua por lo que tienen la tendencia a hundirse, mientras que los granos verdes o sobremadurados flotan. Este proceso asegura la selección de granos en el punto de maduración óptimo para obtener un café de mayor calidad. Después de la clasificación, se procede con el despulpado, donde el grano es despojado del epicarpio y el mesocarpio, obteniendo así las semillas cubiertas por el mucílago y el endocarpio [3][4][5][1].

El mucílago, una capa interna de 0.5 a 2 mm de espesor, se adhiere firmemente al endocarpio. Este componente representa aproximadamente el 14.85 % (en peso húmedo) del total del fruto fresco. Dicha capa que recubre el grano después del despulpado contiene alrededor del 84.2 % de agua, 8.9 % de proteína, 4.1 % de azúcares, 0.91 % de pectinas y 0.7 % de cenizas. Su composición en polisacáridos insolubles en alcohol está representada por un 30 % de pectinas, un 8 % de celulosa y un 18 % de polisacáridos no celulósicos neutros, que consisten en azúcares de bajo peso molecular como fructosa, glucosa, arabinosa, xilosa, galactosa y otros azúcares simples [1][19].

El mucílago presente en el grano facilita el despulpado, lo que reduce la cantidad de semillas rotas y la fuerza necesaria para llevar a cabo el procedimiento. Sin embargo, este debe ser eliminado por completo antes de continuar el proceso, ya que su tendencia a retener agua y sus características resbaladizas pueden perjudicar las siguientes etapas. La eliminación del mucílago se puede realizar de manera fermentativa o mecánica. El procedimiento mecánico, también conocido como

Becolsub, requiere una menor cantidad de agua. En el proceso fermentativo, la descomposición del mucílago se produce mediante un complejo grupo de reacciones químicas y biológicas, pudiendo ocurrir de forma natural o mediante la adición de microorganismos y/o enzimas. Este proceso se caracteriza por una reducción en el pH, y un aumento en la temperatura debido a la fermentación alcohólica de los azúcares remanentes. La duración de la fermentación varía entre 12 y 72 h, dependiendo de la temperatura del entorno donde se lleva a cabo [3][4][5][1].

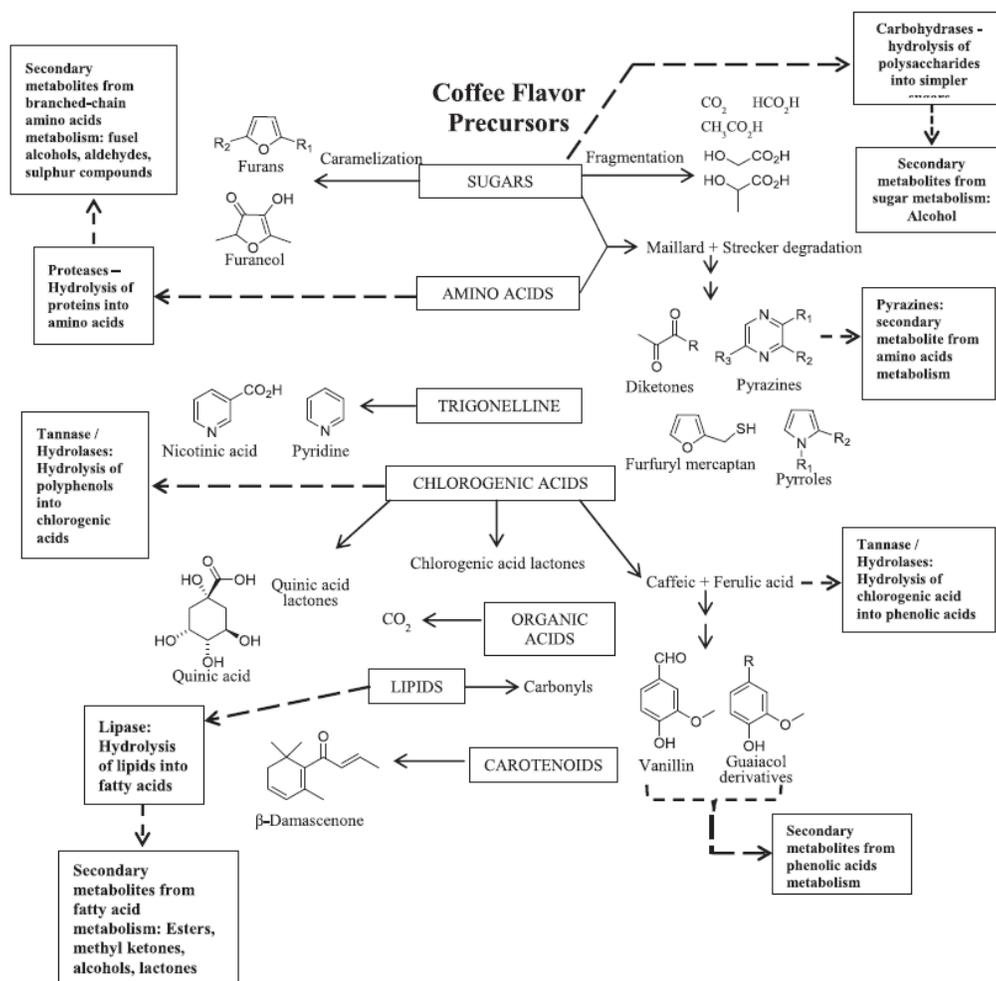


**Figura 10.** Proceso de beneficio húmedo [4].

## (2) Fermentación

La fermentación, ya sea de forma natural o controlada, tiene como objetivos principales solubilizar la capa mucilaginosa, rica en polisacáridos (pectinas), adherida a los granos para su eliminación y reducir el contenido de agua de los frutos. Aunque los frutos contienen enzimas endógenas que degradan la capa de mucílago, esta actividad enzimática no es suficiente para un proceso completo y adecuado. La fermentación permite el crecimiento de microorganismos que

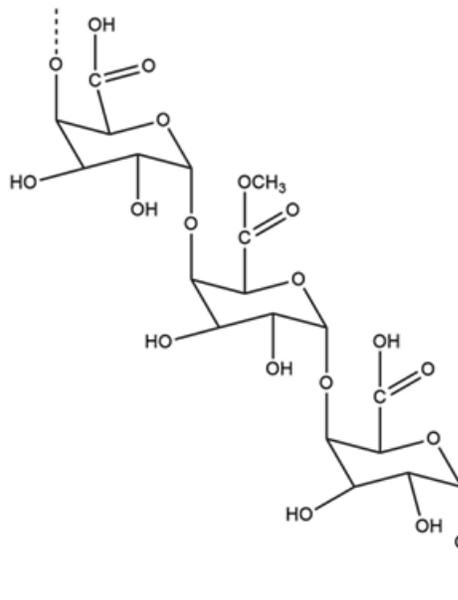
producen enzimas extracelulares como poligalacturonasas y pectina-liasas, necesarias para despolimerizar e hidrolizar la pectina (**Figura 12**) presente en el mucílago. La eliminación del mucílago por microorganismos capaces de degradar dicha capa facilita el secado del grano y genera una amplia variedad de metabolitos, tales como ácidos orgánicos, alcoholes superiores y ésteres. Estos metabolitos se difunden al interior de los granos de café, reaccionan con sustancias responsables del sabor de la bebida final y se configuran como precursores que aportan una mayor complejidad y profundidad a las características organolépticas de la bebida de café (**Figura 11**). Aunque el sabor característico del café se origina en la composición química del grano, la difusión de los metabolitos producidos durante el proceso fermentativo al interior del grano contribuye de manera significativa a las características sensoriales de la bebida [13][10].



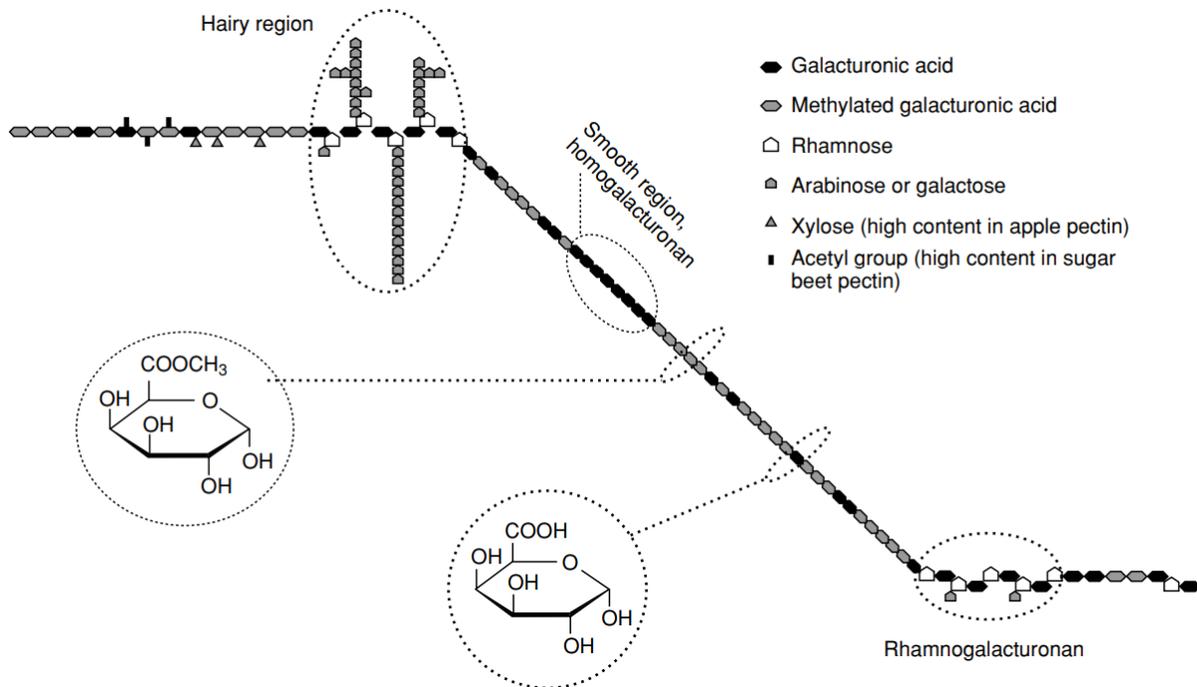
**Figura 11.** Precursores de sabor en el café. Los metabolitos secundarios generados durante la fermentación se presentan en línea punteada [1].

**(i) Pectina**

La pectina es un compuesto polimérico de carbohidratos de alto peso molecular (**Figura 13**) que se encuentra en prácticamente todas las plantas, de manera similar al almidón y la celulosa. Este componente contribuye a la estructura celular de las plantas. El término "pectina" abarca una variedad de polímeros que difieren en peso molecular, configuración química y contenido de azúcares neutros. Diferentes tipos de plantas producen pectina con propiedades funcionales distintas. En las células de las plantas, la pectina actúa como sustrato para la enzima pectinasa, ubicándose entre las fibras en la parte superior de la primera capa de la pared celular. Esta función ayuda a anclar las células entre sí. La pectina es un componente esencial del tejido parenquimatoso, que contiene arabinosa, galactosa y ácido galacturónico. La palabra "pectina" proviene del griego "pektos", que significa firme y duro. Este origen refleja la capacidad de la pectina para formar geles [20][21].



**Figura 12.** Estructura de la pectina [22].



**Figura 13.** Estructura primaria y secundaria de la pectina [21].

### (ii) Microorganismos que participan en la fermentación

Durante la fermentación del café, los microorganismos desempeñan un papel crucial en la degradación de la pulpa y el mucílago de los frutos. Los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación son principalmente especies autóctonas que surgen como contaminantes naturales del proceso. Entre ellos se encuentran levaduras, bacterias y, ocasionalmente, hongos filamentosos. Estos microorganismos se originan principalmente en la cáscara del grano, aunque también se encuentran en el agua utilizada en el proceso de fermentación y en el suelo donde se tiene el cultivo. En el grupo de levaduras responsables del proceso fermentativo se incluyen especies como *Pichia*, *Debaromyces*, *Sacharomyces* y *Candida*. Para las bacterias, se identifican miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *ácido lácticas* y *Bacillus spp.* En cuanto a los hongos filamentosos, se encuentran especies como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos microorganismos utilizan cerca del 60% de los azúcares como sustrato para su crecimiento y liberan metabolitos como etanol y ácidos acético y láctico, lo que produce una disminución en el pH [10][13].

A medida que la fermentación avanza, la población de levaduras y bacterias crece mientras que la población de microflora pectinolítica permanece constante, dicha microflora incluye

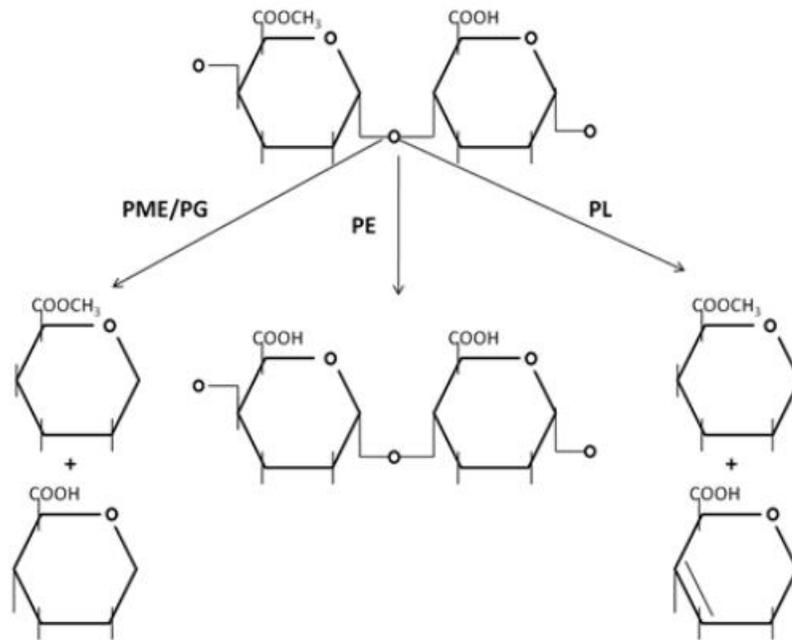
---

especies bacterianas como *Klebsiella spp.*, *Erwinia spp.*, *Aerobacter spp.*, *Escherichia spp.*, *Bacillus spp.* Sin embargo, en vista de que el pH disminuye en las últimas etapas de la fermentación, la población de levadura es la microflora dominante dada su alta tolerancia a los ambientes ácidos [1][10].

(iii) *Enzimas que participan en la fermentación*

Los microorganismos presentes en la fermentación del café juegan un papel importante en la producción de enzimas pectinolíticas y la generación de alcoholes y ácidos, especialmente ácido acético, láctico, butírico y otros ácidos carboxílicos de cadena larga. La poligalacturonasa (PG) se destaca como la enzima principal en este proceso, catalizando la hidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\alpha - 1,4$  en ácido péctico (ácido poligalacturónico). La pectina liasa (PL) juega un papel crucial al catalizar la rotura de la pectina mediante transeliminación, liberando ácidos galacturónicos insaturados. La tercera enzima, la pectina metilesterasa (PME), es responsable de la desesterificación del grupo metoxilo de la pectina, formando ácido péctico y metanol [13].

Las diversas formas de pectinasa producidas por los organismos pueden incidir en el grado de despolimerización de los componentes de la pectina, lo cual, a su vez, puede influir en la selección del grupo dominante de microorganismos. La despolimerización de la pectina se lleva a cabo mediante el empleo de enzimas como la pectina liasa, la pectina metil esterasa y la poligalacturonasa (**Figura 14**). En el caso específico de la pectina contenida en el mucílago del fruto del café, se degrada principalmente mediante la acción de la pectina liasa y la poligalacturonasa [23].



**Figura 14.** Acción de las enzimas sobre la pectina: (1) PMG/PG – polimetilgalacturonasa o poligalacturonasa; (2) PE – pectin esterasa y (3) PNL/PL - pectina liasa o pectato liasa [24].

### E. *Secado*

Luego de someter el grano al proceso de beneficio húmedo se obtienen las semillas de café recubiertas únicamente por el pergamino o endocarpio y se continúa con el secado, este se puede realizar de manera mecánica o exponiendo los granos al sol hasta lograr un contenido final de humedad de 10–12 % [18]. Muchos productores de café almacenan y comercializan el grano en este punto. Sin embargo, para continuar con el proceso de tuestión se debe retirar el pergamino y obtener la semilla de café (café verde).

### F. *Tostión*

El proceso de tostado se puede dividir en etapas que siguen un patrón distintivo. Entender el proceso de tuestión es importante para controlar la producción y lograr un alto estándar de calidad en cada lote. Esta división del proceso se puede realizar basados en la intensidad de las transformaciones químicas y físicas a las que se somete el grano a través del proceso [25].

### 1. *Proceso de secado (hasta 150 °C)*

El secado es el proceso mediante el cual se elimina el agua presente en los granos verdes de café. La mayor parte del agua se evapora antes de que los granos alcancen los 150 °C, aunque un pequeño porcentaje aún puede retenerse dentro de los granos incluso después de completar el proceso de tostado. A medida que la humedad del café se convierte en vapor y se generan otros gases dentro de los granos, la presión interna aumenta considerablemente, lo que provoca un aumento adicional en la temperatura de ebullición del agua.

Una vez que se ha eliminado el agua libre, los granos de café experimentan una pérdida de peso que oscila entre el 8 % y el 10 % de su peso original. Durante esta fase, se inicia el desarrollo del aroma y se observa la aparición de un color discreto (**Figura 15**). Esto se logra a través de la formación de compuestos intermedios de la reacción de Maillard y, posteriormente, de las melanoidinas. En este punto, la temperatura aún es muy baja para que se cause la pirólisis.



**Figura 15.** *Secado* [25].

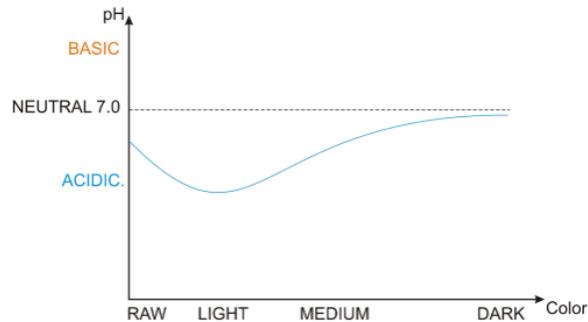


**Figura 16.** *Etapa inicial de tuestión* [25].

### 2. *Etapa inicial de tostado (150 °C–180 °C)*

En este punto, los granos se tornan más oscuros (**Figura 16**) debido a la continuidad de las reacciones de Maillard. Además, en esta etapa comienza la caramelización del azúcar en los granos de café. Durante esta fase, la acidez de los granos aumenta porque los carbohidratos se degradan en ácidos carboxílicos. Dado que la desintegración del ácido es insignificante a tales temperaturas,

prevalece la formación de ácido y el pH disminuye (**Figura 17**). Otros compuestos termolábiles como la trigonelina y los ácidos clorogénicos también comienzan a degradarse [25].



**Figura 17.** Acidez del café en función del grado de tuestión [25].

### 3. Tuestión – Etapa 2 (180 °C–230 °C)

En esta etapa, la caramelización avanza y el café se torna más oscuro (**Figura 18**). Aunque esta reacción está asociada con la percepción del sabor dulce y agradable característico del café en la taza, puede resultar amarga si se prolonga demasiado. Cuanto más oscuro sea el grado de tostado, más amargo será el sabor. Asimismo, la acidez disminuye a medida que el tueste se vuelve más oscuro, ya que los ácidos se degradan y volatizan en esta fase. Mientras que en la primera etapa del tueste la acidez aumenta, a partir de este momento, la acidez disminuye y el pH aumenta a medida que el tueste se vuelve más oscuro (**Figura 17**). El proceso de tostado puede concluir en esta fase. En la industria, el grado de tostado final se define por el color. El control de calidad del color se realiza mediante colorímetros que miden el color del café después de molerlo [25].



**Figura 18.** Café ligeramente tostado [25].

#### **4. Tostión – Etapa 3 (Por encima de 230 °C)**

El efecto exotérmico de la pirólisis disminuye a temperaturas superiores a los 250 °C, lo que indica que gran parte de los compuestos orgánicos ya han sido carbonizados a tan alta temperatura y el color del café es muy oscuro, tendiendo al negro. Los granos carbonizados dan como resultado un sabor amargo no deseado y generalmente son dañinos para la salud, ya que probablemente contengan hidrocarburos aromáticos policíclicos cancerígenos [25]. Los granos carbonizados dan como resultado un sabor amargo no deseado y generalmente son dañinos para la salud, ya que probablemente contengan hidrocarburos aromáticos policíclicos cancerígenos [25].

---

## VII. METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos planteados se realizaron las siguientes actividades, que presentan un enfoque mixto.

### **A. Identificación de las posibles fuentes de contaminación durante el proceso de beneficio húmedo implementado in situ.**

Antes de llevar a cabo los ensayos relacionados con la fermentación controlada, se realiza la identificación de las etapas del proceso de beneficio húmedo aplicado en la finca que puedan servir como fuentes de microorganismos participantes en la fermentación. Esta fase del estudio se abordó de manera cualitativa, centrándose en la observación, y su objetivo principal fue realizar un diagnóstico inicial para identificar las posibles fuentes de microorganismos involucrados en la fermentación, la cual desempeña un papel esencial en el proceso de beneficio.

### **B. Caracterización de la fermentación espontánea en el sitio de beneficio.**

Con el propósito de obtener un entendimiento más profundo de los procesos fermentativos implementados en el beneficio húmedo del café, se realiza la caracterización biológica y química de dos fermentaciones diferentes. Para ello, se extrajeron muestras de dos lotes distintos: uno de la variedad Colombia, cultivado a una altitud aproximada de 1480 *msnm*, denominado en adelante como “café C”; y otro de la variedad Tabi, plantado a una altitud cercana a los 1900 *msnm* referido en adelante como “café B”. Las instalaciones donde se dio el procesamiento del grano se localizan a una altitud de  $\approx 1450$  *msnm*. Ambas muestras fueron sometidas al proceso habitual de despulpado, tomando la cantidad necesaria para alcanzar aproximadamente un tercio del volumen de los recipientes de polipropileno azul de 120 L utilizados en el procedimiento. Con el objetivo de simular las condiciones presentes en los tanques de fermentación típicamente utilizados en dicho proceso, cada fermentación se llevó a cabo por triplicado, en recipientes abiertos y sin agitación. La masa de café empleada en cada recipiente se sumergió por completo en el agua habitualmente utilizada en la finca. Se tomaron muestras por triplicado de cada recipiente cada 6 h durante 24 h. Posteriormente, se extrajo una muestra a las 36 horas, marcando el punto final. Antes de cada muestreo se agita la masa de café fermentando para asegurar homogeneidad en las muestras. La fermentación concluyó a las 38 h en lugar de las 36 h previstas debido a la limitación de espacio

---

en las canaletas para llevar a cabo el lavado del café. Consecutivo al lavado se lleva el café a secado mecánico hasta alcanzar una humedad cercana al 12 %. Adicional a las muestras mencionadas anteriormente también se tomaron muestras de café recién despulpado para evaluar las diferencias químicas entre las variedades utilizadas.

Las muestras tomadas durante el proceso de fermentación se mantienen refrigeradas y se transportan al laboratorio, asegurando la cadena de frío mediante el uso de neveras de icopor.

### **1. Caracterización biológica.**

Para llevar a cabo el conteo microbiológico de las fermentaciones, se emplean las muestras recolectadas en los tiempos 0, 18 y 36 h. Dichas muestras se someten a diluciones sucesivas en agua peptonada estéril (90 mL de agua peptonada por cada 10 mL de muestra) utilizando matraces Erlenmeyer de 250 mL, hasta alcanzar un factor de dilución igual a  $10^{-3}$ . Cada dilución se homogeniza a 200 rpm durante un periodo de 20 min. Una vez se completan las diluciones, se procede con la siembra en cajas de Petri, donde se inoculan alícuotas de 100  $\mu$ L de las últimas diluciones.

Para el conteo general, se emplea el medio de cultivo WL (Wallerstein Laboratory)<sup>1</sup>, mientras que para el conteo específico de bacterias se utiliza el medio diferencial WLD (Wallerstein Laboratories Differential), al cual se le incorpora Nistatina a una concentración de 50 mg/L para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. En el caso del conteo de bacterias ácido lácticas, se recurre al medio de cultivo MRS (Man, Rogosa and Sharpe) al cual se le agrega Nistatina [50 mg/L] como fungicida. Para el conteo de levaduras y la detección de hongos filamentosos en el medio, se usa el medio YM (Yeast Mold), al cual se le añade Cloranfenicol [100 mg/L] para inhibir el crecimiento bacteriano. Asimismo, se utiliza el medio EMB (Eosin Methylene Blue) para la identificación de la presencia de enterobacterias en el medio. Estos cultivos se incuban 4 días a 30 °C y el medio YM se incubaba 8 días para identificar la presencia de hongos filamentosos en las fermentaciones.

---

<sup>1</sup> Ver Anexos para conocer la composición de los medios de cultivo

## 2. Caracterización química<sup>2</sup>.

La caracterización química de la fermentación espontánea, implica la centrifugación durante 10 *min* a 8500 *rpm* de las muestras obtenidas cada 6 *h* durante 24 *h* y una muestra final a las 36 *h*, esto es realizado para la obtención de un sobrenadante libre de sólidos suspendidos. Esta caracterización comprende la determinación de los azúcares totales mediante el método de Lane-Eynon con digestión ácida [26], los azúcares reductores totales con DNS, los alcoholes mediante colorimetría a 580 *nm* [27], el pH con un pHmetro de potencial eléctrico, las proteínas por el método de Bradford y los azúcares simples mediante HPLC [28].

### C. Caracterización del mucílago

La caracterización química del mucílago abarca la determinación de la humedad, sólidos totales y cenizas mediante métodos gravimétricos. Asimismo, se evalúan los azúcares totales por el método de Lane-Eynon con digestión ácida, los azúcares reductores totales con DNS, los alcoholes mediante colorimetría a 580 *nm* [27], el pH con un pHmetro de potencial eléctrico, las proteínas por el método de Bradford, los azúcares simples por HPLC [28], y la pectina a través de la extracción de los residuos no solubles en alcohol [29].

### D. Fermentación en Biorreactor

Para llevar a cabo la fermentación en el Biorreactor, se utilizan 3.5 *kg* de café variedad Colombia, que se transportan refrigerados al laboratorio. Una vez allí, se sumergen en agua en una proporción café:agua igual a 3.5: 3 (*kg: kg*), el agua utilizada en este proceso es agua proveniente del servicio de acueducto. La temperatura de la fermentación se fija en 22.5 °C que es el valor promedio de temperatura reportado para el sitio de beneficio. Esta fermentación se extiende a lo largo de 40 *h*. Luego de este tiempo, se desmonta el proceso y se realiza la caracterización química y biológica. La caracterización de esta fermentación se realizó únicamente para el tiempo inicial y el tiempo final, adicionalmente, se sigue el mismo protocolo que la caracterización de la fermentación espontánea para dichas caracterizaciones. Además, el lavado de los granos se realiza en el laboratorio y el secado se lleva a cabo en horno sin convección forzada a 50 °C para evitar la muerte del embrión. Luego de todo lo anterior, se envía el café seco para el proceso de tostión y cata en la finca.

---

<sup>2</sup> Ver Anexos para conocer los métodos a profundidad.

**E. Cultivo de microorganismos para realizar los ensayos de fermentación controlada.**

La ejecución de las fermentaciones controladas involucra el cultivo de las levaduras presentes en las fermentaciones espontáneas de los cafés B y C. También se cultivaron las cepas de bacterias ácido lácticas identificadas en dichas fermentaciones. Adicionalmente, se realizaron cultivos de cepas comerciales, entre las cuales se incluyeron *Lactobacillus Plantarum*, *Saccharomyces Cerevisiae* y *Candida Guillermondii*.

Las levaduras son cultivadas en medio YM, mientras que las bacterias ácido lácticas se cultivan en medio MRS. Este proceso de cultivo se lleva a cabo en medio líquido a 30 °C durante 48 h, y posteriormente se trasladaron a medio sólido para su conservación.

**F. Determinación de la capacidad de adaptación de los microorganismos al medio de fermentación**

Para evaluar la capacidad de adaptación de los microorganismos al medio de fermentación, se llevó a cabo el cultivo de cada grupo en un medio que simula las condiciones presentes en la fermentación espontánea, utilizando un medio reportado en la literatura [30]. Los preinóculos se realizan en medio MRS para el caso de las bacterias ácido lácticas y en medio YM para el caso de las levaduras, dejándolos durante 24 h a 120 rpm y 30 °C. Una vez obtenidos los preinóculos, se realiza la siembra en el medio sintético con un 10 % en volumen de inóculo. El volumen total se determina de tal forma que al tomar las muestras se conserve un volumen mayor al 90 % del volumen inicial. Las condiciones de cultivo son las mismas que las condiciones que se utilizan para la preparación de los inóculos.

Se toman 2 mL de muestra en diferentes intervalos de tiempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60, 80, 100, 120 h). Para evaluar la concentración de células, se utiliza la densidad óptica a 600 nm para levaduras [31] y 580 nm para las bacterias ácido lácticas [32]. Además, se evalúa la concentración de ART con el método de DNS, con el propósito de encontrar cambios en la pendiente de la curva que indiquen la hidrólisis de la pectina presente en el medio. Para la determinación de la concentración de los ART las muestras son centrifugadas a 6000 rpm durante 10 min con la intención de eliminar posibles contaminantes que afecten la medición a realizar.

Debido a la naturaleza compleja del medio utilizado, al finalizar las corridas experimentales se toman alícuotas de todas las muestras y son sometidas a centrifugación a 8500 *rpm* durante 10 *min* para evaluar su densidad óptica a 600 *nm*, buscando que las lecturas arrojadas para los medios sean similares.

En la construcción de las curvas de calibración, se toman alícuotas de las muestras en el instante final y se determina la concentración de sólidos suspendidos mediante la gravimetría. Se asume que esta concentración se debe a la biomasa. Luego, se realizan diluciones sucesivas y se mide la absorbancia de estas diluciones a la longitud de onda correspondiente a cada tipo de microorganismo. El objetivo es obtener una expresión que relacione la absorbancia con la concentración de sólidos suspendidos.

#### **G. Determinación de la capacidad pectinolítica de los microorganismos.**

Para evaluar la capacidad pectinolítica de los microorganismos presentes en las fermentaciones de este estudio, se lleva a cabo la siembra en dos medios distintos: uno para la detección de levaduras pectinolíticas y otro para la determinación del índice de degradación de pectina [30]. El cultivo se prolonga durante 5 días a una temperatura de 30 °C. Al concluir el periodo de cultivo, las cajas son sumergidas en Lugol de Gram para evaluar la degradación de las pectinas a través de un cambio en la coloración del medio, esto debido a la interacción del reactivo con el ácido poligalacturónico presente en el medio.

Los preinóculos se preparan en medio YM y medio MRS durante 24 *h* a 30 °C. Se inocula cada caja con 100  $\mu\text{L}$  y se distribuye uniformemente utilizando un asa de vidrio.

#### **H. Determinación de la presencia de microorganismos fermentadores de pentosas.**

Para evaluar la presencia de microorganismos fermentadores de pentosas se realiza la siembra de una alícuota igual a 100  $\mu\text{L}$  de cada medio utilizado en la **Determinación de la capacidad de adaptación de los microorganismos al medio de fermentación** en un medio reportado en la literatura para el aislamiento de este tipo de microorganismos [28]. Las cajas se incuban a 30 °C durante 2 días y se evalúa la presencia de colonias a nivel macroscópico y su morfología a nivel microscópico.

### **I. Evaluación método de esterilización in situ.**

Con el objetivo de lograr un control efectivo sobre las poblaciones microbianas presentes en los procesos fermentativos y llevar a cabo la implementación de las fermentaciones controladas a través del uso de cultivos iniciadores, se evalúa la esterilización in situ mediante la exposición al calor y un choque térmico subsiguiente. Para realizar este procedimiento, se coloca una muestra de aproximadamente 20 litros de café recién despulpado y listo para fermentar en una estufa, sometiéndola a un proceso de calentamiento. Una vez alcanzado el punto de ebullición del agua, se mantiene a esta temperatura durante 15 minutos adicionales, seguido de un enfriamiento rápido con agua del grifo. Se toman muestras en tres puntos clave: antes de iniciar el calentamiento, después de los 15 minutos de ebullición y después de enfriar. Estas muestras se transportan refrigeradas al laboratorio, donde se realiza la siembra en los medios WL, EMB, MRS y YM con el propósito de evaluar la disminución de la carga microbiana en cada fase del proceso de esterilización

### **J. Fermentación controlada.**

Debido a la dificultad para implementar sistemas de esterilización eficientes en la búsqueda de disminuir la carga inicial de microorganismos nativos, se opta por trabajar con la fermentación utilizando cultivos iniciadores con una alta concentración de biomasa para asegurar su prevalencia en la fermentación a través de la competencia. Para esto, se emplean las levaduras presentes en las fermentaciones espontáneas, denominadas en adelante como YB (levaduras aisladas de la fermentación espontánea de la variedad Tabi) y YC (levaduras aisladas de la fermentación espontánea de la variedad Colombia). También se hace uso de *Lactobacillus Plantarum*, denominado en adelante LP, y las bacterias ácido lácticas de la variedad Tabi, referidas en adelante como LAB B. Para la preparación de los inóculos, se utiliza el mismo medio empleado en la **Determinación de la capacidad de adaptación de los microorganismos al medio de fermentación** y se incuban durante 2 días a temperatura ambiente. Se prepara suficiente medio para inocular el 10 % del volumen total de reacción, que será de 4 L. Las fermentaciones se llevan a cabo en recipientes plásticos cerrados en condiciones ambientales durante 48 h. El proceso de inóculo se realiza sin condiciones de esterilidad, y todo se lleva a cabo en el sitio de beneficio. La cantidad inoculada está determinada por el diseño de mezcla presentado en la **TABLA I**.

**TABLA I.** CANTIDAD DE INÓCULO [mL]

<b>Número muestra</b>	<b>LB</b>	<b>LC</b>	<b>LP</b>	<b>LAB B</b>
<b>1</b>	0	133.3332	133.3332	133.3332
<b>2</b>	266.6668	0	133.3332	0
<b>3</b>	0	266.6668	133.3332	0
<b>4</b>	133.3332	266.6668	0	0
<b>5</b>	0	133.3332	0	266.6668
<b>6</b>	133.3332	133.3332	0	133.3332
<b>7</b>	133.3332	133.3332	133.3332	0
<b>8</b>	266.6668	0	0	133.3332
<b>9</b>	400	0	0	0
<b>10</b>	0	133.3332	266.6668	0
<b>11</b>	0	0	266.6668	133.3332
<b>12</b>	0	266.6668	0	133.3332
<b>13</b>	133.3332	0	133.3332	133.3332
<b>14</b>	133.3332	0	0	266.6668
<b>15</b>	266.6668	133.3332	0	0
<b>16</b>	0	400	0	0
<b>17</b>	133.3332	0	266.6668	0
<b>18</b>	0	0	400	0
<b>19</b>	0	0	133.3332	266.6668
<b>20</b>	0	0	0	400

Además, se llevan a cabo dos fermentaciones como blanco, a las cuales se les añade únicamente agua de proceso utilizada en el sitio de beneficio, y una tercera fermentación que se realiza sin agregar inóculo o agua. Estas fermentaciones son realizadas con el objetivo de determinar el efecto real de los cultivos adicionados a las demás muestras y determinar la importancia de la carga inicial de microorganismos nativos en las fermentaciones.

Con el propósito de evaluar la eficiencia del método de siembra y determinar la carga inicial de microorganismos nativos respecto a los blancos, se lleva a cabo la siembra en medio WL para las corridas que consisten en cultivos puros y para los blancos. Esta estrategia busca examinar la homogeneidad o heterogeneidad de las poblaciones microbiológicas involucradas en cada fermentación.

## VIII. RESULTADOS

### A. Identificación de las posibles fuentes de microorganismos en el proceso de beneficio.

El proceso de beneficio del café en la *Finca La Manchuria* comienza en las plantaciones con la recolección manual de granos maduros. En esta etapa los recolectores trabajan con las manos desnudas, facilitando la transferencia de microorganismos a los granos. En la medida en que se avanza con la labor, cada recolector reúne su trabajo en sacos que son reutilizados diariamente hasta que su deterioro lo hace impráctico. Del mismo modo, los recolectores se encargan de llevar estos sacos al sitio de pesaje. No obstante, cuando el lote trabajado está a una distancia considerable, se utilizan volquetas para el transporte del café cosechado, las cuales también se emplean para el movimiento de tierra, banano, pulpa de café, personal, entre otros.

Posterior a la etapa de recolección, al finalizar la tarde, se lleva a cabo el pesaje, esto se realiza con la finalidad de determinar la cantidad de café recolectado por persona (**Figura 19**), esta etapa es importante para poder realizar el pago correspondiente a su labor. La ponderación de la cantidad de café recolectado se realiza en instalaciones que están expuestas al ambiente.

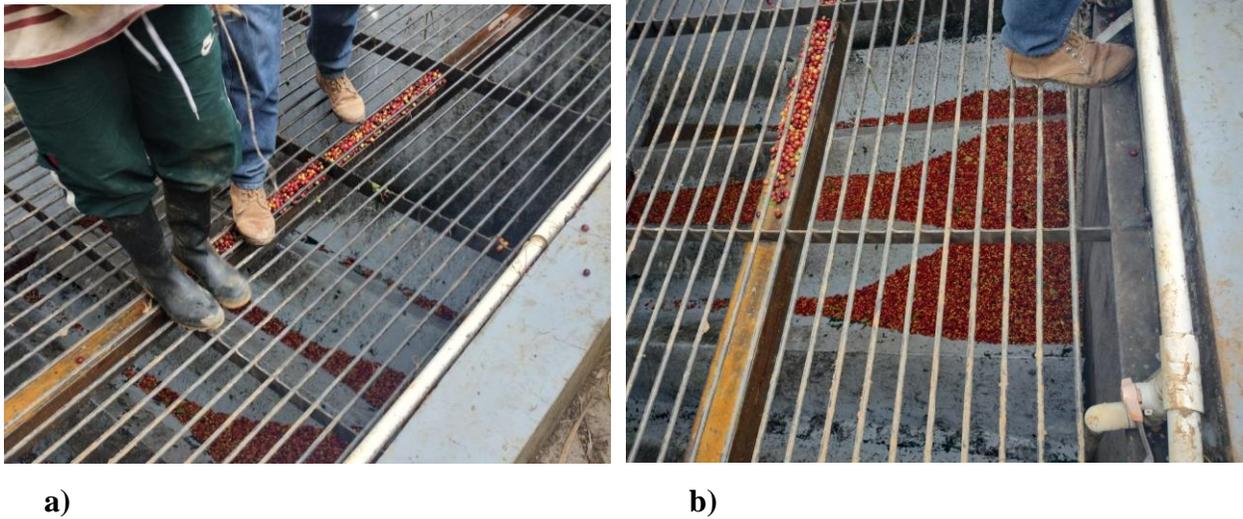


**Figura 19.** Ponderación de la cantidad de café recolectado.

En tanto que se continúa con el pesaje, los granos de café son introducidos al proceso de beneficio mediante una tolva (**Figura 20**). En esta etapa, se unifica la cosecha del día y los granos

son transportados a través de una tubería, siendo arrastrados por agua procedente de fuentes naturales, la cual no ha sido sometida a un proceso de purificación (**Figura 21**). Este sistema conduce los granos hasta el lugar donde se lleva a cabo la clasificación, considerando su densidad relativa respecto al agua que los transporta.

Al tiempo que se realiza el pesaje, los recolectores lavan partes de su cuerpo como manos y cara con el agua que ingresa a la tolva para el transporte del café. Además, es posible transitar encima de los granos exponiéndolos a sustancias presentes en la suela de los zapatos.



**Figura 20.** Etapa de unificación de la cosecha diaria en la tolva. **a)** Personas de pie sobre el café a procesar. **b)** Café dispuesto a ser transportado.



**Figura 21.** Agua utilizada en el transporte y clasificación de los granos.

Después de clasificar los granos según su densidad, se procede con el despulpado, una operación que se realiza por separado para los granos más densos que el agua (en el punto de maduración adecuado, **Figura 22**) y los granos menos densos, también conocidos como café pasilla (que no se encuentran en el grado de maduración adecuado, **Figura 23**).



**Figura 22.** Granos en el punto de maduración adecuado.



**Figura 23.** Café pasilla.

El despulpado es un proceso que conlleva la eliminación del mesocarpio (pulpa) para exponer el endospermo (semillas al interior de la cereza de café) (**Figura 24** y **Figura 25**), preparando así el grano para las etapas de secado y tostado subsiguientes. Tras completar el despulpado, se procede con la fase de desmucilaginado. Este paso puede llevarse a cabo de forma mecánica o a través de un proceso fermentativo, en el cual los microorganismos realizan la hidrólisis enzimática de las pectinas presentes en el mucílago que recubre el endocarpio los granos despulpados. La elección entre ambos métodos subyace en la disponibilidad de espacio para realizar la fermentación.



**Figura 24.** Transporte a la despulpadora.



**Figura 25.** Despulpadora.

El desmucilaginado mecánico se lleva a cabo mediante la fricción, que elimina el mucílago remanente sobre el endocarpio (**Figura 26**). Este método prescinde del uso de tanques de fermentación en la operación de la finca. No obstante, esta metodología no permite aprovechar las oportunidades de mejora que la fermentación podría aportar al perfil de taza del café obtenido. La

ventaja del uso del desmucilaginado mecánico es la reducción en los tiempos de producción y en la cantidad de espacio necesario para tal fin.



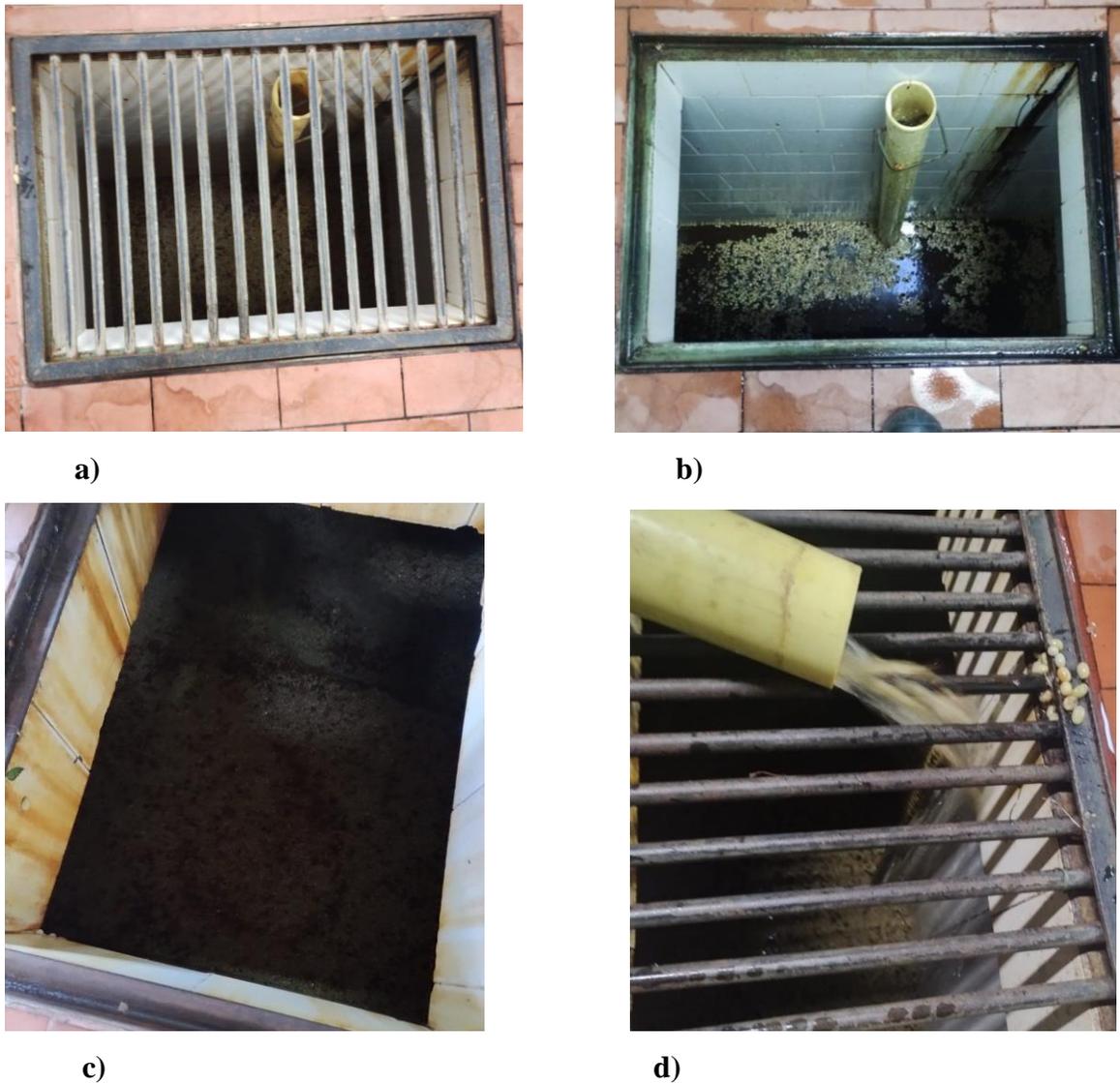
a)



b)

**Figura 26.** Desmucilaginado mecánico. **a)** Equipo para desmucilaginado mecánico. **b)** Café siendo retirado del módulo de desmucilaginado.

En la *Finca La Manchuria*, las fermentaciones suelen tener una duración de 72 h (**Figura 27**). Normalmente, se inician los lotes de fermentación los lunes y se renueva aproximadamente el 50 % del agua de fermentación cada 24 h. El agua que se utiliza para dicha renovación es una fracción del agua residual generada durante el proceso de despulpado del día, lo que se podría traducir en procesos fermentativos con microflora diferente cada vez que se renueva el medio. Sin embargo, se ha observado que la falta de renovación del medio de fermentación puede resultar en un fenómeno de sobrefermentación, por lo que este procedimiento es considerado crucial para mantener las condiciones apropiadas durante el proceso. Además, según la cantidad de café cosechado por día se suelen mezclar lotes diferentes para llevar a cabo la fermentación e incluso, se puede dar el hecho que las fermentaciones que presentan diferentes tiempos de proceso se mezclen debido a la necesidad de espacio.



**Figura 27.** Tanques de fermentación. **a)** Escotilla para acceder al tanque de fermentación. **b)** Café sumergido en el medio de fermentación. **c)** Tanque de fermentación con masa de café en proceso. **d)** Llenado de los tanques.

La renovación arbitraria del medio y las operaciones de mezcla realizadas en el lugar, representan un obstáculo para el control eficiente de las poblaciones microbianas involucradas en los procesos fermentativos. Asimismo, al renovar el medio, existe la posibilidad de que se produzca un lavado de los metabolitos generados durante la fermentación. Del mismo modo, los tanques de fermentación están expuestos a todo lo que sucede en el sitio de beneficio, ya que sólo están

protegidos por una escotilla (**Figura 27**) que permite el ingreso de diversos elementos, sin contar que por el lugar se da el tránsito de personas y presumiblemente de insectos

Una vez que se considera completado el proceso de fermentación o el café ha pasado por el módulo de desmucilaginado mecánico, se procede con el lavado de los granos en las canaletas. Para evacuar el café de los tanques de fermentación, se utiliza agua como agente de evacuación (**Figura 28**). Este proceso de lavado tiene como objetivo obtener el endospermo (semillas) sin mucílago (**Figura 29**), facilitando así la etapa de secado, que suele ser la fase final en muchos lugares. Este enfoque es comúnmente adoptado por pequeños productores que comercializan este tipo de café, conocido como café pergamino, en las cabeceras municipales.

**a)****b)****c)**

**Figura 28.** Vaciado de tanques de fermentación. **a)** Evacuación del café con agua. **b)** Ductos de salida de los tanques de fermentación. **c)** Tanque de fermentación vacío.

**a)****b)****c)****d)**

**Figura 29.** Canales de lavado. **a)** Café sumergido en el agua de lavado. **b)** Canales de lavado vacíos. **c)** Agua de lavado. **d)** Lugar de tránsito de personas cerca a los canales de lavado.

Sumado a los factores identificados hasta ahora, es altamente posible que, durante el proceso de beneficio sucedan accidentes que sometan el café a situaciones que pueden significar una fuente de contaminación por microorganismos (**Figura 30**). Estos accidentes son más comunes en los tiempos de mayor producción debido a los grandes volúmenes de café por procesar.

**a)****b)****c)**

**Figura 30.** Accidentes durante el proceso de beneficio. **a)** Café que se filtró de las canaletas de lavado. **b)** Café derramado luego de la explosión de una tubería por obstrucción. **c)** Café que se retiene en la trampa antes del desecho de las aguas residuales.

También es plausible que, durante la fermentación llevada a cabo en los tanques, ocurran eventos que modifiquen el medio de fermentación, como se evidencia en la **Figura 31**, donde se presenta una fuga de agua que podría entrar en los tanques de fermentación debido a la proximidad del incidente a las escotillas de estos.



**Figura 31.** Fuga de agua.

## B. Caracterización química del mucílago

**TABLA II.** CARACTERIZACIÓN DEL MUCÍLAGO.

Característica	Unidades	Método	Valor
<b>Humedad</b>		Secado en horno	83.9469 ± 0.1089
<b>Sólidos totales</b>	% p/p	Calcinado en mufla	16.0531 ± 0.1089
<b>Cenizas</b>			0.0759 ± 0.0069
<b>Azúcares reductores totales</b>		DNS	67.2932 ± 6.5345
<b>Glucosa</b>	g/L	HPLC	34.5192 ± 0.6565
<b>Xilosa</b>			44.5674 ± 1.4185
<b>Arabinosa</b>			0
<b>Azúcares totales</b>	% b. h. <sup>3</sup>	Lane-Eynon	15.4627
<b>Proteína</b>	mg/mL	Bradford	0.3564 ± 0.0457
<b>Alcoholes</b>	ppm	Colorimetría	13088.3487 ± 436.2369
<b>Pectina</b>	% p/p	Gravimetría	28

En los ensayos realizados con las muestras tomadas en la *Finca La Manchuria*, se comprobó que la composición típica del mucílago consiste esencialmente de azúcares, agua y sustancias pécticas. Además, la concentración de azúcares reductores totales (ART) es significativamente elevada (**TABLA II**). La presencia de estos ART y de azúcares totales (AT) configura una fuente de carbono imprescindible para la microbiota presente en la fermentación. Del mismo modo, la

<sup>3</sup> b.h. base húmeda

presencia de proteínas en el mucílago se traduce en una fuente importante de nitrógeno y azufre, elementos fundamentales para el desarrollo de los microorganismos.

Aunado a lo anterior, las cenizas contenidas en el mucílago del café constituyen elementos fundamentales para el metabolismo de los microorganismos involucrados en la fermentación, tales como potasio, fósforo, calcio, magnesio, entre otros [33].



**Figura 32.** Extracción pectina.

El contenido de pectina obtenido para el ensayo realizado con la muestra obtenida en la *Finca La Manchuria* (**Figura 32**) se acerca considerablemente a lo reportado en la literatura donde se reportan valores cercanos al 30% [1].

### **C. Caracterización química fermentación espontánea**

El análisis químico del mucilago adherido a los granos despulpados arrojó diferencias entre las variedades de café que son importantes al momento de realizar la fermentación en la etapa de desmucilaginado. Se pudo establecer que el café B (variedad Tabi) presenta menor concentración de glucosa y xilosa, pero presenta mayor concentración de azúcares reductores totales y de azúcares totales. Del mismo modo, el café B presenta mayor concentración de proteínas y mayor concentración de alcoholes. Por lo que se puede concluir que la fermentación realizada con el café B es una fermentación con mayor presencia de nutrientes en comparación con la fermentación llevada a cabo con el café C (variedad Colombia) (**TABLA III**).

**TABLA III.** CARACTERIZACIÓN QUÍMICA MUCILAGO DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS EN LAS FERMENTACIONES.

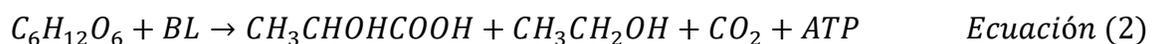
Característica	Unidades	Método	Valor	
			B	C
<b>Azúcares reductores totales</b>	<i>g/L</i>	DNS	17.1500 ± 0.8120	12.4474 ± 0.8120
<b>Glucosa</b>			25.3424 ± 0.3996	30.7159 ± 0.1403
<b>Xilosa</b>	<i>g/L</i>	HPLC	34.4433 ± 0.4329	42.1508 ± 0.6308
<b>Arabinosa</b>			0	0
<b>Azúcares totales</b>	% <i>b. h.</i> <sup>4</sup>	Lane-Eynon	5.0928	3.3277
<b>Proteína</b>	<i>mg/mL</i>	Bradford	0.6556 ± 0.4308	0.4514 ± 0.0595
<b>Alcoholes</b>	<i>ppm</i>	Colorimetría	12484.8282 ± 967.3079	11130.2598 ± 1194.9097

El agua utilizada en la fermentación proviene de fuentes naturales y su pH se ubicaba en el rango de 6 a 7. por esta razón el pH no se consideró como una variable a evaluar en este trabajo (**Figura 34**).

Las fermentaciones se realizaron a temperatura ambiente, por lo tanto el comportamiento exhibido fue oscilatorio, durante las noches alcanzó valores cercanos a los 18 °C, y durante el día se elevó hasta aproximadamente 28 °C. El valor promedio de las mediciones fue de ≈ 22.5 °C (**Figura 33**).

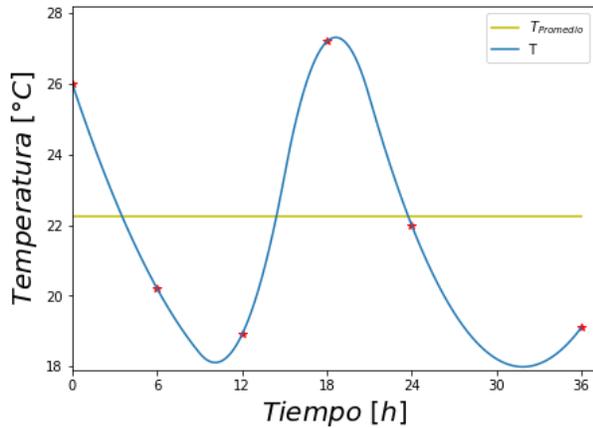
Los valores de pH, por otro lado, mostraron un comportamiento descendiente indicando la producción de ácidos durante las fermentaciones. Estos ácidos producidos provienen del metabolismo de los microorganismos (láctico y acético) y de la hidrólisis de las pectinas presentes en el mucílago (ácido galacturónico). Este comportamiento no presentó diferencias significativas entre los ensayos realizados (**Figura 34**) y, es típico de las fermentaciones lácticas y acéticas dadas en el café concordando con los presentado en la literatura [30].

La producción de los ácidos en la fermentación está representada teóricamente mediante las reacciones metabólicas netas presentadas en la *Ecuación (1)* y *Ecuación (2)* [34].

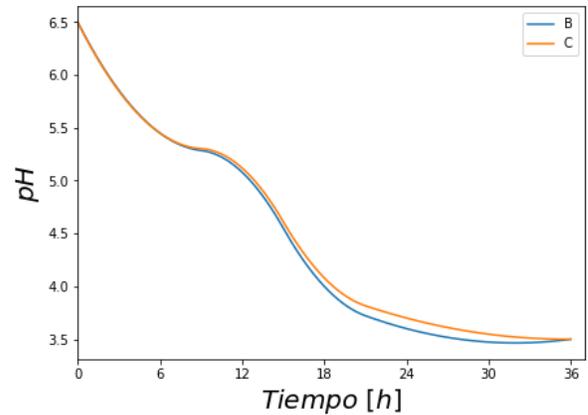


<sup>4</sup> b.h. base húmeda

<sup>5</sup> BL → Bacterias lácticas

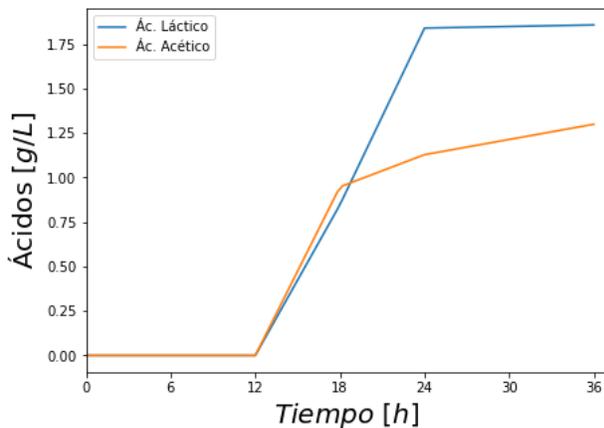


**Figura 33.** Comportamiento cinético de la temperatura.

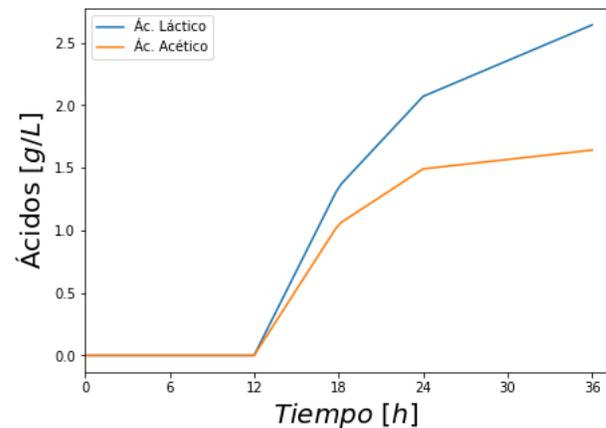


**Figura 34.** Comportamiento cinético del pH en el proceso fermentativo.

En la fermentación del café, la formación de ácidos se atribuye a la presencia de bacterias. Aunque la presencia de ácidos como el acético y el láctico podría mejorar el proceso fermentativo brindando un pH óptimo (entre 3.5 y 4.5) para el funcionamiento de las enzimas involucradas en la hidrólisis de las pectinas [33], una concentración alta de estos podría afectar la calidad del producto, agregando acidez indeseada a la bebida [10]. En este caso, se observó una mayor concentración de ácido láctico que de ácido acético en ambas corridas experimentales, siendo mayor la concentración de ambos en el café B (**Figura 35** y **Figura 36**).



**Figura 35.** Comportamiento cinético de los ácidos para el café C.

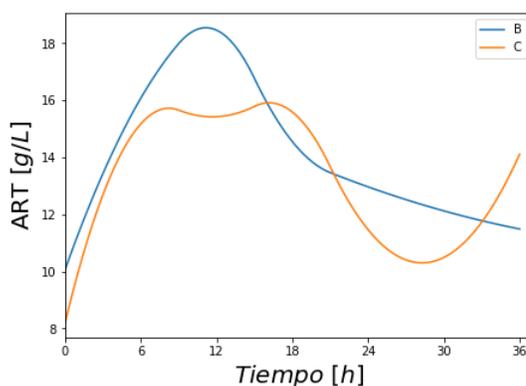


**Figura 36.** Comportamiento cinético de los ácidos para el café B

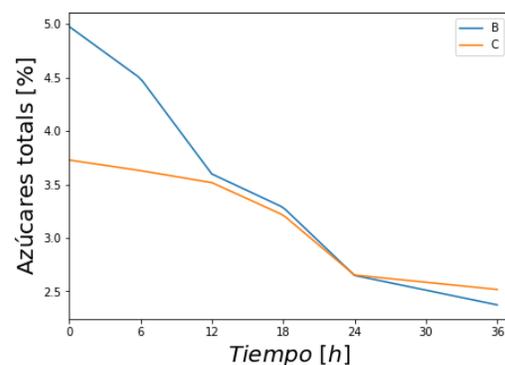
En el caso de los ART, se percibió un aumento en las primeras horas (**Figura 37**), indicando claramente la hidrólisis de las pectinas presentes en el medio. Según la información proporcionada

por los empleados del lugar, la degradación del mucílago toma alrededor de 16 h, mientras que en la literatura se citan valores desde las 12 h, dependiendo de las condiciones de la fermentación [35]. En las fermentaciones llevadas a cabo en la *Finca La Manchuria*, se observó que en el caso del café B, la hidrólisis del mucílago ocurre en las primeras horas, seguida del consumo de los azúcares (**Figura 37**). En contraste, para el café C, la degradación del mucílago es más lenta y menos uniforme, persistiendo hasta el final de la corrida experimental. Sumado a lo anterior, se evidenció que el consumo de azúcares reductores totales no se traduce en una disminución significativa de la concentración de estos en el medio, por el contrario, en la **Figura 37** se observó un aumento de estos con respecto a la concentración inicial, comportamiento que se explica haciendo uso de la **Figura 39** y la **Figura 40**, donde se apreció el aumento de azúcares simples no fermentables para los microorganismos presentes en la fermentación como la arabinosa, proveniente de la hidrólisis de las pectinas (**Figura 13**).

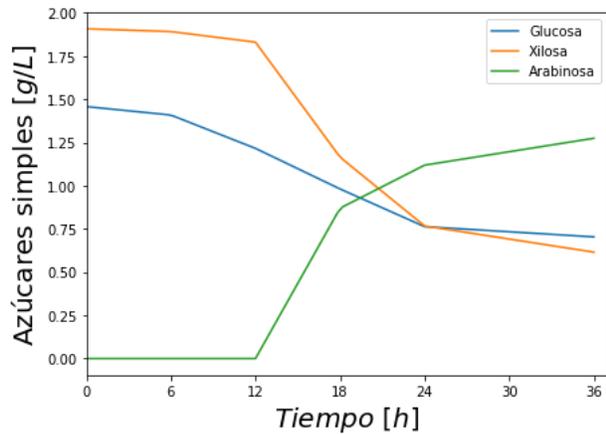
La concentración de los AT (azúcares totales) disminuyó en el tiempo (**Figura 38**), lo que indicó el consumo de esta fuente de carbono por parte de los microorganismos presentes en el medio. Además, se observó mayor consumo de azúcares totales en el café B (variedad Tabi) (**TABLA IV**). Asimismo, la **Figura 39** y la **Figura 40** permitieron advertir mayor consumo de glucosa y xilosa en la fermentación del café B, lo que indicó un mejor aprovechamiento de las fuentes de carbono presentes en el medio por parte de los microorganismos participantes en las fermentaciones de esta variedad de café (**Figura 41**).



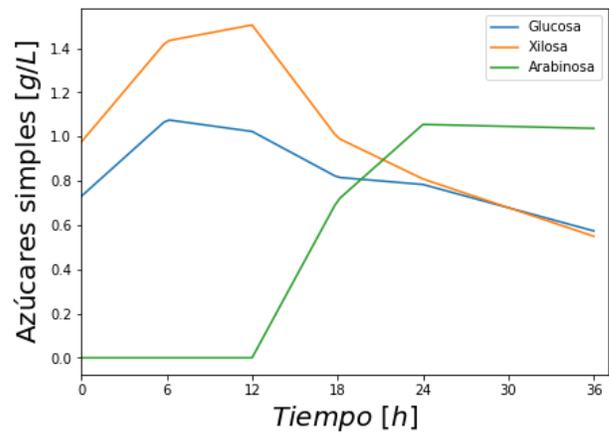
**Figura 37.** Comportamiento cinético de los azúcares reductores totales.



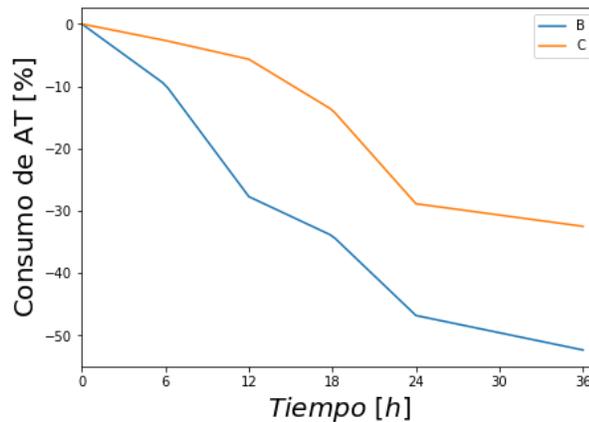
**Figura 38.** Comportamiento cinético de los azúcares totales



**Figura 39.** Comportamiento cinético de los azúcares simples para el café B.



**Figura 40.** Comportamiento cinético de los azúcares simples para el café C.



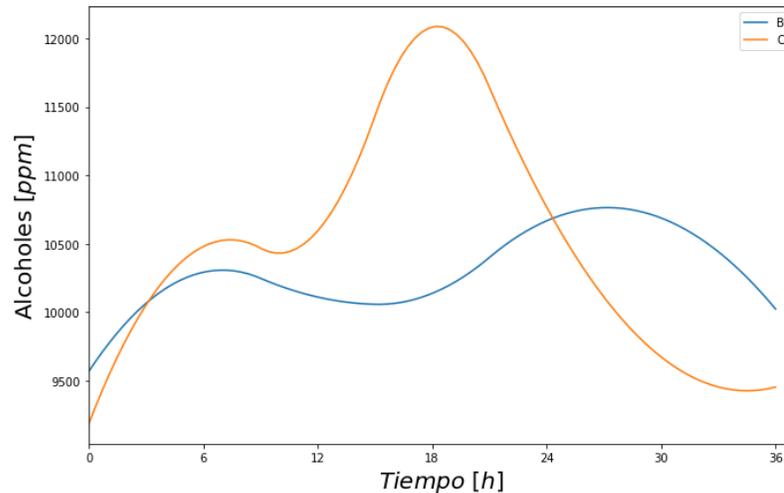
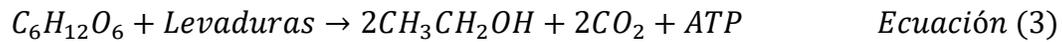
**Figura 41.** Comportamiento cinético del porcentaje de consumo de azúcares totales.

**TABLA IV.** PORCENTAJE DE CONSUMO FINAL DE AZÚCARES.

Consumo	Valor	
	B	C
Glucosa	51.7080	21.4338
Xilosa	66.3205	43.6535
Azúcares totales	53.4067	24.3542

El comportamiento de los alcoholes a lo largo de la fermentación no fue constante. La concentración alcanzó un pico en el café C y luego disminuyó (**Figura 42**), posiblemente debido a la acción de acetobacterias que utilizan el alcohol como fuente de carbono para la producción de ácido acético. En el caso del café B, la concentración se mantuvo más o menos constante. La condición de fermentación abierta al medio (**Figura 43** y **Figura 44**) no fue favorable frente a una

alta producción de alcohol (**Figura 42**). Teóricamente la reacción metabólica neta que expresa esta producción de alcohol está dada por la *Ecuación (3)* [34].



**Figura 42.** Comportamiento cinético de los alcoholes.



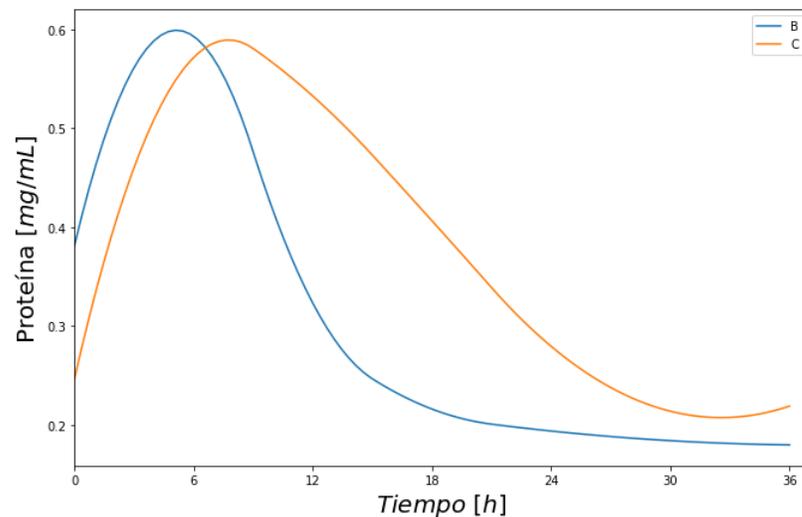
**Figura 43.** Fermentaciones en el sitio de beneficio.



**Figura 44.** Condición abierta de las fermentaciones

El comportamiento cinético de las proteínas en el proceso fermentativo se evidenció en la **Figura 45** donde se pudo observar que la concentración de proteínas aumentó en las primeras horas, indicando la secreción de exoenzimas para lograr la hidrólisis enzimática de las sustancias pécicas. Posteriormente, se observa una disminución en su concentración, atribuida a la

degradación oxidativa y al consumo por parte de los microorganismos presentes en el medio para la obtención de nitrógeno y azufre [33].



**Figura 45.** Proteína en función del tiempo.

Todos los cambios químicos mencionados anteriormente, incluyendo proteínas, concentración de ART, AT, alcoholes y demás, se lograron evidenciar en los cambios físicos presentados en la **Figura 46**, la **Figura 47** y la **Figura 48**, este comportamiento está acorde a lo reportado en la literatura donde se menciona que esto debe ocurrir en los procesos fermentativos [13].



**Figura 46.** Instante inicial fermentación.



**Figura 47.** Instante final de fermentación.

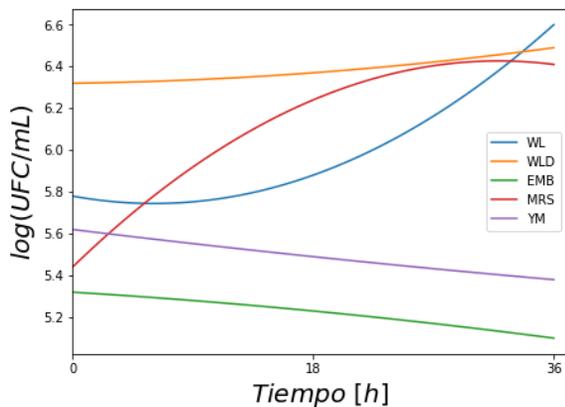


**Figura 48.** Medio de fermentación al finalizar la corrida experimental.

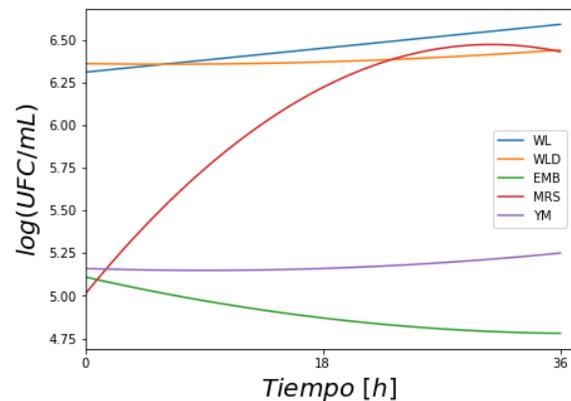
En el proceso de catación realizado por los maestros tostadores de la *Finca La Manchuria*, se determinó que el café B (variedad Tabi) exhibió mejores propiedades organolépticas en comparación con el café C (variedad Colombia), lo cual era esperado debido a su origen, ya que el café B se cultiva a mayor altura y presenta atributos superiores según la caracterización química realizada en este ensayo, como mayor concentración de azúcares y proteínas. Adicional a las propiedades intrínsecas de cada variedad de café, en la fermentación espontánea para el café B se observaron resultados que respaldan los hallazgos en la catación, como un mayor consumo de azúcares, indicativo de una mayor actividad microbiana y, por ende, una mayor obtención de metabolitos secundarios que potencian el perfil de taza. También se registró una producción significativamente mayor de ácido láctico, con un aumento del 42.2980 % en el café B con respecto al café C, lo que le aporta acidez deseada a la taza. Asimismo, la producción de arabinosa fue superior, con un aumento del 22.8469 %, señalando una mayor hidrólisis de las pectinas presentes en el mucílago. Del mismo modo, la concentración final de alcoholes también fue más alta para el café B. Estos resultados sugieren una influencia significativa de la fermentación espontánea en los cambios en la composición química del café, destacando diferencias sustanciales entre las variedades, lo que contribuye a la complejidad y singularidad de sus perfiles organolépticos.

#### D. Caracterización biológica fermentación espontánea

La caracterización microbiológica de las fermentaciones reveló un aumento considerable en las poblaciones bacterianas en ambos ensayos. Sin embargo, el comportamiento de las poblaciones de levaduras difirió de las expectativas, ya que no se observó un aumento en ninguna de las muestras. En el café B (variedad Tabi), la población de levaduras disminuyó con el tiempo, mientras que en el café C (variedad Colombia) se mantuvo más o menos constante. En las fermentaciones, se esperaba que las levaduras fueran los microorganismos predominantes para la generación de metabolitos que contribuyan significativamente al perfil de sabor del café procesado [36]. Además, la población de enterobacterias disminuyó con el tiempo, lo cual es positivo, ya que estas son contaminantes de la fermentación. No se encontró evidencia de la presencia de hongos filamentosos (**Figura 49** y **Figura 50**).



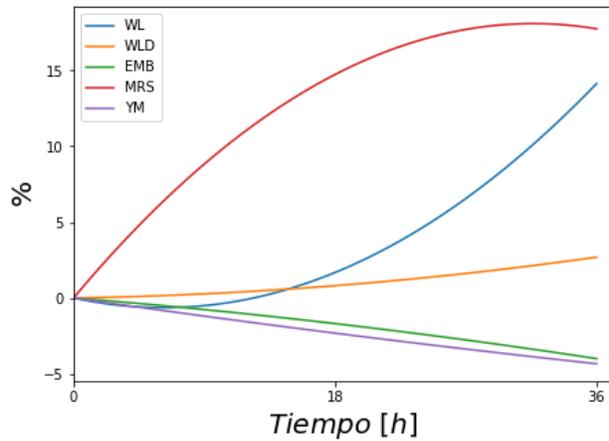
**Figura 49.** Curva cinética de crecimiento de biomasa para el café B<sup>6</sup>.



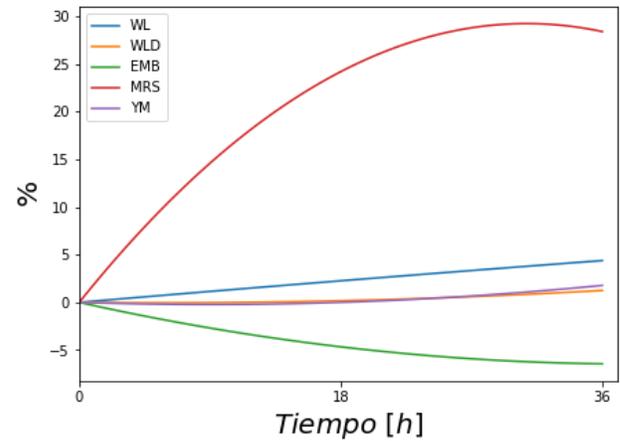
**Figura 50.** Curva cinética de crecimiento de biomasa para el café C.

Para tener un mejor entendimiento del comportamiento de las poblaciones microbiológicas presentes en las fermentaciones se presentan la **Figura 51** y la **Figura 52** donde se evidencia el porcentaje de crecimiento de cada población de acuerdo a su concentración inicial.

<sup>6</sup> WL: conteo general, WLD: bacterias, EMB: enterobacterias, MRS: bacterias ácido lácticas, YM: levaduras

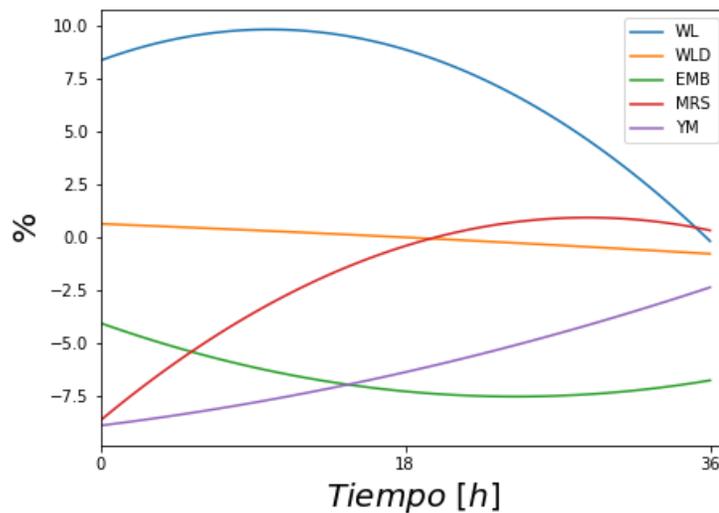


**Figura 51.** Porcentaje de crecimiento para el café B.



**Figura 52.** Porcentaje de crecimiento para el café C

Al realizar el análisis del porcentaje de crecimiento de cada población en relación con su concentración inicial, se observó un notable aumento en las bacterias ácido lácticas, llegando a valores cercanos al 28 % más en comparación con el tiempo 0 h para el café C. Asimismo, este análisis revela una disminución en las levaduras del café B, con valores aproximados al 5 % menos con respecto a su concentración inicial, mientras que en el caso del café C, se registra un aumento inferior al 2 %.



**Figura 53.** Concentración de microorganismos en base al café C

La **Figura 53** proporciona información sobre las colonias en diferentes momentos de tiempo de las fermentaciones en base al café C. Se observa que, para el conteo general realizado con el

medio WL, la concentración de UFC en el café C es aproximadamente un 7 % superior en los dos primeros momentos y se presentó una disminución para el final del proceso. El conteo en el medio diferencial WLD fue mayor en el primer momento y disminuyó a medida que avanzó el proceso fermentativo, indicando un mayor crecimiento de bacterias en el café B. En el conteo con el medio EMB, se encontró que la presencia de enterobacterias es mayor en el café B en todos los instantes medidos. Las bacterias ácido lácticas mostraron un mayor crecimiento en el café C, reflejándose en la curva del conteo realizado con el medio MRS. Aunque la población de levaduras en el café B fue mayor en todos los momentos, se evidenció un crecimiento mayor de levaduras en el café C, revirtiendo la situación hacia el final del proceso fermentativo implementado.

Estos comportamientos pueden explicar los perfiles químicos obtenidos anteriormente, evidenciando un mayor consumo de azúcares y una mayor concentración de ácidos en el café B. En la **TABLA V** se presentan las diferencias entre las fermentaciones del café B y C, calculadas respecto a los valores del café C.

**TABLA V.** PORCENTAJE DE DIFERENCIA ENTRE LAS PROPIEDADES MEDIDAS EN BASE AL CAFÉ C.

Característica	Valor [%]		
	0 h	18 h	36 h
<b>Conteo general (WL)</b>	8.37	8.89	-0.19
<b>Bacterias (WLD)</b>	0.63	-0.01	-0.79
<b>Enterobacterias (EMB)</b>	-4.07	-7.31	-6.79
<b>Bacterias ácido lácticas (MRS)</b>	-8.69	-0.42	0.32
<b>Levaduras (YM)</b>	-8.93	-6.40	-2.38
<b>Azúcares reductores totales</b>	-22.65	6.66	18.60
<b>Glucosa</b>	-99.72	-20.26	-22.76
<b>Xilosa</b>	-95.71	-17.18	-16.98
<b>Arabinosa</b>	NA	-22.22	-22.85
<b>Azúcares totales</b>	-33.51	-2.30	0.13
<b>Proteína</b>	-54.56	46.84	17.90
<b>Alcoholes</b>	-4.16	16.10	-6.03

En este sentido, se encontró que la concentración de azúcares reductores totales en el café C es un 18.60 % mayor al final de las fermentaciones, lo que indica un mayor consumo de estos azúcares en el café B, debido a que inicialmente la concentración era un 22.65 % mayor en el café B. Del mismo modo, los azúcares simples como glucosa y xilosa disminuyen en el café B, reduciendo la diferencia con el café C, aunque sigue siendo más alta en el café B al final. La producción de arabinosa es un 22 % mayor en el café B, indicando una mayor hidrólisis de sustancias pécticas. Al mismo tiempo, los azúcares totales disminuyen más rápidamente con el

tiempo en el café B. Además, hay mayor presencia de proteínas en el café C al final, sugiriendo una hidrólisis aún en curso o un menor consumo de esta fuente de nitrógeno, y la concentración de alcoholes es mayor en el café B al finalizar el procedimiento.

### E. Fermentación en Biorreactor

La fermentación en Biorreactor (**Figura 54**) arrojó los siguientes resultados para la caracterización química (**TABLA VI**):

**TABLA VI. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA FERMENTACIÓN EN BIORREACTOR.**

Característica	Unidades	Método	Valor	
			<i>t = 0 h</i>	<i>t = 40 h</i>
<b>Azúcares reductores totales</b>	<i>g/L</i>	DNS	8.8111 ± 0.1547	5.8856 ± 0.1160
<b>Azúcares totales</b>	% <i>b. h.</i> <sup>7</sup>	Lane-Eynon	1.0185	0.8242
<b>Proteína</b>	<i>mg/mL</i>	Bradford	0.0423 ± 0.0092	0.0331 ± 0.0260
<b>Alcoholes</b>	<i>ppm</i>	Colorimetría	9661.6932 ± 293.9857	9380.0503 ± 199.1516

La concentración inicial de azúcares totales para esta fermentación fue baja en comparación con la concentración inicial que presentaron las fermentaciones espontáneas. Este hecho podría ser un indicativo de un sustrato menos apropiado para la realización del proceso fermentativo. Además, se observó que el consumo de los nutrientes presentes en el medio fue deficiente de acuerdo a lo esperado, lo que sugiere que no se obtendrían resultados positivos en este caso.

De acuerdo a la **TABLA VI**, la producción de alcohol fue nula, lo que indica una población de levaduras insuficiente o la combinación de este hecho con un proceso aerobio.

<sup>7</sup> b.h. base húmeda



**Figura 54.** Sistema de reacción.

Visualmente, el medio de fermentación no mostró cambios significativos en comparación con el instante inicial (**Figura 55** y **Figura 56**). A pesar de evidenciarse respiración celular por la formación de burbujas, no se logró observar ningún cambio que pudiera utilizarse como indicio de un buen proceso fermentativo, a diferencia de lo que ocurrió en las fermentaciones espontáneas.



**Figura 55.** Finalización de la fermentación.



**Figura 56.** Lavado de café.

Debido a la falta de convección forzada en el proceso de secado (**Figura 57**) tardó aproximadamente 5 días, lo que puede significar un deterioro en la calidad del producto obtenido.

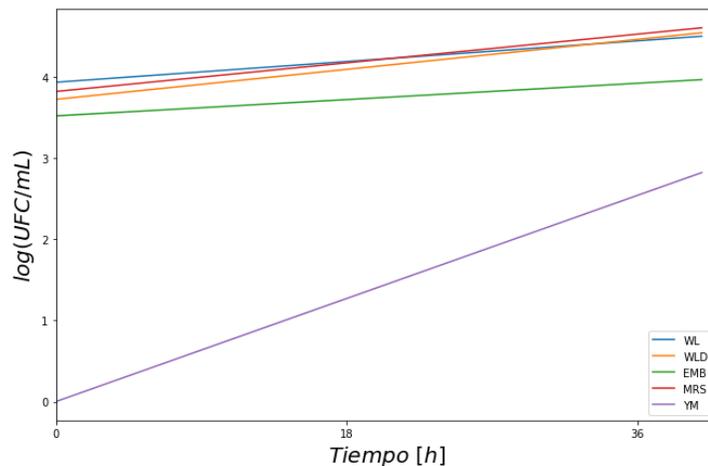
Durante este proceso el café perdió un porcentaje de masa igual a  $33.9787 \pm 0.1373$  % (**Figura 58**).



**Figura 57.** Proceso de secado.



**Figura 58.** Café seco.



**Figura 59.** Curva cinética de crecimiento de biomasa para el biorreactor.

De acuerdo con la información presentada en la **Figura 59**, todas las poblaciones de microorganismos aumentaron con el tiempo en esta fermentación. Sin embargo, de acuerdo a la **TABLA VII** se observó una menor concentración de microorganismos en comparación con las fermentaciones espontáneas, lo que refuerza la idea de que los microorganismos participantes en las fermentaciones espontáneas surgen como contaminación durante el proceso de beneficio

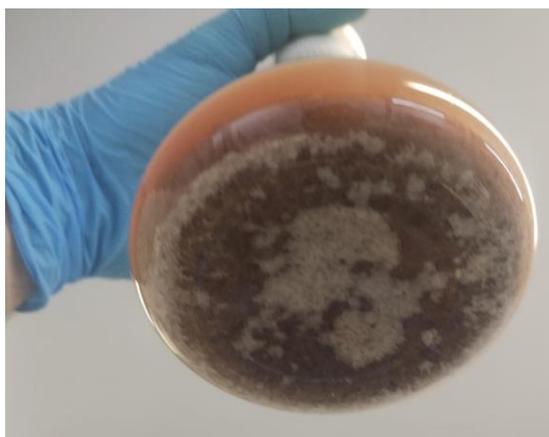
**TABLA VII.** PORCENTAJE DE DIFERENCIA DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DE LA FERMENTACIÓN IN VITRO CON RESPECTO A LAS FERMENTACIONES ESPONTÁNEAS

Microorganismos	B		C	
	$t_0$	$t_F$	$t_0$	$t_F$
Conteo general (WL)	-31.9171	-31.7502	-37.6150	-31.6198
Bacterias (WLD)	-41.0104	-29.9014	-41.3804	-29.3444
Enterobacterias (EMB)	-33.7216	-22.1968	-31.0215	-16.9127
Bacterias ácido lácticas (MRS)	-29.7193	-28.0465	-23.6097	-28.2777
Levaduras (YM)	-100	-47.4657	-100	-46.2156

Debido a las reducidas poblaciones microbianas presentes en este proceso y el consumo deficiente de nutrientes, se tuvo que el desempeño de este café al momento de realizar la cata fue insatisfactorio y se obtuvo un reporte negativo por parte de los maestros catadores de la finca que realizaron la cata. Durante la evaluación de perfil de taza se encontraron atributos negativos como la presencia de sabores amaderados bastante intensos y la presencia de sustancias aceitosas en los granos.

#### F. Determinación de la capacidad de adaptación de los microorganismos al medio sintético de fermentación

El medio de cultivo utilizado en este ensayo fue bastante turbio debido a la presencia de material orgánico obtenido del extracto de pulpa, lo que dificultó la obtención de datos precisos para la concentración de biomasa. La turbidez del medio se aprecia en la **Figura 60**, que muestra el crecimiento de la biomasa en el medio sintético.



**Figura 60.** Biomasa en el medio sintético.

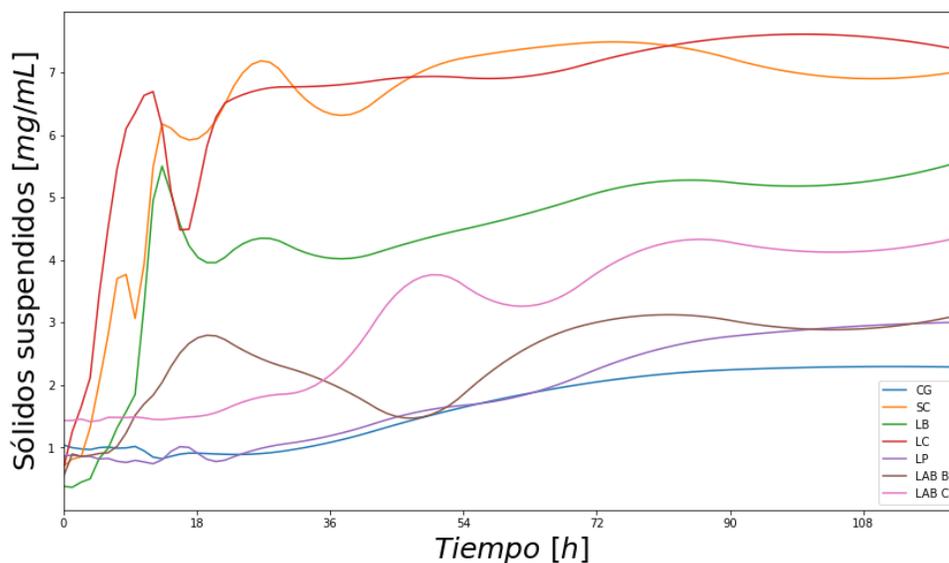
Adicionalmente, la **Figura 61** muestra como fue el cambio en la turbidez del medio de cultivo al presentarse el crecimiento de biomasa.



**Figura 61.** Toma de muestras.

El análisis de la capacidad de adaptación al medio de fermentación incluyó la determinación del comportamiento cinético de la biomasa, esta determinación se hizo relacionando el aumento en la concentración de biomasa con el aumento de la concentración de sólidos suspendidos en el medio. De igual forma se determinó el comportamiento cinético del consumo de azúcares reductores totales (ART).

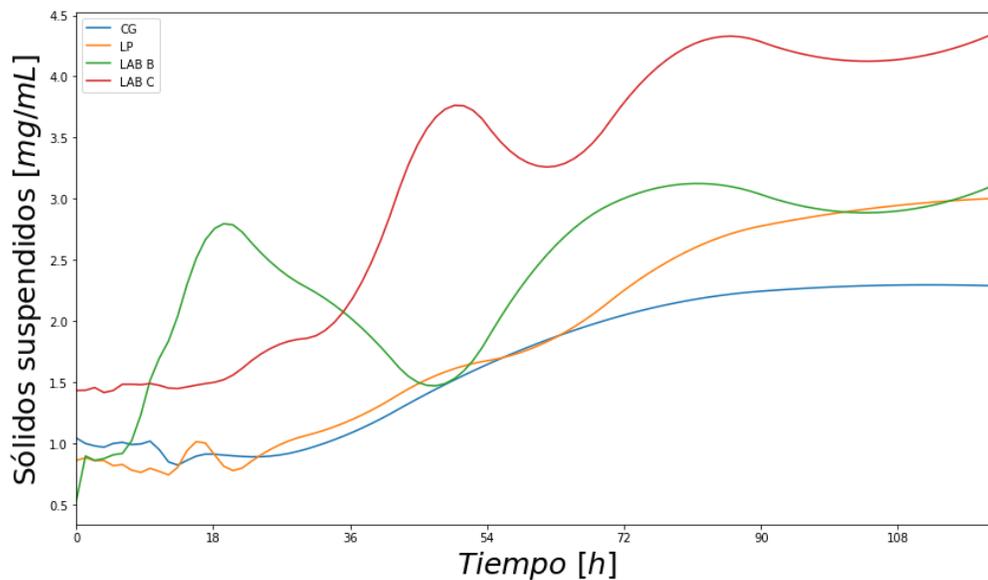
### 1. Comportamiento cinético de la biomasa



**Figura 62.** Comportamiento cinético de células<sup>8</sup>.

La **Figura 62** reveló que todos los microorganismos evaluados experimentaron un aumento de concentración con el tiempo. Sin embargo, no todos mostraron la misma capacidad para aumentar su concentración al mismo ritmo. Los microorganismos con mayor capacidad de adaptación y crecimiento en el medio de fermentación fueron las levaduras nativas y la *Saccharomyces Cerevisiae*. Por el contrario, las más lentas en su crecimiento fueron las bacterias ácido lácticas, y la cepa más lenta en su desarrollo en dicho medio es la *Candida Guillermondii*.

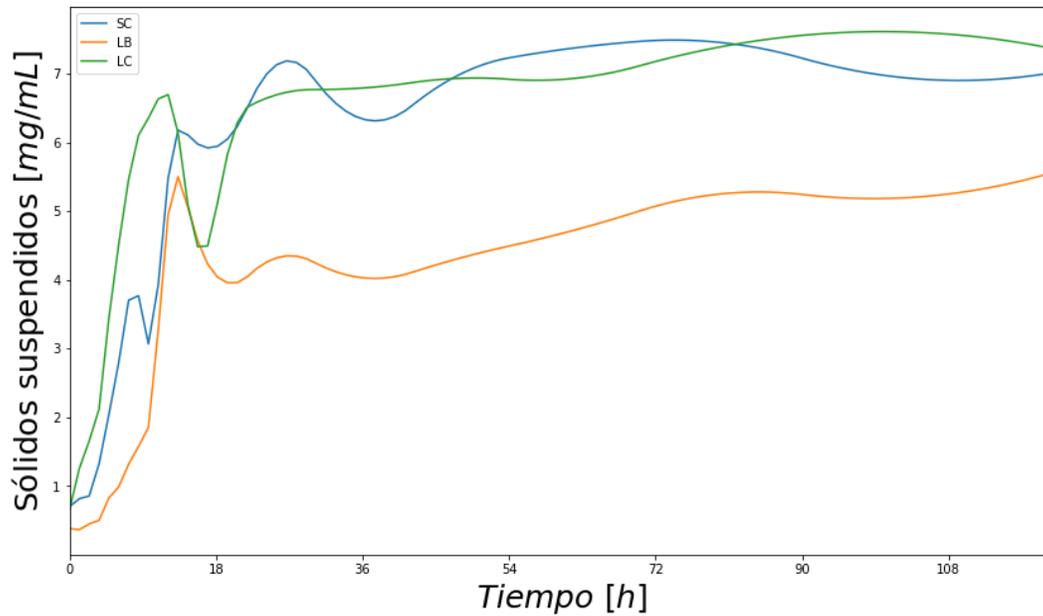
La **Figura 63** y la **Figura 64** muestran tiempos de adaptación al medio que difieren considerablemente entre los microorganismos evaluados. Asimismo, se observan picos en varios puntos de las curvas, los cuales se atribuyen a contaminantes del medio. Debido a esto, se optó por evaluar el comportamiento general de las curvas en lugar de analizar punto por punto.

**Figura 63.** Comportamiento cinético de células para los microorganismos más lentos en su crecimiento.

Para continuar con el análisis de la información recopilada en las curvas de crecimiento, se hace necesario evaluar el crecimiento relativo al punto inicial para tener una comparativa más clara

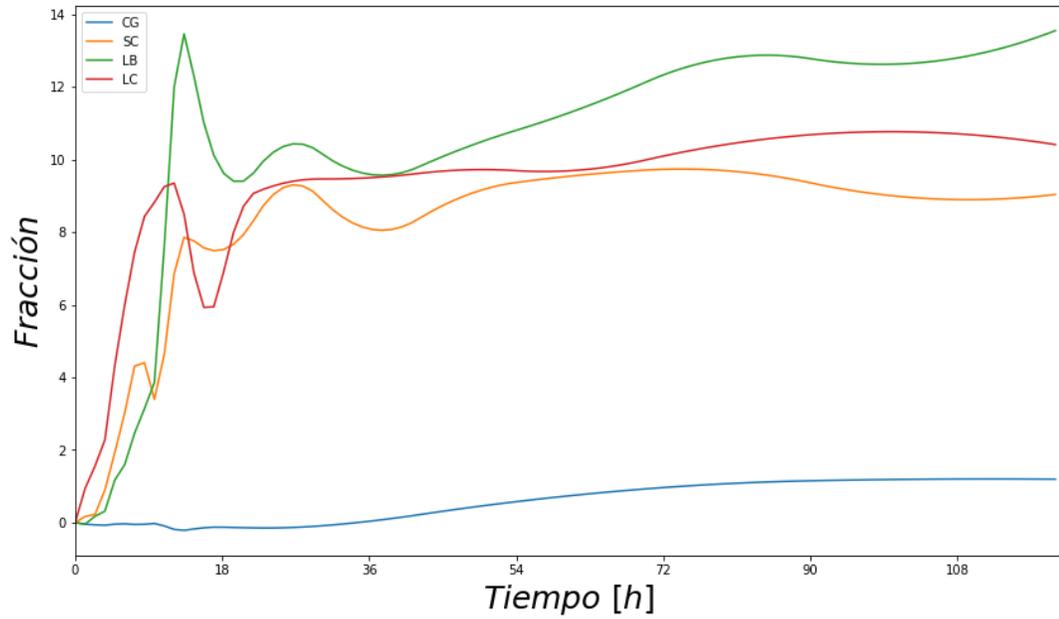
<sup>8</sup> CG: *Candida Guillermondii*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, LB: Levaduras aisladas de la variedad Tabi, LC: Levaduras aisladas de la variedad Colombia, LP: *Lactobacillus plantarum*, LAB B: Bacterias ácido lácticas aisladas de la variedad Tabi, LAB C: Bacterias ácido lácticas aisladas de la variedad Colombia

del crecimiento en el tiempo, para esto se toman todos los puntos evaluados para cada microorganismo y se evalúa su fracción con respecto al punto inicial.



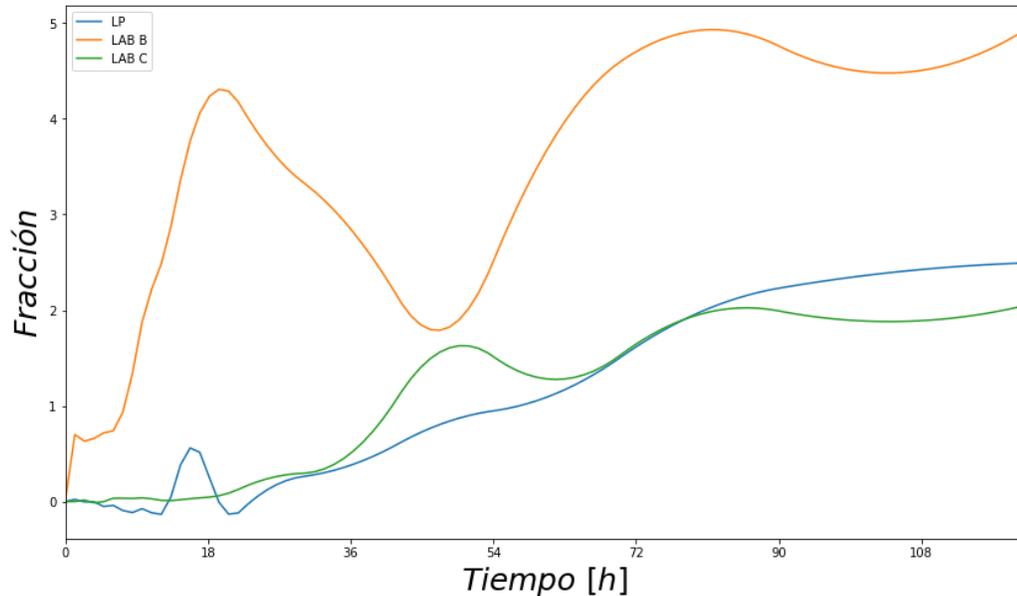
**Figura 64.** Comportamiento cinético de células para los microorganismos más rápidos en su crecimiento

La **Figura 65** resaltó el crecimiento significativo de las levaduras nativas en comparación con *Candida guilliermondii*, sugiriendo que esta última levadura no se adapta fácilmente al medio de fermentación. Además, las levaduras provenientes del café B exhibieron un crecimiento superior durante la corrida experimental, seguidas por las levaduras del café C y *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 65.** Fracción de crecimiento para las levaduras.

En cuanto a las bacterias ácido lácticas (**Figura 66**), se observó que mostraron tasas de crecimiento menores en comparación con las levaduras en el medio de cultivo. Sorprendentemente, *Lactobacillus plantarum* exhibió tasas de crecimiento superiores a las bacterias ácido lácticas del café C y las que presentaron las mejores tasas de crecimiento fueron las bacterias obtenidas del café B.

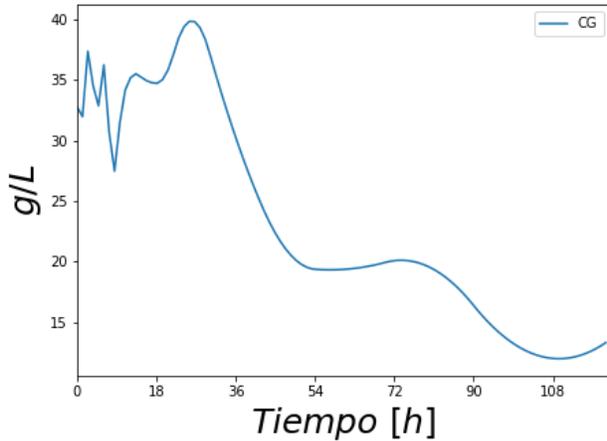


**Figura 66.** Fracción de crecimiento para las bacterias ácido lácticas.

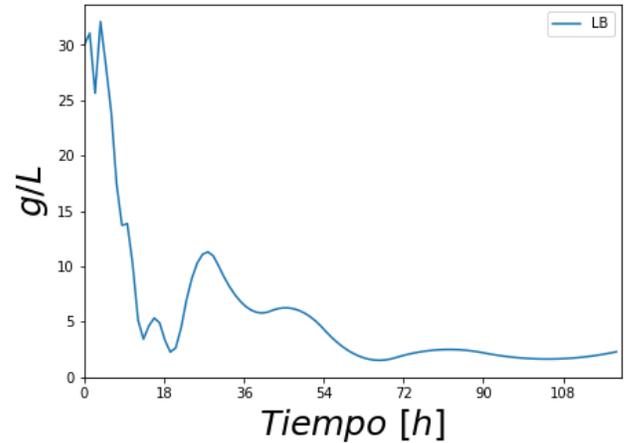
## 2. Cinética de azúcares

La cinética de los ART reveló la capacidad de hidrólisis de la pectina en el medio de cultivo por parte de las levaduras CG (**Figura 67**), LB (**Figura 69**) y LC (**Figura 70**), esto se logra visualizar a través del cambio de pendiente de las curvas, lo cual es debido al aumento en la concentración de los ART. En contraste, la SC (**Figura 68**) mostró un consumo de ART bastante elevado en las primeras horas del ensayo, alcanzando un consumo del 93.7943 % de los azúcares a las 16 h, lo que explica su rápido crecimiento y la llegada a la fase estacionaria determinada en las curvas de crecimiento (**Figura 64**).

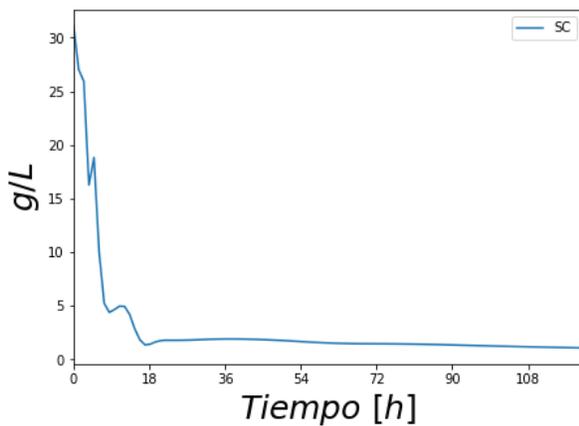
Al igual que en las fermentaciones espontáneas, la hidrólisis de las LB (**Figura 69**) fue más uniforme en comparación con las LC (**Figura 70**), que presentaron un aumento de ART más espaciado en el tiempo. Es decir, LB mostró picos mayores, mientras que LC presentó picos de menor intensidad y distribuidos en el tiempo.



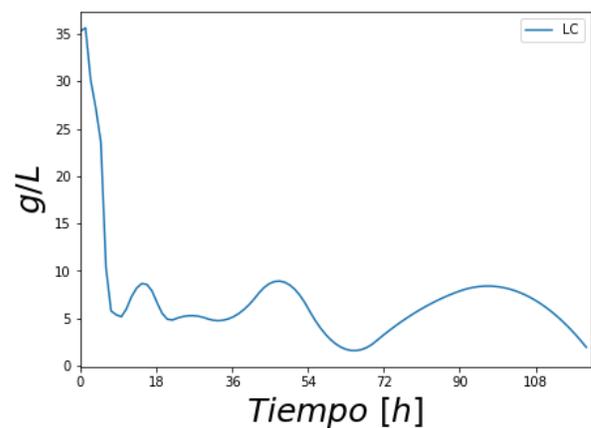
**Figura 67.** ART para CG en función del tiempo.



**Figura 69.** ART para LB en función del tiempo.

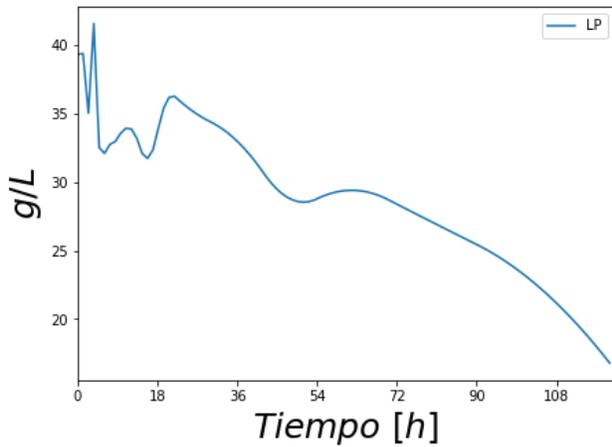


**Figura 68.** ART para SC en función del tiempo.

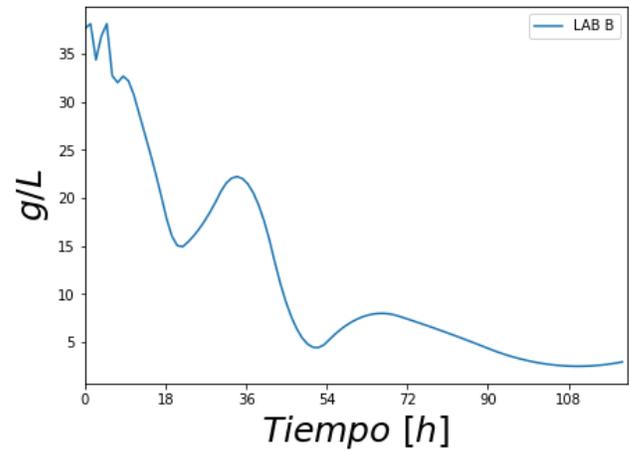


**Figura 70.** ART para LC en función del tiempo.

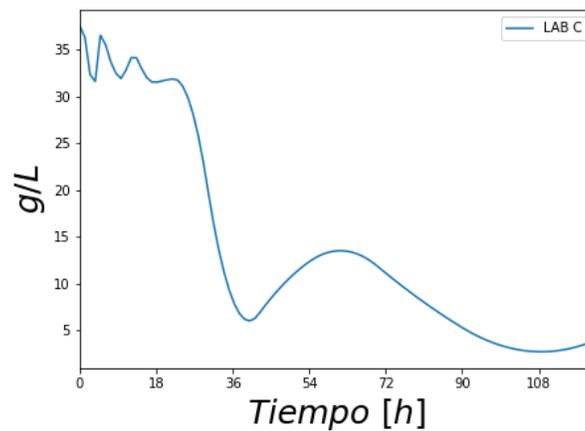
Por el lado de las bacterias ácido lácticas, se evidenció hidrólisis por parte de LP (**Figura 71**), LAB B (**Figura 72**) y LAB C (**Figura 73**). Sin embargo, la curva presentada para LP genera dudas por su comportamiento, los picos no difieren mucho de su comportamiento y los primeros puntos tienen bastante ruido, por lo que se considera la posible presencia de contaminantes que afecten la lectura. Adicionalmente, las LAB B presentan una mayor capacidad de hidrólisis que las LAB C, lo que permite explicar la fermentación espontánea del café B a pesar de la disminución de la población de levaduras.



**Figura 71.** ART para LP en función del tiempo.



**Figura 72.** ART para LAB B en función del tiempo



**Figura 73.** ART para LAB C en función del tiempo

A pesar que algunos microorganismos presentaron bajo rendimiento de biomasa como el caso de *Lactobacillus plantarum* sí presentaron consumo de azúcares e hidrólisis de la pectina presente en el medio, lo que sugiere que la tasa de muerte celular está cerca a la tasa de crecimiento, sugiriendo poca adaptabilidad al medio de cultivo.

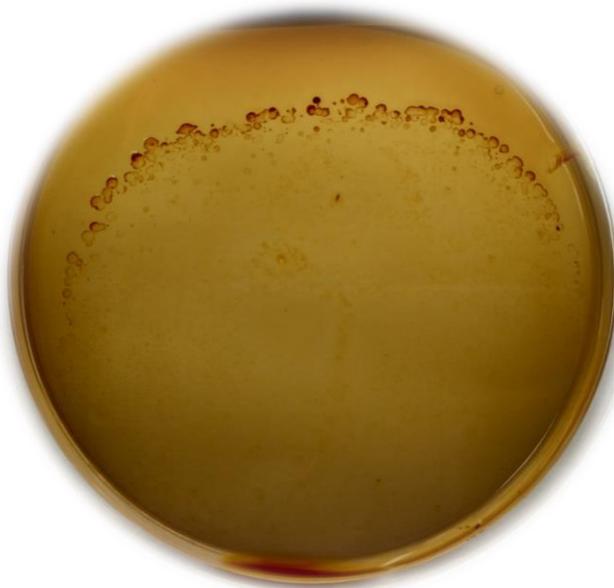
#### **K. Determinación capacidad de hidrólisis de las pectinas por parte de los microorganismos evaluados**



**Figura 74.** Actividad pectinolítica *Candida Guilliermondii*.



**Figura 76.** Actividad pectinolítica YB.



**Figura 75.** Actividad pectinolítica *Saccharomyces Cerevisiae*.



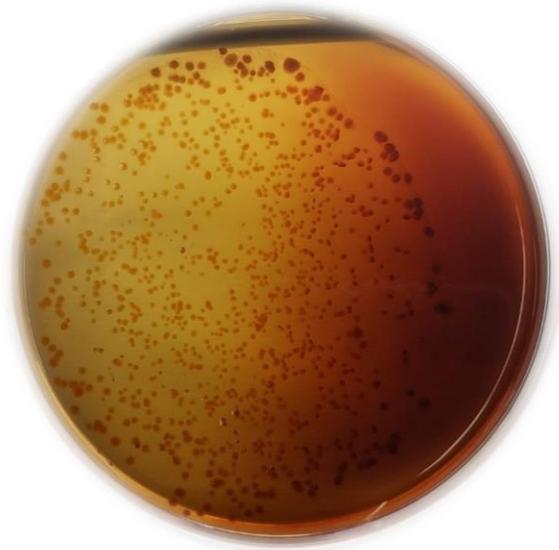
**Figura 77.** Actividad pectinolítica YC

Los resultados del ensayo para determinar la capacidad de degradación de pectina por parte de las levaduras revelaron una destacada actividad pectinolítica en las levaduras endógenas del café, como se puede observar en la **Figura 77** y la **Figura 76**. Además, se evidenció cierta

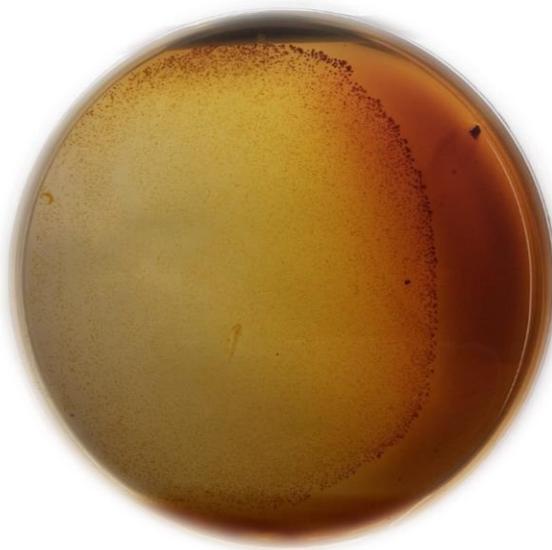
capacidad pectinolítica en la cepa *Saccharomyces Cerevisiae*, como se muestra en la **Figura 75**, mientras que la *Candida Guilliermondii* presentó resultados inferiores a las demás levaduras, según lo indicado en la **Figura 74**. La interpretación de estos resultados se basa en la observación de la coloración amarilla en el medio, siendo una mayor intensidad de coloración amarilla indicativa de una mejor capacidad pectinolítica.



**Figura 78.** Actividad pectinolítica LP.



**Figura 79.** Actividad pectinolítica LAB B.

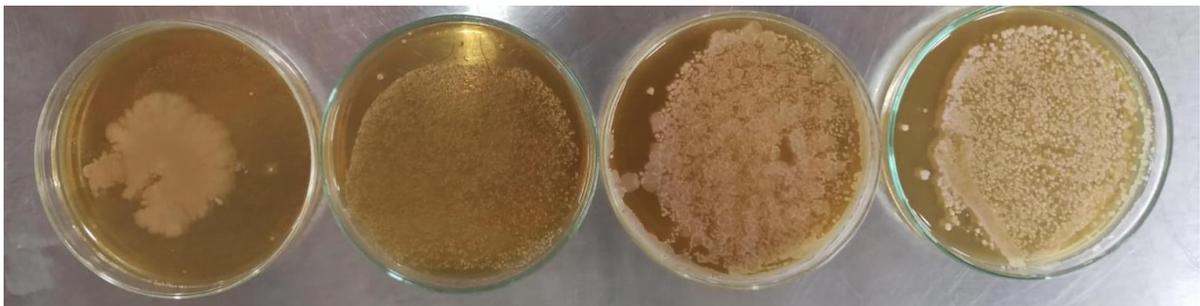


**Figura 80.** Actividad pectinolítica LAB C

En lo que respecta a las bacterias ácido lácticas, se observó que aquellas obtenidas durante la fermentación del café C exhibieron la mejor capacidad pectinolítica. Les siguieron en capacidad las bacterias provenientes del café B, y en última instancia, *Lactobacillum Plantarum*, siendo esta última una cepa que no está naturalmente adaptada al consumo de pectina y afirmando la sospecha que se había generado en el consumo de azúcares presentado en la **Figura 71**. En los estudios realizados con esta cepa se han realizado inóculos con levaduras pectinolíticas para potenciar los atributos de cada cepa [37].

### G. Determinación presencia microorganismos fermentadores de pentosas

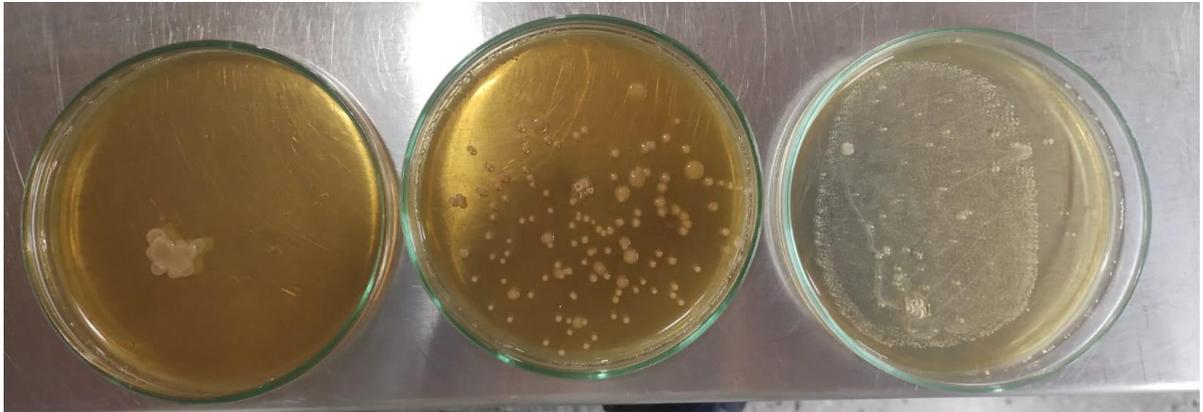
La **Figura 81** evidencia la presencia de colonias en todas las cajas que contienen las siembras realizadas con las levaduras, lo cual era esperado para la levadura *Candida Guilliermondii* (CG) y las levaduras nativas del café, dado el consumo de xilosa presentado en la fermentación espontánea. No obstante, se esperaba que la *Saccharomyces cerevisiae* (SC) no manifestara crecimiento en este medio, ya que naturalmente carece de la capacidad para metabolizar pentosas. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que se haya utilizado una cepa contaminada en el proceso o haya sido una cepa modificada para que adquiriera la capacidad de metabolizar pentosas.



**Figura 81.** Levaduras (CG, SC, YB, YC)<sup>9</sup>

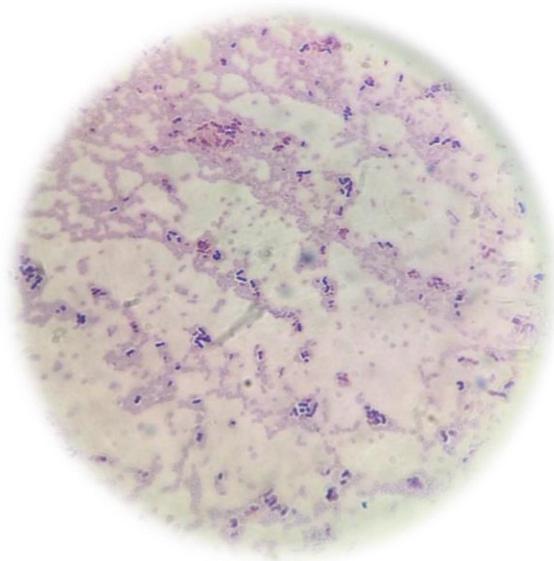
De manera similar, se observa crecimiento en todas las cajas que contienen las siembras realizadas con las bacterias ácido lácticas. No obstante, a simple vista se aprecia una cantidad menor de colonias en comparación con las presentadas por las levaduras, lo que sugiere una mayor eficacia en la capacidad de metabolizar pentosas por parte de estas últimas.

<sup>9</sup> CG: *Candida Guilliermondii*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, LB: Levaduras aisladas de la variedad Tabi, LC: Levaduras aisladas de la variedad Colombia.

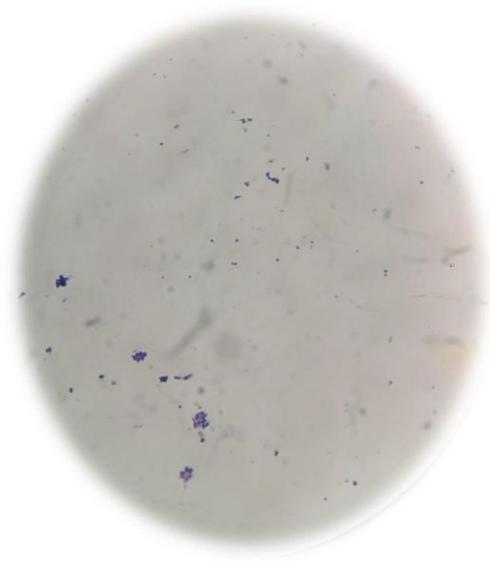


**Figura 82.** Ácido lácticas (LP, LAB B, LAB C)<sup>10</sup>

Los resultados de las pruebas de microscopía fueron reveladores al momento de seleccionar los microorganismos para la fermentación controlada. En el caso de la CG, se observó poca cantidad de células (**Figura 83**). Para la SC, se identifica la presencia de pocas levaduras, y se deduce que son de la cepa prevista para la SC (**Figura 84**). La microscopía de las levaduras nativas arrojó resultados sorprendentes en cuanto a la morfología y cantidad de células (**Figura 85** y **Figura 86**)

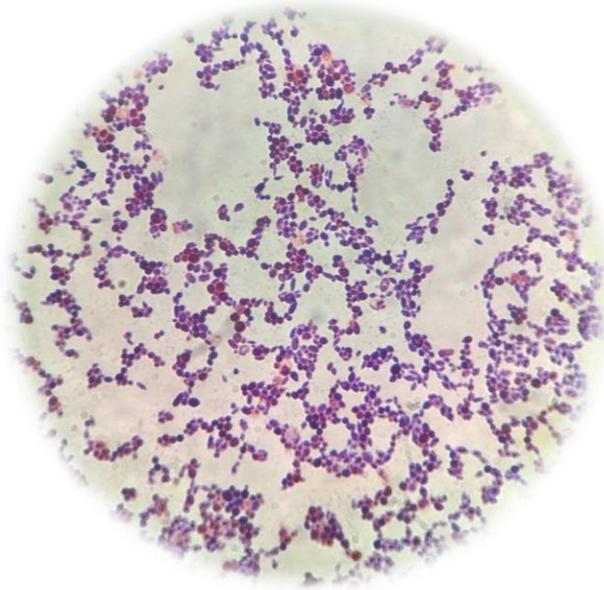


**Figura 83.** Microscopía CG (40x)

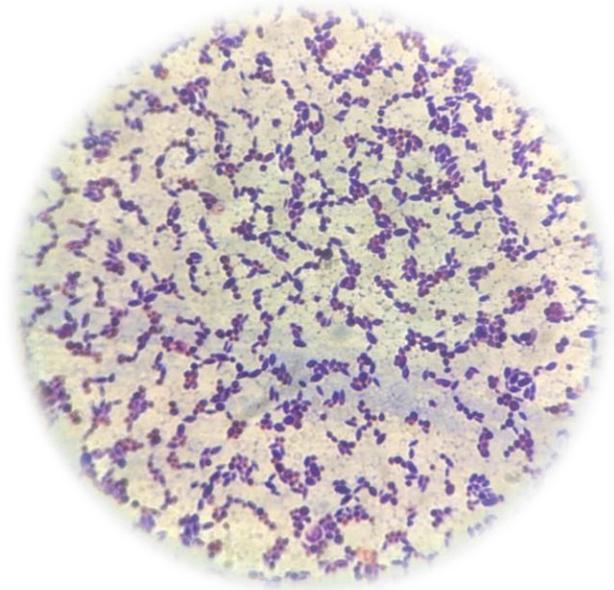


**Figura 84.** Microscopía SC (40x)

<sup>10</sup> LP: *Lactobacillus plantarum*, LAB B: Bacterias ácido lácticas aisladas de la variedad Tabi, LAB C: Bacterias ácido lácticas aisladas de la variedad Colombia.

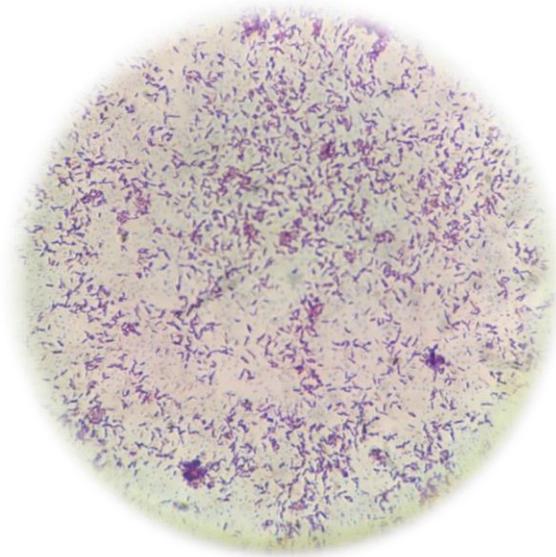


**Figura 85.** Microscopía YB (40x)

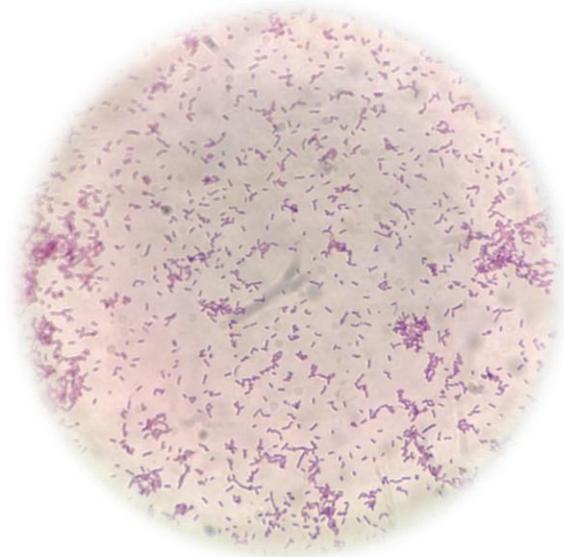


**Figura 86.** Microscopía YC (40x)

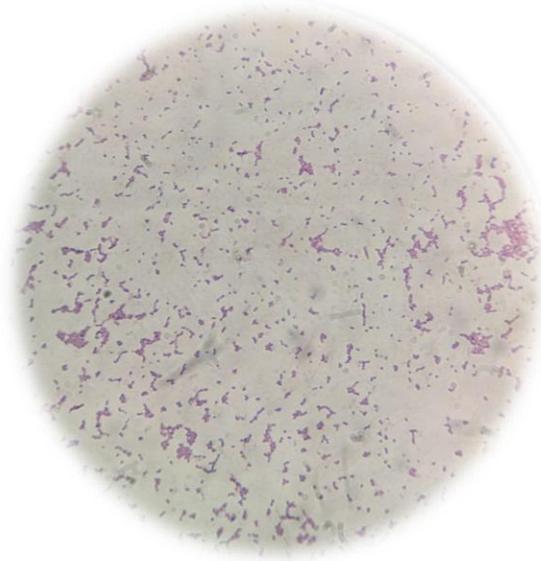
En cuanto a las bacterias ácido lácticas, se observa la presencia abundante de bacilos y escasa o nula evidencia de otra morfología celular, como los cocos (**Figura 87, Figura 88 y Figura 89**).



**Figura 87.** Microscopía LP (40x)



**Figura 88.** Microscopía LAB B (40x)



**Figura 89.** Microscopía LAB C (40x)

#### H. Evaluación esterilización in situ

El medio de fermentación de café es un medio bastante complejo, por lo que se dificultó la aplicación de métodos de esterilización adecuados para la disminución de la carga de microorganismos nativos. Si bien los resultados presentados en la **TABLA VIII** respaldan la eficacia del método de esterilización empleado, no se implementó en la práctica. Esto debido a las alteraciones observadas en las propiedades organolépticas del café, evidenciándose cambios en el aroma y en la apariencia que son característicos del café recién despulpado. Durante este proceso se pudo observar la aparición de precipitados, pudiendo ser la desnaturalización de las proteínas presentes en el medio y cambios en el aroma, pudiendo ser la pérdida de compuestos aromáticos.

**TABLA VIII.** CONTEO UFC [LOG(UFC/mL)]

Medio		YM	MRS	EMB	WL
Instante					
$T_{amb}$		5.7684	7.1864	6.0620	7.2447
<b>15 min</b>		4.3010	7.8069	4.6690	7.1626
$T_F$		0.0000	3.5229	0.0000	3.5229

Para efectos del presente estudio se prescindió del uso de cualquier forma de esterilización y se optó por la implementación de fermentaciones controladas haciendo uso exclusivamente de cultivos iniciadores.

### I. Evaluación fermentación controlada con cultivos iniciadores.

El ensayo de fermentación con cultivos iniciadores se realizó sobre un lote de fermentación que se iba a instalar el día del ensayo, este lote consistía en la mezcla de dos variedades diferentes, variedad Catuai y variedad Castilla, ambas variedades cultivadas también a diferentes altitudes por encima de los 1400 *msnm*. Se tomó la determinación de realizar el ensayo debido a la imposibilidad de realizar lotes separados en el proceso de beneficio tradicional que se implementa en las cadenas de producción del grano en el país.

Al terminar los ensayos de fermentación se observó crecimiento microbiológico en los blancos **Figura 90**, lo que permite identificar la presencia de cepas nativas en las fermentaciones. Además, se observó un crecimiento heterogéneo en los demás recipientes. Asimismo, se obtuvieron fermentaciones con crecimiento abundante de microorganismos (**Figura 91**) y otros donde era difícil determinar el crecimiento de cualquier microorganismo (**Figura 92**).



**Figura 90.** Blancos.



**Figura 91.** Fermentación con evidencia clara de microorganismos.



**Figura 92.** Fermentación sin evidencia aparente de microorganismos

Aparte de lo mencionado anteriormente, se observó un proceso exitoso de eliminación del mucílago durante el lavado de las muestras antes de someterlas al secado. Esto se evidenció mediante el cambio en el medio (**Figura 93**). Sin embargo, como se evidenció en todo lo anterior esto no significa que el proceso de fermentación sea diferenciador en el perfil de taza.



**Figura 93.** Lavado de las muestras.

Para garantizar la uniformidad del procedimiento en las muestras, estas se sometieron a secado solar (**Figura 94**).

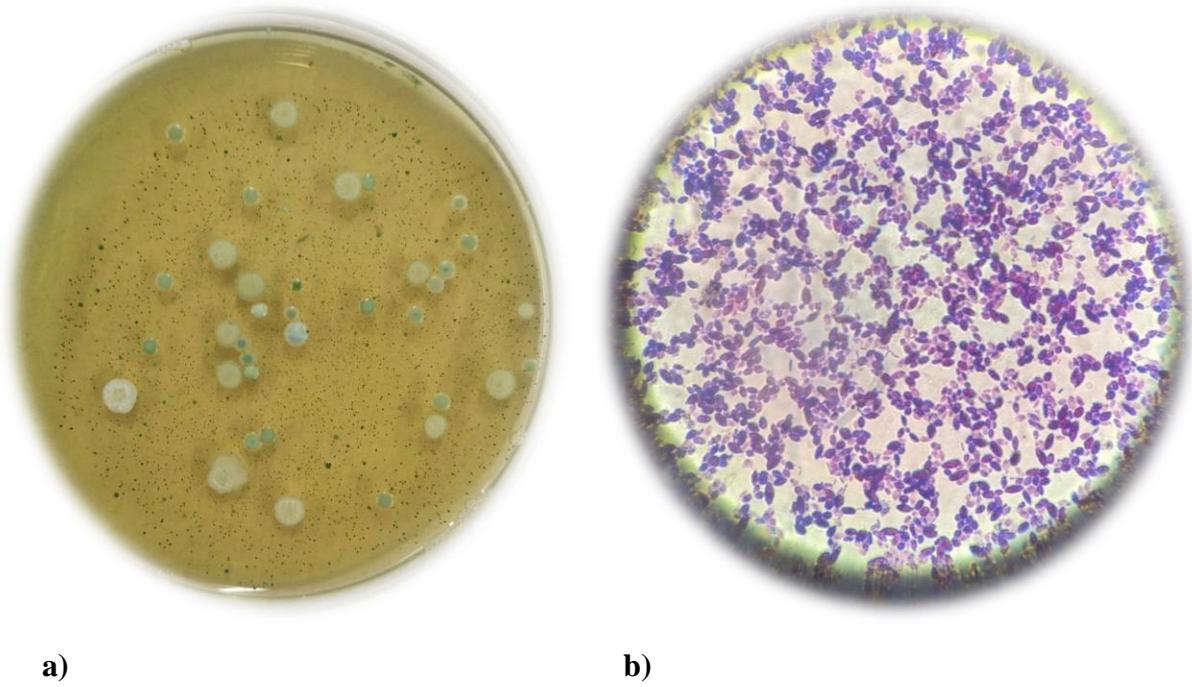


**Figura 94.** Secado de las muestras.

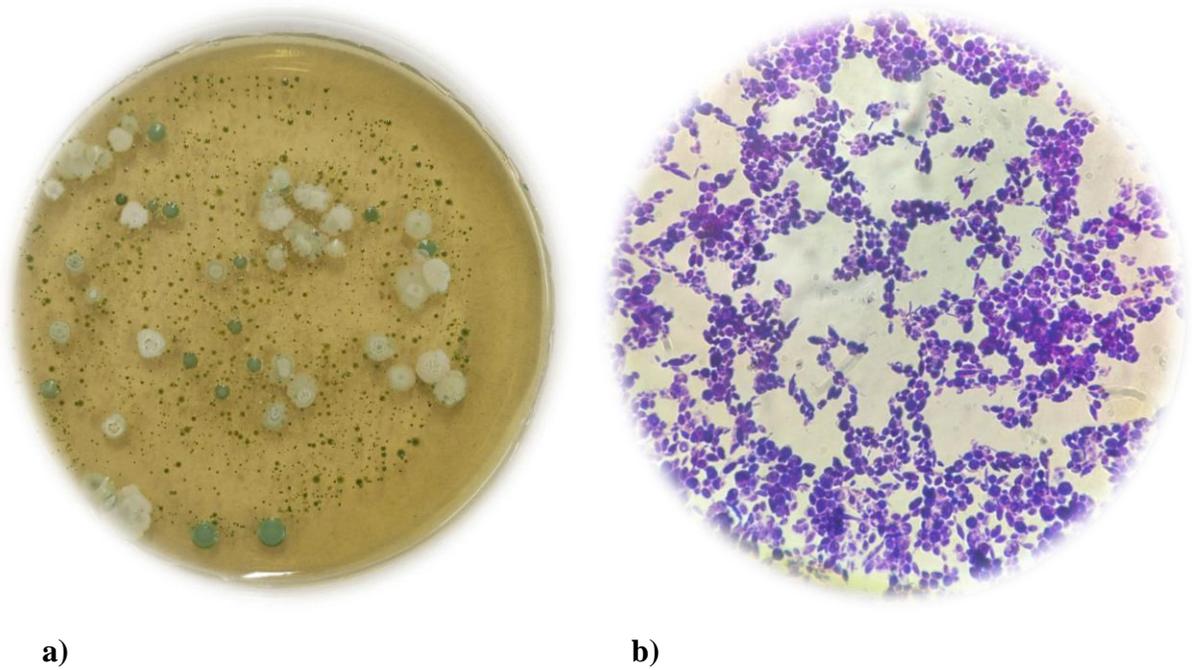
Para determinar la eficiencia del método de inoculación se realizó la prueba de microscopía para las muestras que contienen inóculos puros. Esto debido a la facilidad de identificar una sola variedad de microorganismos bajo el microscopio frente a las muestras que presentan diferentes tipos de microorganismos.

A partir de la **Figura 95**, se dedujo que, a pesar de mantener el café despulpado sin contacto con el agua de proceso y sin adicionar inóculo, se registra un crecimiento de diversas colonias, que podrían incluir levaduras y bacterias acidificantes de acuerdo a los microorganismos presentes naturalmente en este tipo de muestras [10]. Aunque se evidencia un crecimiento, este es menor en comparación con las demás muestras.

La **Figura 96** reveló que el agua de proceso, al entrar en contacto con los lotes de fermentación, se convierte en una fuente significativa de microorganismos participantes en las fermentaciones. Se observa un aumento en el número de colonias en comparación con el café procesado en seco



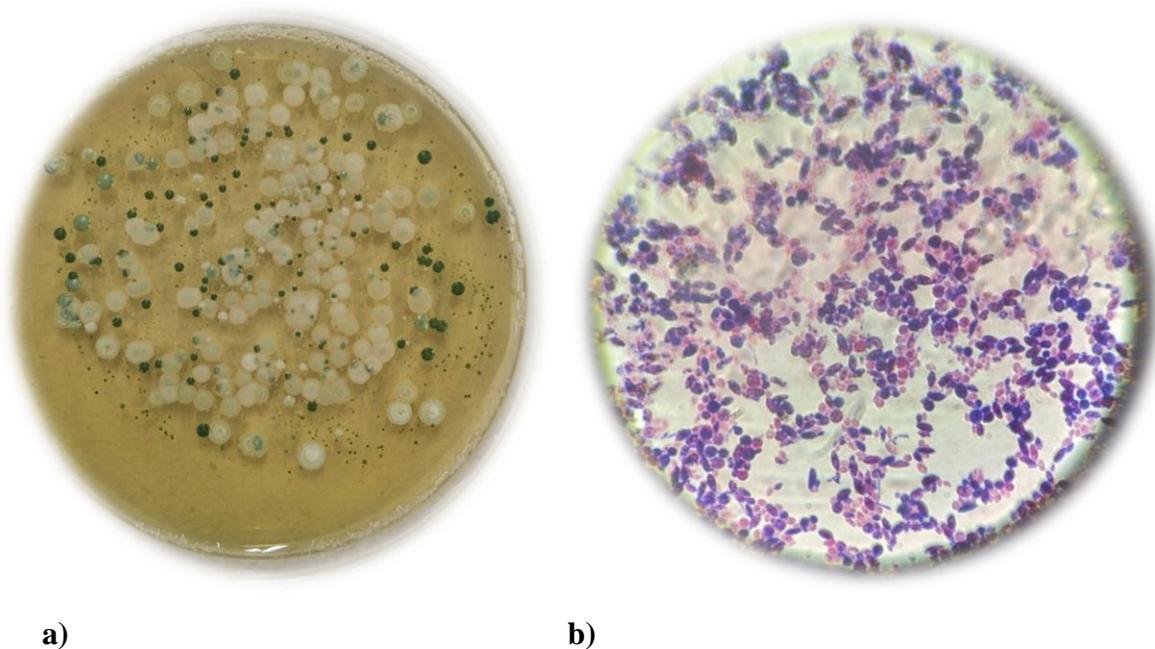
**Figura 95.** Muestra seca. a) Cultivo en Petri. b) Cultivo bajo el microscopio



**Figura 96.** Blanco. a) Cultivo en Petri. b) Cultivo bajo el microscopio

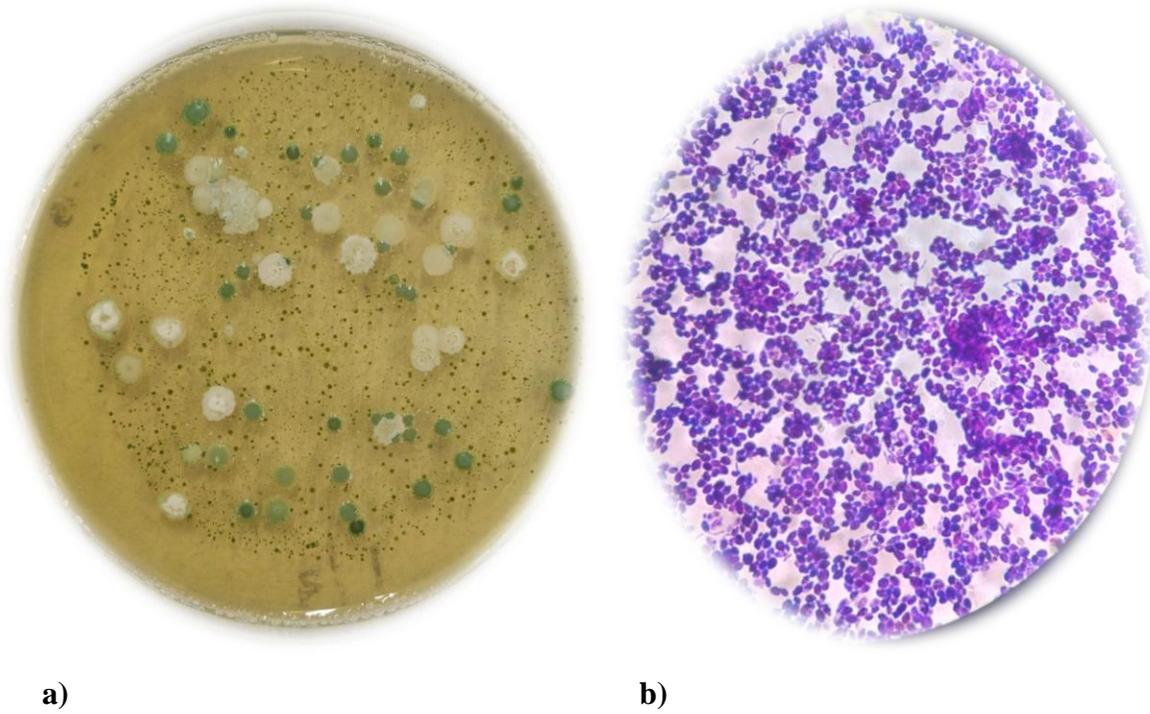
Las muestras tomadas al finalizar la fermentación controlada arrojaron como resultado la obtención de cultivos heterogéneos. No obstante, a pesar de esta heterogeneidad, se logró dirigir el comportamiento de algunas fermentaciones, como en el caso de la muestra 9 (**Figura 100**), donde se esperaba un mayor crecimiento de levaduras debido a la inoculación con levaduras obtenidas de la fermentación espontánea del café B (variedad Tabi).

De manera contraria, se observó que las siembras realizadas únicamente con bacterias ácido lácticas presentaron evidencia del crecimiento de levaduras (**Figura 97** y **Figura 98**), lo que indica que estos cultivos requieren una disminución de la carga inicial de levaduras presentada por el café a fermentar.

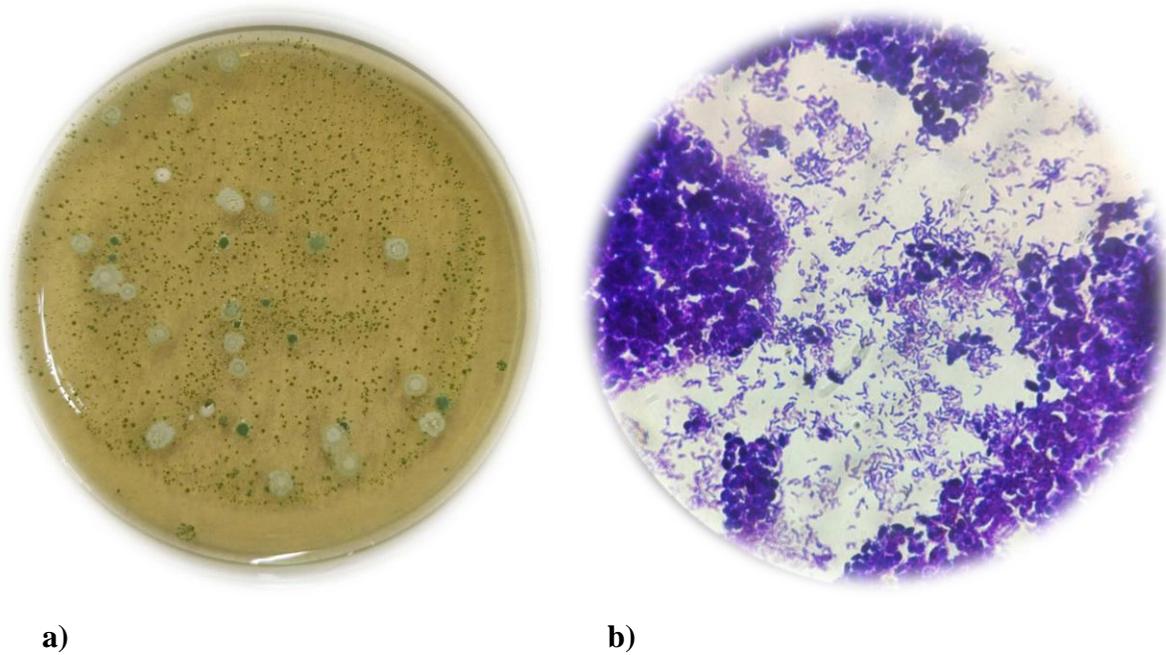


**Figura 97.** Muestra 20 (LAB B). **a)** Cultivo en Petri. **b)** Cultivo bajo el microscopio

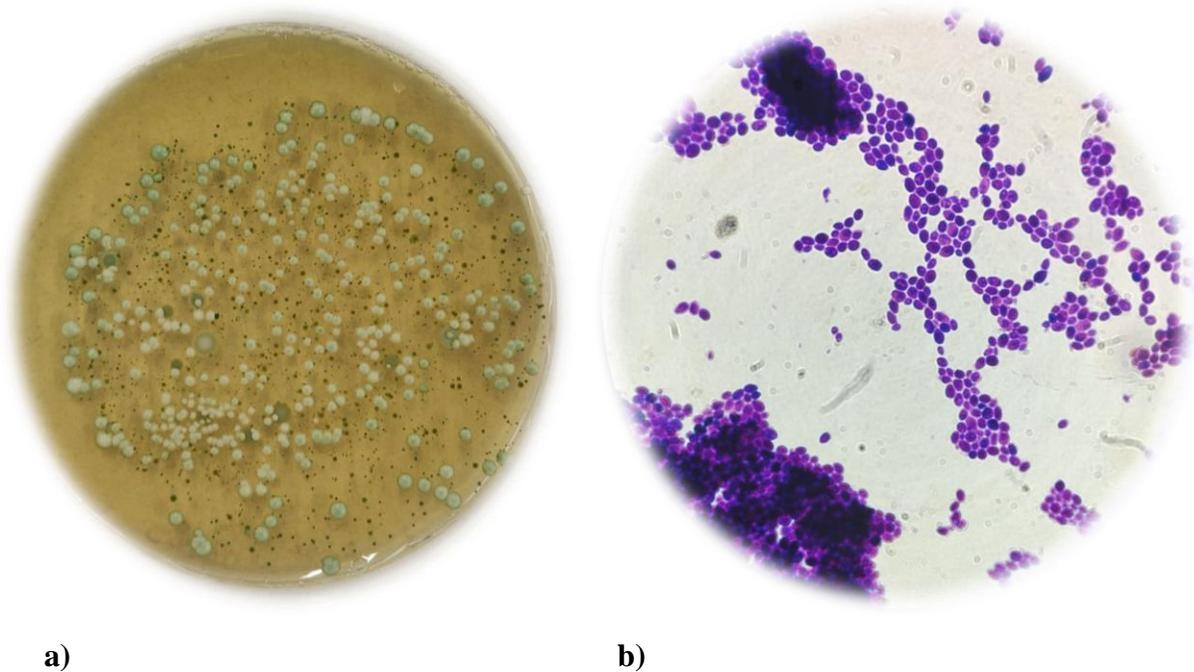
La **Figura 99** arrojó la presencia de gran cantidad de bacilos en una fermentación en la que se esperaba mayor concentración de levaduras, esto muestra la importancia de realizar un control eficiente de las poblaciones iniciales en estos procesos de fermentación con cultivos iniciadores



**Figura 98.** Muestra 18 (LP). **a)** Cultivo en Petri. **b)** Cultivo bajo el microscopio

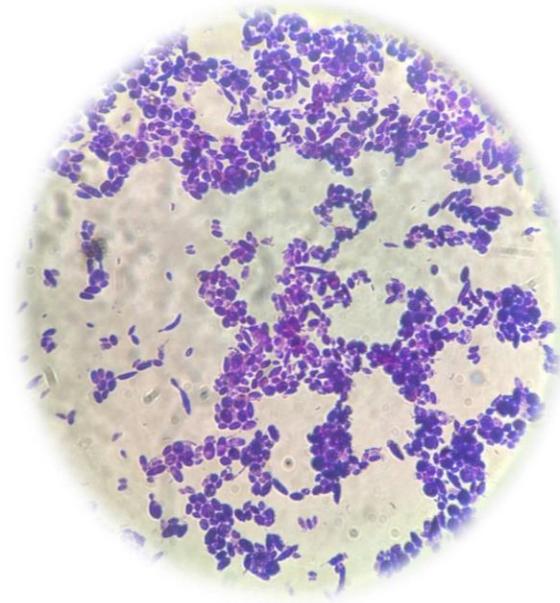


**Figura 99.** Muestra 16 (LC). **a)** Cultivo en Petri. **b)** Cultivo bajo el microscopio



**Figura 100.** Muestra 9 (LB). **a)** Cultivo en Petri. **b)** Cultivo bajo el microscopio

Además de lo mencionado anteriormente, la **Figura 101** revela la presencia de conidios en las fermentaciones realizadas. Dicha observación es motivo de preocupación, ya que no se esperaba la presencia de hongos filamentosos en estas fermentaciones. Esta presencia inesperada puede tener un impacto significativo en las fermentaciones realizadas en el lugar si no se controlan adecuadamente las variables de proceso, como el tiempo. Se presume que estos conidios provienen del cultivo y podrían estar relacionados con la enfermedad de la Roya, que suele afectar las plantaciones, especialmente en la época en la que se llevó a cabo el estudio



**Figura 101.** Presencia de conidios.

Los resultados del proceso de cata realizado por los maestros tostadores de la finca respaldaron las suposiciones realizadas durante la evaluación microscópica de las fermentaciones. La muestra 9, que es el café fermentado con las levaduras YB, exhibió los mejores atributos en términos de calidad según la evaluación sensorial, en esta evaluación se determinaron parámetros como el aroma, el sabor principal y el sabor residual.

De acuerdo con la **TABLA IX**, se observó que los blancos arrojaron resultados diferentes a pesar de que se sometieron a las mismas condiciones de proceso. Esto resalta la influencia significativa de la estocasticidad en los procesos de fermentación realizados sin control. Además, el café procesado en seco, que mostró una baja presencia de microorganismos, obtuvo resultados insuficientes en sus propiedades organolépticas

Los resultados más buscados en la finca son cafés con perfiles de frutas, chocolates y cítricos, los cuales se obtuvieron en ciertas muestras, particularmente las muestras que contienen las levaduras YB presentaron resultados positivos.

**TABLA IX. RESULTADOS RELEVANTES EN LAS PROPIEDADES DE LA TAZA.**

<b>Número muestra</b>	<b>LB</b>	<b>LC</b>	<b>LP</b>	<b>LAB B</b>	<b>Aroma</b>	<b>Sabor</b>	<b>Sabor</b>
<b>1</b>	0	133.3332	133.3332	133.3332	Chocolate dulce	Afrutado	Chocolate amargo
<b>2</b>	266.6668	0	133.3332	0	Aromático <sup>11</sup>	Cereal	Afrutado
<b>3</b>	0	266.6668	133.3332	0	Cítrico	Afrutado	Dulce
<b>5</b>	0	133.3332	0	266.6668	Cereal <sup>12</sup>	Dulce	Bastante ácido
<b>6</b>	133.3332	133.3332	0	133.3332	Chocolate	Panela	Caramelo
<b>8</b>	266.6668	0	0	133.3332	Chocolate	Cereal	Afrutado
<b>9</b>	400	0	0	0	Chocolate	Dulce	Frutos secos
<b>10</b>	0	133.3332	266.6668	0	Cítrico	Aromático	Cítrico
<b>11</b>	0	0	266.6668	133.3332	Maíz	Compuestos fenólicos	Compuestos químicos
<b>12</b>	0	266.6668	0	133.3332	Dulce	Chocolate	Plano <sup>13</sup>
<b>13</b>	133.3332	0	133.3332	133.3332	Cítrico	Dulce	Chocolate
<b>14</b>	133.3332	0	0	266.6668	Salado	Plano	Amargo
<b>15</b>	266.6668	133.3332	0	0	Dulce	Caramelo	Panela
<b>16</b>	0	400	0	0	Plano	Dulce	Plano
<b>17</b>	133.3332	0	266.6668	0	Chocolate blanco	Plano	Frutos secos
<b>20</b>	0	0	0	400	Chocolate oscuro	Caramelo	Aromático
<b>Blanco</b>	0	0	0	0	Plano	Chocolate	Plano
<b>Blanco 2</b>	0	0	0	0	Dulce	Plátano	Chocolate
<b>Seco</b>	0	0	0	0	Plano	Dulce	Plano

<sup>11</sup> Hierbas aromáticas<sup>12</sup> Atributo relacionado con las propiedades de los cereales como arroz, avena, etc.<sup>13</sup> El sabor se va rápido, pobre de cuerpo

## IX. DISCUSIÓN

En el proceso de beneficio del café, diversas situaciones afectan la población microbiana en la fermentación utilizada para eliminar el mucílago. Para el caso de la caficultura colombiana se tiene que el método de beneficio húmedo tradicionalmente utilizado implica instalaciones en las cuales los procesos de limpieza se realizan solo con agua, ya que otros agentes como jabones o detergentes podrían tener un impacto negativo en la calidad del producto final. Esta práctica representa un desafío al implementar procesos con mayor control y trazabilidad. Además, las instalaciones utilizadas no permiten un proceso en el cual las etapas se den de manera independiente; es decir, una situación presentada en una de las etapas afecta directamente el desarrollo normal del beneficio.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, el hecho que las condiciones ambientales influyan directamente en los microorganismos presentes en la fermentación afecta considerablemente la calidad final del café [7], esta situación fue evidenciada de manera clara en los procesos estudiados en la *Finca La Manchuria*, donde la estocasticidad de los procesos fermentativos imposibilitan la trazabilidad de los resultados obtenidos. Esta situación se ve intensificada durante los picos de producción donde se tienen pocas posibilidades de maniobra debido a los grandes volúmenes de grano por procesar, llegando incluso a tener una producción de 50 toneladas por día (proyección para el año 2025).

Sin embargo, las situaciones expuestas se configuran en una oportunidad de mejora sin precedentes para la producción cafetera, debido a que la calidad del producto obtenido a través de estos procesos estocásticos subyace en la composición química del grano [10], definiendo como línea base un proceso susceptible a la implementación de cultivos iniciadores, los cuales han demostrado su capacidad de mejorar la calidad de la bebida producida [11].

El mucílago que recubre los granos de café después de ser despulpados se presenta como una fuente de nutrientes significativa al implementar procesos biotecnológicos relacionados con el café. Este componente, a menudo desaprovechado en los métodos de procesamiento tradicionales, ofrece una oportunidad para desarrollar tecnologías y metodologías que mejoren la eficiencia en la producción y aumenten la rentabilidad en la caficultura.

No obstante, el porcentaje de humedad encontrado para el mucilago supera el 84 % *p/p*, un valor que se aproxima a lo reportado en la literatura donde se dan valores cercanos al 86 %

[33][12]. Las fuentes de carbono presentes en el mucilago analizado incluyen azúcares simples con una mayor presencia de xilosa en comparación con la glucosa, sin evidencia de otros azúcares simples como fructosa, galactosa o arabinosa [38]. La concentración de azúcares totales reportados en este estudio están cerca al 15 %, un resultado que representa más del doble de lo reportado en literatura donde se reportan valores entre el 6 y el 7 por ciento [33], resultado que podría estar alejado por el método implementado que incluye el uso de titulaciones [26]. Los demás resultados también se alejan de los valores reportados en la literatura, para el caso de los alcoholes se tiene un resultado cercano al 1.3 % mientras que la literatura reporta un 0.12 % [33].

Aunque los resultados obtenidos para la caracterización química del mucilago representan una línea base para tomar decisiones acerca de la implementación de las fermentaciones controladas, se debe tener en cuenta que esta composición no es una generalidad y se ve afectada por factores como la altitud de cultivo y la variedad de café trabajada, en este estudio se encontró que a mayor altitud mayor concentración de nutrientes como azúcares y proteínas.

Adicional a la microbiota presente en los procesos fermentativos dados de forma espontánea, se tiene que la temperatura de proceso está influenciada por las condiciones ambientales, lo que representa una oportunidad de mejora dado que esta variable de proceso tiene un efecto significativo en los resultados obtenidos [30], ya que configurarse como un factor estresante para los microorganismos y disminuir su actividad en el medio [10]

Sumado a todo lo anterior, el pH es un parámetro de gran influjo en el proceso fermentativo, pudiendo ser una variable de proceso que facilite el proceso debido a su importancia en la acción hidrolítica de las enzimas [33].

Las fermentaciones implementadas en el proceso de desmucilaginado posibilitan cambios fisicoquímicos en el café que podrían resultar en mejoras sustanciales de los perfiles de taza obtenidos [13]. Sin embargo, muchas veces estos procesos no conllevan los cambios esperados debido a las malas prácticas implementadas en la determinación del momento final de fermentación [35], pues se espera un consumo cercano al 60 % [10] de los azúcares disponibles en el medio por parte de los microorganismos presentes en el medio que son los que segregan los metabolitos responsables de los cambios en el café. En este estudio se demostró que consumos menores de azúcares se traducen en perfiles de taza menos apetecidos por el consumidor final. A medida que avanzan los estudios sobre las fermentaciones controladas, se espera obtener un mejor

---

entendimiento de cómo los metabolitos generados en esta etapa migran al interior del grano, lo que facilitará un aprovechamiento más eficiente de este proceso.

El comportamiento químico de las fermentaciones implementadas en el proceso de beneficio húmedo del café está intrínsecamente relacionado con el comportamiento microbiológico en el medio, en este estudio se estableció que una mayor concentración de bacterias ácido lácticas conlleva a una mayor concentración de ácido láctico en la fermentación. De la misma forma, una mayor concentración de bacterias permite la obtención de mayor concentración de ácido acético. Por lo cual se deduce que un control sobre la acidez del producto obtenido se puede lograr a través de un control de dichas poblaciones. En este sentido se tiene que las poblaciones microbianas presentes en el medio fermentativo son responsables de los cambios fisicoquímicos que experimentan los granos sometidos a desmucilaginado por medio de la fermentación.

Así como las bacterias influyen directamente sobre el pH del medio de fermentación, es importante que las poblaciones de levaduras sean significativamente elevadas para obtener la mayor cantidad posible de metabolitos secundarios que mejoren el perfil de taza obtenido [6].

El uso de biorreactores para la fermentación de café es un campo de estudio que se viene abriendo paso en la industria cafetera. Sin embargo, el uso de este tipo de metodologías exige un mayor entendimiento de los procesos fermentativos para lograr el alcance de los objetivos propuestos [39]. De lo contrario este tipo de procesos puede ir en detrimento de la calidad del producto final. En este contexto, se evidenció la importancia crucial de la fermentación en el procesamiento del café, este proceso no sólo se encarga de eliminar el mucílago, sino que, bajo un control adecuado, desempeña un papel fundamental en la creación de características sensoriales de alta calidad. No obstante, presenta la desventaja que implementado de manera inadecuada genera sabores desagradables y características indeseables [12].

La implementación de fermentaciones controladas requiere que los microorganismos elegidos como cultivos iniciadores posean ciertas cualidades, como la ausencia de patogenicidad y toxicidad, así como una fácil adaptación al entorno fermentativo. Además, es crucial que estos microorganismos generen metabolitos que mejoren la calidad sensorial, extiendan la vida útil, reduzcan el tiempo de procesamiento e inhiban el desarrollo de microorganismos perjudiciales. Aunque es factible seleccionar algunas cepas de la diversa microflora presente en la fermentación espontánea del café para usarlas como cultivos iniciadores, aún falta una investigación exhaustiva sobre su potencial impacto en la fermentación del café. En su mayoría, los microorganismos

aislados de esta fermentación espontánea carecen de las características necesarias para realzar la calidad sensorial de la bebida [12]. Por lo anterior, se deben elegir cuidadosamente las cepas mejor adaptadas al medio de fermentación para tener la oportunidad de utilizarlas de manera efectiva a lo largo del tiempo. Los microorganismos autóctonos, aunque pueden tener una capacidad innata para sobrevivir en el entorno cafetero, a menudo presentan una menor capacidad de adaptación. Explorar y comprender las condiciones específicas del ambiente cafetero puede ser clave para desarrollar nuevos cultivos iniciadores para los procesos de fermentación del café [10].

Pese a que la capacidad de adaptación al medio fermentativo es importante, también es crucial enfocarse en la selección de cepas con la capacidad de mostrar actividad pectinolítica, esto para lograr la hidrólisis del mucílago del grano de café. Puesto que la eliminación microbiana del mucílago no solo facilita el proceso de secado del grano, sino que también genera metabolitos que se difunden en el interior de los granos de café y reaccionan con las sustancias responsables del sabor en la bebida final [10][40].

Después de determinar la adaptación al medio de fermentación y la capacidad pectinolítica de los microorganismos, es esencial evaluar su capacidad para metabolizar pentosas, dada la presencia de azúcares como xilosa y arabinosa en el medio fermentativo. Estos azúcares de 5 carbonos, son fuentes de carbono significativas. Se ha observado que, durante el proceso de fermentación, las bacterias ácido lácticas descomponen tanto pentosas como hexosas presentes en la pulpa del café, generando diversos metabolitos finales como ácido láctico, ácido acético,  $CO_2$  y etanol a través de la fosfocitolasa o la vía de las pentosas fosfato [41][42].

A pesar de los resultados obtenidos en este estudio acerca de la esterilización, se han reportado resultados exitosos al aplicar metodologías como el autoclave para la disminución de las cargas iniciales de microorganismos [43]. Sin embargo, para estudiar estos métodos es necesario tener presente el problema que significaría hacer el escalado del proceso a escalas industriales como podría demandar la producción cafetera a nivel nacional.

Al realizar los ensayos de fermentación controlada quedó demostrado que los procesos fermentativos implementados durante el beneficio húmedo del café tienen un impacto directo sobre las propiedades organolépticas del café producido. Sin embargo, la forma en que son utilizados actualmente por la mayoría de los productores, convierte la fermentación en una etapa que cumple un objetivo sencillo, como es el desmucilaginado y se deja de lado su valor como fuente de mejoras significativas. En el caso de las fermentaciones estudiadas, se encontraron fermentaciones

---

incompletas donde se dejan de aprovechar gran cantidad de nutrientes. Esto, a su vez, conlleva a una generación limitada de metabolitos, lo que se refleja en la calidad del café, determinada más por su composición química que por la implementación de procesos que contribuyan a su valor comercial.

En este estudio se demostró además, la importancia de las levaduras en la producción de metabolitos secundarios que permiten la mejora de las propiedades organolépticas de la bebida [30], incluso en cultivos con otros microorganismos como las bacterias ácido lácticas estos microorganismos juegan un papel crucial en la fermentación y la mejora del perfil de taza del café obtenido [37], [40].

Sin embargo, la implementación de procesos biotecnológicos en la producción de café implica determinar las metodologías a desarrollar y efectuar. En particular, la utilización de microorganismos requiere un profundo entendimiento de sus capacidades de adaptación al medio complejo presente en la fermentación, como su capacidad para aprovechar los nutrientes del medio y generar metabolitos secundarios que puedan mejorar el perfil del café en taza, sin descuidar el objetivo principal que es el desmucilaginado del café. Además, en el caso de fermentaciones como las implementadas en este estudio, es crucial conocer las relaciones entre los diferentes microorganismos que participan en dicho proceso para dirigir la fermentación y favorecer la proliferación de aquellos de interés para el proceso.

La implementación en campo de fermentaciones controladas con cultivos iniciadores para el desmucilaginado del café plantea un desafío desde el punto de vista de la ingeniería. No obstante, una vez establecido con éxito, tiene el potencial de transformar un proceso impredecible en una propuesta económicamente valiosa. Para adentrarse en esta dirección, es esencial comprender a fondo la ecología, fisiología, bioquímica y biología molecular del proceso. La aplicación de métodos moleculares avanzados, como las tecnologías ómicas que aún no se han utilizado en los estudios del café, puede ampliar significativamente el conocimiento que se tiene acerca del tema y abrir nuevos horizontes en la producción industrial de café, garantizando un sabor y calidad excepcionales [10].

---

## X. CONCLUSIONES

La implementación de procesos de fermentación controlada en el beneficio húmedo conlleva a la obtención de café con notables propiedades organolépticas mejoradas. Además, se observó que el uso de la microbiota extraída del proceso fermentativo del café de altura, especialmente las levaduras, resulta en una mejora significativa en el perfil de taza del café cultivado a menores alturas. Estas mejoras se logran incluso sin controlar otros parámetros de proceso como la temperatura. En cambio, los procesos fermentativos tradicionales son estocásticos, lo que dificulta su trazabilidad y reproducibilidad.

Del mismo modo se determinó la presencia de azúcares no fermentables en los procesos fermentativos, lo que supone un reto desde el punto de vista de la biología para implementar metodologías que permitan la utilización de estas fuentes de carbono y poder obtener metabolitos secundarios para mejorar las propiedades del café obtenido.

---

## XI. RECOMENDACIONES

Para el desarrollo de estudios posteriores, se recomienda:

- Evaluar la implementación de metodologías destinadas a disminuir la carga inicial de microorganismos provenientes de fuentes naturales de contaminación en el proceso. Esto permitirá lograr fermentaciones controladas con los cultivos iniciadores deseados.
- Desarrollar metodologías que sean escalables y que permitan llevar a cabo fermentaciones controladas a niveles de producción de café a gran escala. Dado que algunos productores pueden manejar hasta 50 toneladas de café cereza por día, abordar este desafío desde la ingeniería es esencial para mejorar los procesos de producción del café, el cual es un producto insignia en el país.
- Realizar estudios exhaustivos sobre el impacto de otras variables de proceso, como el tiempo y la temperatura. Estos estudios son necesarios para desarrollar metodologías que permitan identificar el punto final en la etapa de fermentación, garantizando así el máximo rendimiento sin comprometer la calidad del café debido a un control deficiente de los procesos.
- Desde el punto de vista de la ingeniería química, es importante determinar los mecanismos de transferencia de masa que facilitan la migración de metabolitos excretados por los microorganismos presentes en la fermentación. Evaluar y comprender estos mecanismos podría conducir a mejoras en la eficiencia de esta transferencia, contribuyendo así a la optimización del proceso.

---

**REFERENCIAS**

- [1] L. W. Lee, M. W. Cheong, P. Curran, B. Yu, and S. Q. Liu, “Coffee fermentation and flavor - An intricate and delicate relationship,” *Food Chem.*, vol. 185, pp. 182–191, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.124.
- [2] Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, “Variedades de café sembradas en Colombia,” *LA CARTILLA CAFETERA*, p. 22.
- [3] A. Farah and T. Ferreira dos Santos, “The Coffee Plant and Beans: An Introduction,” in *Coffee in Health and Disease Prevention*, V. R. Preedy, Ed. Rio de Janeiro: Academic Press, 2015, pp. 5–10.
- [4] R. C. Alves, F. Rodrigues, M. A. Nunes, A. F. Vinha, and M. B. P. P. Oliveira, “State of the art in coffee processing by-products,” in *Handbook of coffee processing by-products: sustainable applications*, C. M. Galanakis, Ed. Porto: Academic Press, 2017, pp. 1–26.
- [5] G. I. Puerta-Quintero, “Beneficie correctamente su café y conserve la calidad de la bebida,” *Avances Técnicos Cenicafé*, Chinchiná, pp. 1–8, Jun. 2000.
- [6] A. P. P. Bressani *et al.*, “Characterization of bioactive, chemical, and sensory compounds from fermented coffees with different yeasts species,” *Food Res. Int.*, vol. 150, no. October, 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110755.
- [7] P. Poltronieri and F. Rossi, “Challenges in Specialty Coffee Processing and Quality Assurance,” *Challenges*, vol. 7, no. 2, p. 19, 2016, doi: 10.3390/challe7020019.
- [8] L. L. Ruta and I. C. Farcasanu, “Coffee and yeasts: From flavor to biotechnology,” *Fermentation*, vol. 7, no. 1, 2021, doi: 10.3390/fermentation7010009.
- [9] C. H. J. Brando and M. F. P. Brando, “Methods of Coffee Fermentation and Drying,” in *Cocoa and Coffee Fermentations*, R. F. Schwan and G. H. Fleet, Eds. Boca Raton: CRC Press, 2014, pp. 368–394.
- [10] G. Vinícius de Melo Pereira, V. T. Soccol, S. K. Brar, E. Neto, and C. R. Soccol, “Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 13, pp. 2775–2788, 2017, doi: 10.1080/10408398.2015.1067759.
- [11] L. S. Ribeiro *et al.*, “Controlled fermentation of semi-dry coffee (*Coffea arabica*) using starter cultures: A sensory perspective,” *Lwt*, vol. 82, pp. 32–38, 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2017.04.008.

- 
- [12] M. Haile and W. H. Kang, “The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality,” *J. Food Qual.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4836709.
- [13] C. F. Silva, D. M. Vilela, C. de Souza Cordeiro, W. F. Duarte, D. R. Dias, and R. F. Schwan, “Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 29, no. 2, pp. 235–247, 2013, doi: 10.1007/s11274-012-1175-2.
- [14] T. Ferreira, J. Shuler, R. Guimarães, and A. Farah, “Introduction to Coffee Plant and Genetics,” in *Coffee: Production, Quality and Chemistry*, A. Farah, Ed. Croydon, UK: The Royal Society of Chemistry, 2019, pp. 3–25.
- [15] M. Hoseini, S. Cocco, C. Casucci, V. Cardelli, and G. Corti, “Coffee by-products derived resources. A review,” in *Biomass and Bioenergy*, vol. 148, no. August 2020, Elsevier Ltd, 2021, p. 106009.
- [16] S. K. Mangal, Ed., *Coffee: Planting, Production and processing*, 1st ed. New Delhi, India: Gene-Tech Books, 2007.
- [17] R. J. Guimarães, F. M. Borém, J. Shuler, A. Farah, and J. C. P. Romero, “Coffee Growing and Post-harvest Processing,” in *Coffee: Production, Quality and Chemistry*, A. Farah, Ed. Croydon, UK: The Royal Society of Chemistry, 2019, pp. 26–88.
- [18] M. N. Clifford and K. C. Willson, Eds., *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*, 1st ed. Westport, Connecticut: THE AVI PUBLISHING COMPANY, INC, 1985.
- [19] M. Valdespino-León *et al.*, “Biodegradable Electrospayed Pectin Films: An Alternative to Valorize Coffee Mucilage,” *Waste and Biomass Valorization*, vol. 12, no. 5, pp. 2477–2494, 2021, doi: 10.1007/s12649-020-01194-z.
- [20] W. Rakitikul and P. Nimmanpipug, “Degree of esterification and gelling properties of pectin structure in coffee pulp,” *Key Eng. Mater.*, vol. 675–676, pp. 11–14, 2016, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.675-676.11.
- [21] L. Flutto, “PECTIN | Properties and Determination,” in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, Second Edi., B. Caballero, Ed. Oxford: Academic Press, 2003, pp. 4440–4449.
- [22] S. Chamyuang, A. Owatworakit, U. Intatha, and S. Duangphet, “Coffee pectin production: An alternative way for agricultural waste management in coffee farms,” *ScienceAsia*, vol.

- 47, no. S1, pp. 90–95, 2021, doi: 10.2306/SCIENCEASIA1513-1874.2021.S003.
- [23] R. Schwan, C. Silva, and L. Batista, “Coffee Fermentation,” in *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology, Second Edition*, no. May, 2012, pp. 677–690.
- [24] P. Chandrayan, “Biological Function(s) and Application (s) of Pectin and Pectin Degrading Enzymes,” *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*, vol. 15, no. 1, pp. 87–100, 2018, doi: 10.13005/bbra/2611.
- [25] F. Fernandes, “Roasting,” in *Coffee: Production, Quality and Chemistry*, A. Farah, Ed. Croydon, UK: The Royal Society of Chemistry, 2019, pp. 230–257.
- [26] “(1) Determination of Total Sugar\_A Complete Procedure (Lane-Eynon Method) - YouTube.”  
[https://www.youtube.com/watch?v=3nKFslvjrtU&ab\\_channel=MicroChem%27sExperiments](https://www.youtube.com/watch?v=3nKFslvjrtU&ab_channel=MicroChem%27sExperiments) (accessed Jan. 22, 2024).
- [27] F. Pourkarim, E. Rahimpour, M. Khoubnasabjafari, V. Jouyban-Gharamaleki, S. Farhang, and A. Jouyban, “A Simple colorimetric method for determination of ethanol in exhaled breath condensate,” *Pharm. Sci.*, vol. 27, no. 2, pp. 297–301, 2021, doi: 10.34172/PS.2020.40.
- [28] G. A. Á. María, “Evaluación del potencial de bacterias nativas de Colombia para la transformación de pentosas y hexosas en etanol.” [Online]. Available: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59362>.
- [29] Fitri, A. B. Tawali, and A. Laga, “The effect of soaking time on mucilage removal from the coffee bean using pectinase enzyme,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 807, no. 2, 2021, doi: 10.1088/1755-1315/807/2/022053.
- [30] G. V. de Melo Pereira *et al.*, “Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 188, pp. 60–66, 2014, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008.
- [31] I. K. Olivares-Marin, J. C. González-Hernández, C. Regalado-Gonzalez, and L. A. Madrigal-Perez, “*Saccharomyces cerevisiae* exponential growth kinetics in batch culture to analyze respiratory and fermentative metabolism,” *J. Vis. Exp.*, vol. 2018, no. 139, pp. 1–10, 2018, doi: 10.3791/58192.
- [32] T. Padmavathi, R. Bhargavi, P. R. Priyanka, N. R. Niranjana, and P. V. Pavitra, “Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial

- purification,” *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 16, no. 2, pp. 357–362, 2018, doi: 10.1016/j.jgeb.2018.03.005.
- [33] S. Ríos-Arias and G. I. Puerta-Quintero, “Composición Química Del Mucílago De Café, Según El Tiempo De Fermentación Y Refrigeración,” *Cenicafé*, vol. 2, no. 62, pp. 23–40, 2011, [Online]. Available: <http://www.cenicafe.org/es/documents/2.pdf>.
- [34] G. I. Puerta Quintero, “Cinética química de la fermentación del mucílago de café a temperatura ambiente,” *Rev. Cenicafé*, vol. 64, no. 1, pp. 42–59, 2013, [Online]. Available: <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/525/1/arc064%2801%2942-59.pdf>.
- [35] A. E. Peñuela Martínez, J. R. Sanz Uribe, and J. P. Pabón-Usaquén, “Método para identificar el momento final de la fermentación de mucílago de café,” *Cenicafé*, vol. 63, no. 1, pp. 120–131, 2012, [Online]. Available: <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/517/1/arc063%281%29120-131.pdf>.
- [36] S. Maicas, “The role of yeasts in fermentation processes,” *Microorganisms*, vol. 8, no. 8, pp. 1–8, 2020, doi: 10.3390/microorganisms8081142.
- [37] C. Wang *et al.*, “Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 99, no. 1, pp. 409–420, 2019, doi: 10.1002/jsfa.9202.
- [38] F. Chemistry, “Polysaccharide Constituents of Coffee-Bean Mucilage,” vol. 65, no. 8, pp. 1308–1311, 2000.
- [39] N. Ariefandie and F. Zhu, “Coffee bean processing : Emerging methods and their effects on chemical , biological and sensory properties,” *Food Chem.*, vol. 412, no. September 2022, p. 135489, 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.135489.
- [40] G. V. de M. Pereira *et al.*, “Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing,” *Int. J. Food Sci. & Technol.*, vol. 51, no. 7, pp. 1689–1695, 2016, doi: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13142>.
- [41] A. A. Sukriyadi, D. R. Husain, A. I. Latunra, N. Iqraini, and R. Wardhani, “Fermentation of Arabica coffee seeds (*Coffea arabica*) using probiotic bacteria from domestic chickens *Gallus domesticus*,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 807, no. 3, p. 32021, Jul. 2021, doi: 10.1088/1755-1315/807/3/032021.
- [42] V. Pothakos *et al.*, “Temporal shotgun metagenomics of an Ecuadorian coffee fermentation process highlights the predominance of lactic acid bacteria,” *Curr. Res. Biotechnol.*, vol. 2,

---

pp. 1–15, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.02.001>.

- [43] S. J. Martinez, A. P. P. Bressani, D. R. Dias, J. B. P. Simão, and R. F. Schwan, “Effect of bacterial and yeast starters on the formation of volatile and organic acid compounds in coffee beans and selection of flavors markers precursors during wet fermentation,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. JUN, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01287.

---

## ANEXOS

### *Anexo A. Medios de cultivo*

- **Medio WL**

El medio de cultivo nutritivo *WL* (Wallerstein Laboratory) es un medio de cultivo desarrollado para realizar el conteo de microorganismos (levaduras, hongos y bacterias) presentes en los procesos de fermentación industrial y de alimentos.

#### Formulación aproximada por litro

Extracto de levadura	4.0	<i>g</i>
Digerido pancreático de caseína (Tryptona)	5.0	<i>g</i>
Dextrosa	50.0	<i>g</i>
Fosfato de monopotasio	0.55	<i>g</i>
Cloruro de potasio	425.0	<i>mg</i>
Cloruro de calcio	125.0	<i>mg</i>
Sulfato de magnesio	125.0	<i>mg</i>
Cloruro de hierro (III)	2.5	<i>mg</i>
Sulfato de manganeso	2.5	<i>mg</i>
Agar	20	<i>g</i>
Verde de bromocresol	22	<i>mg</i>

- **Medio WLD**

El medio diferencial *WL* inhibe el crecimiento de levaduras y hongos para realizar el conteo de bacterias. Este medio de cultivo presenta la misma composición por litro que el medio *WL* y se adiciona un fungicida como la cicloheximida.

- **Medio YM**

El medio de cultivo *YM* (Yeast Mold) es un medio utilizado para el cultivo de levaduras, hongos y otros microorganismos acidúricos.

#### Formulación aproximada por litro

Extracto de levadura	3.0	<i>g</i>
Extracto de malta	3.0	<i>g</i>
Peptona	5.0	<i>g</i>
Dextrosa	10.0	<i>g</i>
Agar	20.0	<i>g</i>

- **Medio EMB**

El medio de cultivo *EMB* (Eosin Methylene Blue) es un medio utilizado para el aislamiento de enterobacterias y para la detección de coliformes, contaminantes de alimentos y agua potable.

Formulación aproximada por litro

Fosfato dipotásico	2	<i>g</i>
Lactosa	5	<i>g</i>
Sacarosa	5	<i>g</i>
Peptona bacteriológica	10.0	<i>g</i>
Eosina Y	0.4	<i>g</i>
Azul de metileno	0.065	<i>g</i>
Agar	13.5	<i>g</i>

- **Medio MRS**

El medio de cultivo *MRS* (Man, Rogosa y Sharpe) es un medio utilizado para el aislamiento y recuento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas a partir de muestras clínicas y alimentos.

Formulación aproximada por litro

Peptona proteosa No. 3	10.0	<i>g</i>
Extracto de carne	10.0	<i>g</i>
Extracto de levadura	5.0	<i>g</i>
Dextrosa	20.0	<i>g</i>
Polisorbato 80	1.0	<i>g</i>
Citrato de amonio	2.0	<i>g</i>
Acetato de sodio	5.0	<i>g</i>
Sulfato de magnesio	0.1	<i>g</i>
Sulfato de manganeso	0.05	<i>g</i>
Fosfato de dipotasio	2.0	<i>g</i>
Agar	15.0	<i>g</i>

- **Agua peptonada**

El agua peptonada se usa como diluyente o para el enriquecimiento de microorganismos no exigentes.

Formulación aproximada por litro

Peptona	10.0	<i>g</i>
Cloruro de sodio	5.0	<i>g</i>

- **Medio para la determinación de levaduras pectinolíticas**

## Formulación aproximada por litro

Sulfato de manganeso	0.05	<i>g</i>
Fosfato de monopotasio	0.2	<i>g</i>
Sulfato de amonio	1.0	<i>g</i>
Cloruro de calcio	0.05	<i>g</i>
Sulfato de magnesio	0.8	<i>g</i>
Extracto de levadura	1.0	<i>g</i>
Pectina cítrica	2.0	<i>g</i>
Agar	15.0	<i>g</i>

- ***Medio para simular las condiciones de fermentación***

El medio que simula las condiciones de fermentación contiene pectina, glucosa y fructosa como fuente de energía, el extracto de pulpa es añadido para asegurar la disponibilidad de nitrógeno, elementos traza y factores de crecimiento que normalmente están en la fermentación de los granos de café. El pH se ajusta a  $\approx 5.5$

## Formulación aproximada por litro

Extracto de pulpa	50	% v/v
Pectina cítrica	2.0	<i>g</i>
Fructosa	15	<i>g</i>
Glucosa	15	<i>g</i>
Extracto de levadura	5	<i>g</i>
Peptona de soya	5	<i>g</i>

El extracto de pulpa se obtiene al homogenizar 200 *g* de pulpa de café y 1 *L* de agua destilada en una licuadora por 5 *min*. Se esteriliza por separado el medio sintético y el extracto de pulpa.

- ***Medio para medir el índice de degradación de pectinas***

## Formulación aproximada por litro

Extracto de levadura	10	<i>g</i>
Peptona	20	<i>g</i>
Dextrose	20	<i>g</i>
Pectina cítrica	5.0	<i>g</i>
Agar	15.0	<i>g</i>

- ***Medio para evaluar la presencia de microorganismos fermentadores de pentosas***

---

---

Formulación aproximada por litro

Xilosa	10.0	<i>g</i>
Urea	2.0	<i>g</i>
Fosfato de monopotasio	2.0	<i>g</i>
Fosfato de dipotasio	3.0	<i>g</i>
Extracto de levadura	15.0	<i>g</i>
Agar	2.0	<i>g</i>

Solución de minerales

Formulación aproximada por litro

Cloruro de magnesio 6-hidrato	20.0	<i>g</i>
Cloruro de calcio 2-hidrato	5.0	<i>g</i>
Sulfato de hierro 7-hidrato	0.25	<i>g</i>

La solución de minerales se esteriliza con filtro ( $0.2 \mu m$ ) estéril y se adiciona al medio en una relación 1: 100, después de la esterilización de los demás componentes en autoclave. El pH se ajusta a 7.2

---

**Anexo B. Métodos de medición de propiedades físicoquímicas****• Humedad (Desecación en estufa A.O.A.C. 925.45)**

Para determinar la humedad de las muestras se secan las cápsulas de porcelana que van a contener las muestras 3 h a 105 °C, luego se dejan enfriar en desecador. Cuando las cápsulas se encuentran a temperatura ambiente se pesan en balanza analítica y se determina la masa de la muestra. Luego se dejan las cápsulas en horno a 105 °C durante 24 h, se dejan enfriar y se determina la masa de las cápsulas con la muestra. El porcentaje de humedad se determina mediante la siguiente expresión:

$$\%h = \frac{M_m - (M_{105} - M_C)}{M_m} * 100$$

Donde

- $M_C$  → masa de la cápsula.
- $M_{105}$  → masa de la cápsula con la muestra luego del secado en horno.
- $M_m$  → masa de la muestra.

**• Sólidos totales**

Para la determinación de los sólidos totales se sigue el mismo procedimiento que se ocupa para determinar el porcentaje de humedad y se hace uso de la siguiente expresión:

$$\%S_T = \frac{M_{105} - M_C}{M_m} * 100$$

Donde

- $M_C$  → masa de la cápsula.
- $M_{105}$  → masa de la cápsula con la muestra luego del secado en horno.
- $M_m$  → masa de la muestra.

**• Cenizas (A.O.A.C. 7.009/84, 942.05/90, 900.02, 44.1.05.D)**

Para la determinación de las cenizas se hace uso de las cápsulas luego del desecado en horno a 105 °C y se llevan a mufla a 550 °C durante 3 h, luego se deja enfriar en desecador y se determina la masa del conjunto cápsula-muestra en balanza analítica. El porcentaje de cenizas se determina mediante la siguiente expresión:

$$\%S_T = \frac{M_F - M_C}{M_m} * 100$$

Donde

- $M_C$  → masa de la cápsula.
  - $M_F$  → masa de la cápsula con la muestra luego del calcinado en mufla.
  - $M_m$  → masa de la muestra.
- **Azúcares reductores totales (DNS) [Protocolo implementado en el laboratorio de investigación Bioprocesos]**

Procedimiento

- Preparación de la solución de DNS
  - ◆ Preparar una solución de *NaOH* al 2 N en matraz Erlenmeyer de 500 mL con agitación; para esto es necesario pesar 8 g de *NaOH* y diluirlo en 100 mL de agua destilada.
  - ◆ A esta solución adicionar 150 g de tartrato de sodio y potasio y completar el volumen hasta 500 mL usando agua destilada; dejar en agitación hasta que la solución quede completamente solubilizada, esta solución debe ser transferida a un recipiente ámbar de 1 L.
  - ◆ Finalmente, adicionar 5 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Una vez añadido el DNS completar el volumen con agua destilada hasta 1 L.
- Curva Estándar
  - ◆ Pesar 0.1 g de glucosa y llevarlos a un volumen final de 50 mL para tener una solución de 2 g/L
  - ◆ Tomar una alícuota de 5 mL y llevarlo a 25 mL para tener una solución de 0.4 g/L
  - ◆ Con esta última solución preparar las siguientes diluciones en tubos de ensayo:

Solución	Glucosa [g/L]	V solución madre [mL]	V agua destilada [mL]
----------	---------------	-----------------------	-----------------------

<i>Blanco</i>	0	0	0.500
1	0.04	0.050	0.450
2	0.08	0.100	0.400
3	0.12	0.150	0.350
4	0.16	0.200	0.300
5	0.20	0.250	0.250
6	0.24	0.300	0.200
7	0.28	0.350	0.150
8	0.32	0.400	0.100
9	0.36	0.450	0.050
10	0.4	0.500	0

- ◆ Si se requieren concentraciones mayores en la curva de calibración, puede ampliarse hasta 0.8 g/L de glucosa.
- Tratamiento de las muestras
  - ◆ Tomar las diluciones preparadas incluyendo el blanco y las muestras problema (por triplicado, excepto el blanco que debe ser por duplicado) y adicionar a cada una 500  $\mu$ L de solución de DNS incluyendo el blanco, tapar cada tubo con papel chicle (papel vinilpel) para evitar pérdidas de la muestra por evaporación. En caso de no poder trabajar inmediatamente con la solución, guardar todos los tubos en un lugar oscuro para evitar que el DNS comience a reaccionar.
  - ◆ Llevar los tubos con las soluciones al baño termostático a temperatura de ebullición durante 5 min. Pasados 5 min exactos de calentamiento llevar la solución a un baño de hielo durante 5 min o hasta el momento en que se dispone a hacer la curva de calibración para DNS o las lecturas de las muestras problema.

Leer la absorbancia de todas las soluciones a 540 nm y realizar una curva de concentración de glucosa en g/L versus absorbancia. Realizar un ajuste lineal de los datos donde el  $R^2$  debe estar por encima de 0.995

Notas:

- En caso que la absorbancia para la muestra problema esté por encima de la obtenida en la curva de calibración, debe hacerse la dilución necesaria para que la absorbancia esté dentro de la curva

$$\frac{g}{L} \text{ de las muestras problema} = \frac{g}{L} \text{ obtenidos} \cdot FD$$

Donde

$$FD = \frac{V_{Muestra} + V_{Diluyente}}{V_{Muestra}}$$

- Cada vez que se desee o emplee una solución nueva de DNS se debe realizar este procedimiento para la elaboración de la curva de calibración.

- **Glucosa, xilosa, arabinosa**

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo de HPLC (Agilent Technologies 1200 Series), utilizando la columna Coregel 87H3, 7.8 x 300 mm con un volumen de carga igual a 20  $\mu$ L, utilizando  $H_2SO_4$  como fase móvil (0.01 N), con un flujo de 0.6 mL/min, temperatura de la columna de 80 °C, y temperatura del detector de índice de refracción en 55 °C.

- **Azúcares totales (Lane-Eynon con hidrólisis ácida)**

1. Preparación de los reactivos

- (a) Solución de Fehling A

- Disolver 34.639 g de sulfato de cobre ( $Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$ ) en 200 mL de agua destilada
- Diluir a 500 mL y filtrar con lana de vidrio o filtro de papel.
- Almacenar en un lugar oscuro y fresco.

- (b) Solución de Fehling B

- Disolver 173 g de tartrato de sodio y potasio ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ) y 50 g de hidróxido de sodio ( $NaOH$ ) en 200 mL de agua destilada y diluir a 500 mL
- Dejar en digestión por 2 días y filtrar a través de fibra de vidrio.
- Almacenar en un lugar oscuro y fresco

2. Preparación del estándar de azúcar

## (a) Solución stock (10 mg/mL)

- Pesar 5 g de sacarosa
- Transferir la sacarosa a un balón volumétrico de 500 mL
- Agregar 2.5 mL de ácido clorhídrico concentrado ( $HCl \approx 37\%$ )
- Agregar 100 mL de agua destilada
- Agitar para obtener la disolución completa de la sacarosa
- Dejar el balón en digestión a condiciones ambiente por 3 días
- Adicionar agua destilada hasta alcanzar el volumen final de 500 mL
- Mezclar el contenido del balón

## (b) Solución de trabajo (2.5 mg/mL)

- Medir 62.5 mL de la solución stock de sacarosa y transferir a un balón volumétrico de 250 mL
- Agregar unas cuantas gotas de solución de fenolftaleína y neutralizar con una solución de hidróxido de sodio al 20 %
- Usar una solución de ácido clorhídrico 1 N en caso que la neutralización se exceda con el hidróxido de sodio
- Agregar suficiente agua destilada para aforar a 250 mL
- Mezclar el contenido del balón

## 3. Preparación de la mezcla

- Tarar un matraz Erlenmeyer limpio y seco
- Homogenizar la muestra y pesarla (anotar el peso de la muestra)
- Agregar 150 mL de agua precalentada en baño María a 60 °C
- Agitar para homogenizar el contenido
- Someter la solución a calentamiento en baño María a 60 °C durante 30 min con agitación regular
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y transferir el contenido a un balón volumétrico de 250 mL y aforar con agua destilada, lavando el matraz para asegurarse la transferencia de la totalidad de la muestra
- Filtrar la solución de la muestra (filtro Whatman no 1)
- Desechar los primeros 25 mL de filtrado

- Completar la filtración y recolectar el filtrado
- Pipetear 50 mL del filtrado a un balón volumétrico de 100 mL
- Agregar 2.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y dejar en digestión por 24 h
- Agregar unas cuantas gotas de solución de fenolftaleína y neutralizar con hidróxido de sodio al 20%
- Usar una solución de ácido clorhídrico 1 N en caso que la neutralización se exceda con el hidróxido de sodio
- Aforar con agua destilada

#### 4. Titulación del blanco

- Agregar 5 mL de la solución de Fehling A a un matraz Erlenmeyer
- Agregar 5 mL de la solución de Fehling B
- Adicionar 30 mL de agua destilada
- Llevar el matraz a una plancha de calentamiento
- Llenar una bureta con la solución de trabajo prepara en los pasos anteriores (anotar volumen inicial)
- Agregar 17 mL de la solución de trabajo que está en la bureta al matraz
- Regular el calentamiento de tal forma que la ebullición inicie aproximadamente a los 3 min
- Someter la muestra a 2 minutos de ebullición
- Agregar 4 gotas de azul de metileno 1 %
- Iniciar agitación magnética
- Iniciar la titulación con la solución de trabajo desde la bureta agregando 5 – 7 gotas en intervalos de 3 – 5 s
- La titulación debe terminarse en aproximadamente 3 min
- La titulación termina en el punto en el cual la solución se torna naranja brillante (anotar el volumen final)

#### 5. Titulación de la muestra

- Agregar 5 mL de la solución de Fehling A a un matraz Erlenmeyer
- Agregar 5 mL de la solución de Fehling B
- Agregar el volumen de muestra de acuerdo al siguiente razonamiento

Volumen de muestra [mL]	Concentración de azúcares esperada [%]
4	> 80
7 – 5	50 – 80
10	30 – 49
17	11 – 29
25	< 10

- Agregar agua destilada para diluir el contenido a 50 mL
- Llevar el matraz a una plancha de calentamiento
- Llenar una bureta con la solución de trabajo prepara en los pasos anteriores (anotar volumen inicial)
- Regular el calentamiento de tal forma que la ebullición inicie aproximadamente a los 3 min
- Someter la muestra a 2 minutos de ebullición
- Agregar 4 gotas de azul de metileno 1 %
- Iniciar agitación magnética
- Iniciar la titulación con la solución de trabajo desde la bureta agregando gotas en intervalos de 3 – 5 s
- La titulación debe terminarse en aproximadamente 3 min
- La titulación termina en el punto en el cual la solución se torna naranja brillante (anotar el volumen final)

#### 6. Cálculos

$$\% \text{ Azúcares totales} = \frac{(B - S) \cdot C \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{W \cdot V \cdot 50}$$

Donde

- $B \rightarrow$  Volumen de la solución de trabajo para la titulación del blanco [mL]  

$$B = \text{Lectura final bureta} - \text{Lectura inicial bureta}$$
- $S \rightarrow$  Volumen de la solución de trabajo para la titulación de la muestra [mL]  

$$S = \text{Lectura final bureta} - \text{Lectura inicial bureta}$$
- $C \rightarrow$  Concentración de la solución de trabajo [g/mL]
- $W \rightarrow$  Peso de la muestra [g]

- $V \rightarrow$  Volumen de la muestra utilizado en la titulación [ $mL$ ]
- **Proteína (Bradford) [Protocolo implementado en el laboratorio de investigación Bioprocesos]**

Las muestras deben estar centrifugadas o filtradas si presentan turbidez. En caso de elevadas concentraciones de proteínas debe diluirse la solución de las muestras de tal manera que se encuentre dentro de uno de los intervalos de medida.

La calibración puede realizarse en principio con cualquier preparado de proteínas homogéneo y lo más puro posible. Se utiliza frecuentemente albúmina de suero bovino (BSA-Albúmina fracción V).

Para prepara las soluciones patrón se disuelven en un matraz aforado de la forma más exacta posible 100  $mg$  de albúmina de suero bovino en 10  $mL$  de agua bidestilada. Esta solución se utiliza para el intervalo de medida 1

Intervalo de medida 1 (0.1 – 1.4  $mg/mL$ )

Solución patrón [ $mg/mL$ ]	Solución primaria de proteína I [ $mL$ ]	Agua [ $mL$ ]
0.2	0.20	9.80
0.4	0.40	9.60
0.6	0.60	9.40
0.8	0.80	9.20
1.0	1.00	9.00
1.2	1.20	8.80
1.4	1.40	8.60

Intervalo de medida 2 (0.01 – 0.1  $mg/mL$ )

Solución patrón [ $mg/mL$ ]	Solución primaria de proteína II [ $mL$ ]	Agua [ $mL$ ]
0.01	0.1	0.9
0.02	0.2	0.8
0.04	0.4	0.6
0.06	0.6	0.4
0.08	0.8	0.2
0.1	1.0	0

La solución primaria de proteína II: en un matraz aforado de 10  $mL$  se adiciona 1.0  $mL$  de solución patrón 1.0  $mg/mL$  con agua bidestilada hasta completar aforo.

- **Determinación**

Usar cubetas de uso único de plástico o cubetas de vidrio a 595 *nm* (en ningún caso usar cubetas de cuarzo)

- Esquema de pipeteo

Intervalo de medida 1 (0.1 – 1.4 *mg/mL*)

Solución muestra / solución patrón [ $\mu\text{L}$ ]	Solución reactiva de Bradford [ $\mu\text{L}$ ]
10	200
Blanco	
0	200

Intervalo de medida 2 (0.01-0.1 *mg/mL*)

Solución muestra / solución patrón [ $\mu\text{L}$ ]	Solución reactiva de Bradford [ $\mu\text{L}$ ]
20	200
Blanco	
0	200

El tiempo de reacción utilizado es de 10 *min* en oscuridad.

- **Alcoholes**

- Para concentraciones de etanol entre 300 – 1500  $\mu\text{g/mL}$

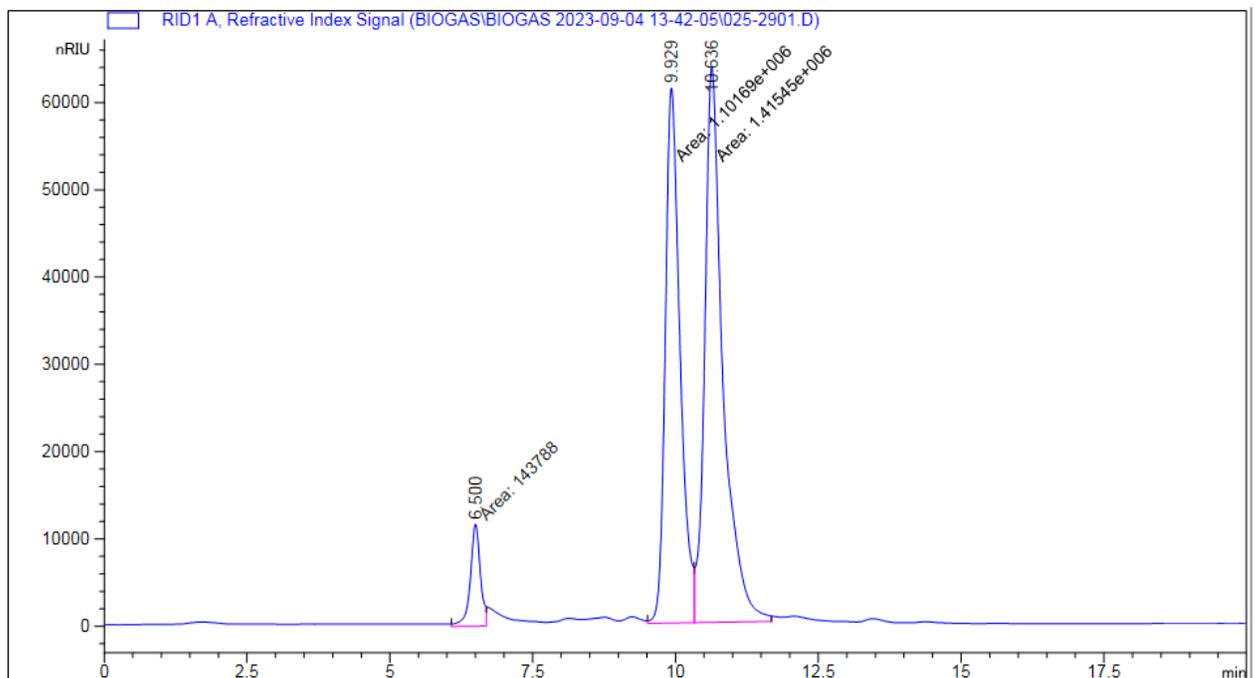
- Pesar de forma precisa 0.092 *g* de dicromato de potasio y llevarlos a un tubo con tapa rosca de 5 *mL*
- Disolver el dicromato pesado en 4 *mL* de ácido sulfúrico:agua (3: 1)
- Transferir 250  $\mu\text{L}$  de estándar o de la muestra a un vial de 2 *mL*
- Agregar 100  $\mu\text{L}$  del reactivo preparado
- Llevar el vial a baño María a 80 °C durante 8 *min*
- Medir la absorbancia a 580 *nm*

- Para concentraciones de etanol entre 1600 – 8000  $\mu\text{g/mL}$

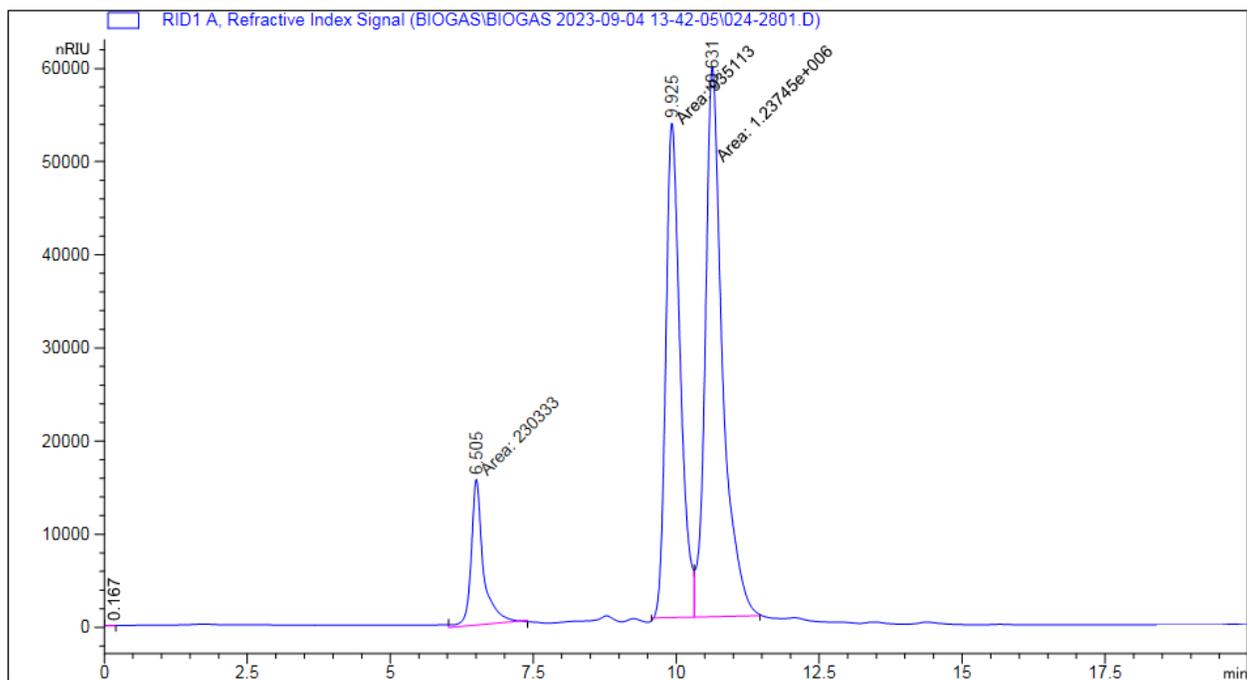
- Transferir 500  $\mu\text{L}$  de estándar o de la muestra a un vial de 2 *mL*
- Agregar 85  $\mu\text{L}$  de solución de dicromato (100 *g/L*)

- Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico
  - Dejar reposar durante 5 *min* a condiciones ambiente
  - Medir la absorbancia a 580 *nm*
- 
- **Pectina**
    - Pesar 40 *g* de muestra
    - Llevar a un recipiente de fondo redondo
    - Adicionar 1000 mL de ácido clorhídrico 0.01 *M*
    - Llevar a baño María a 60 °C durante 1 *h*
    - Filtrar para separar el filtrado del residuo
    - El filtrado se mezcla con alcohol al 96 % (1: 1) y se deja reposar por 24 *h*
    - Pesar el papel filtro a usar en el siguiente paso
    - Filtrar y lavar el filtrado con alcohol al 96 %
    - Secar en horno a 60 – 62 °C durante  $\pm$  3 *h*
    - Determinar el peso de la pectina seca

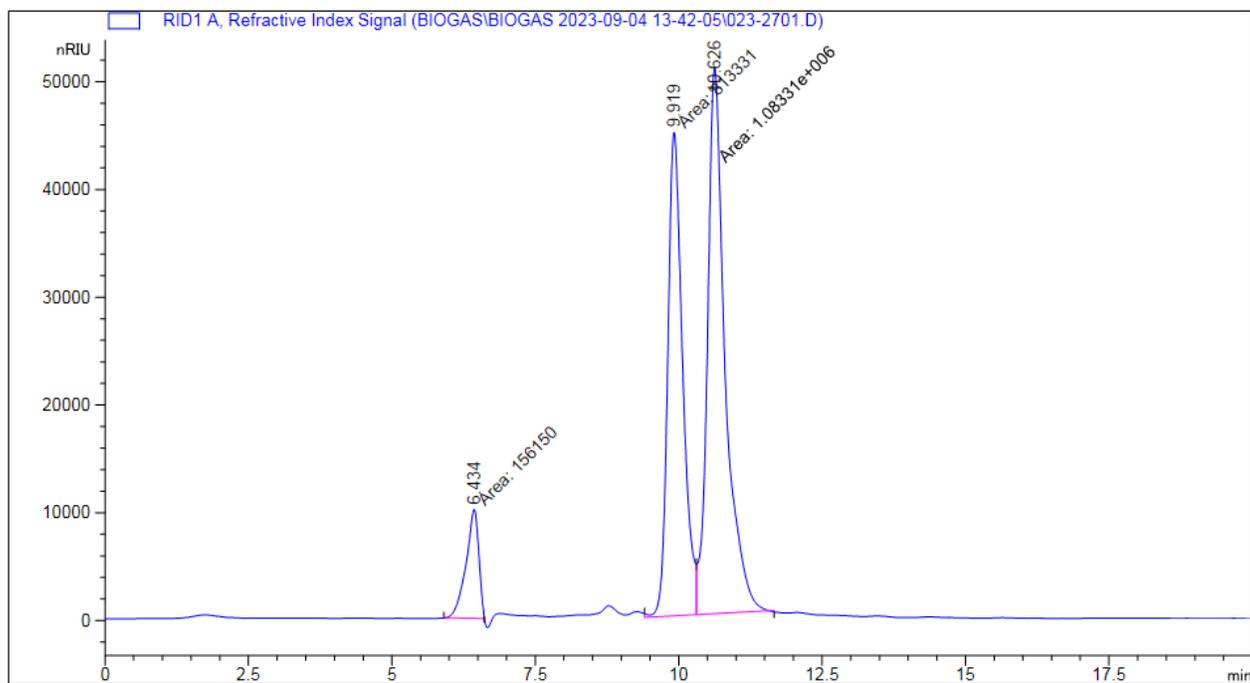
### Anexo C. Cromatogramas



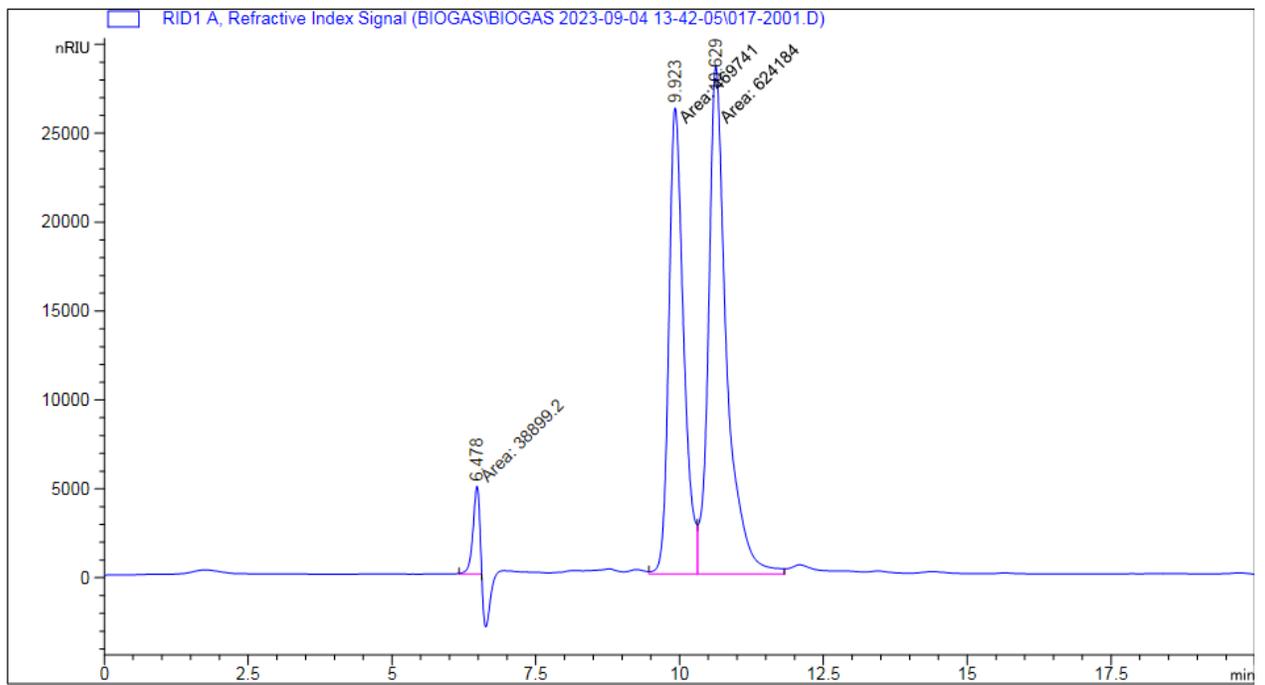
**Ilustración 1.** Cromatograma muestra mucílago.



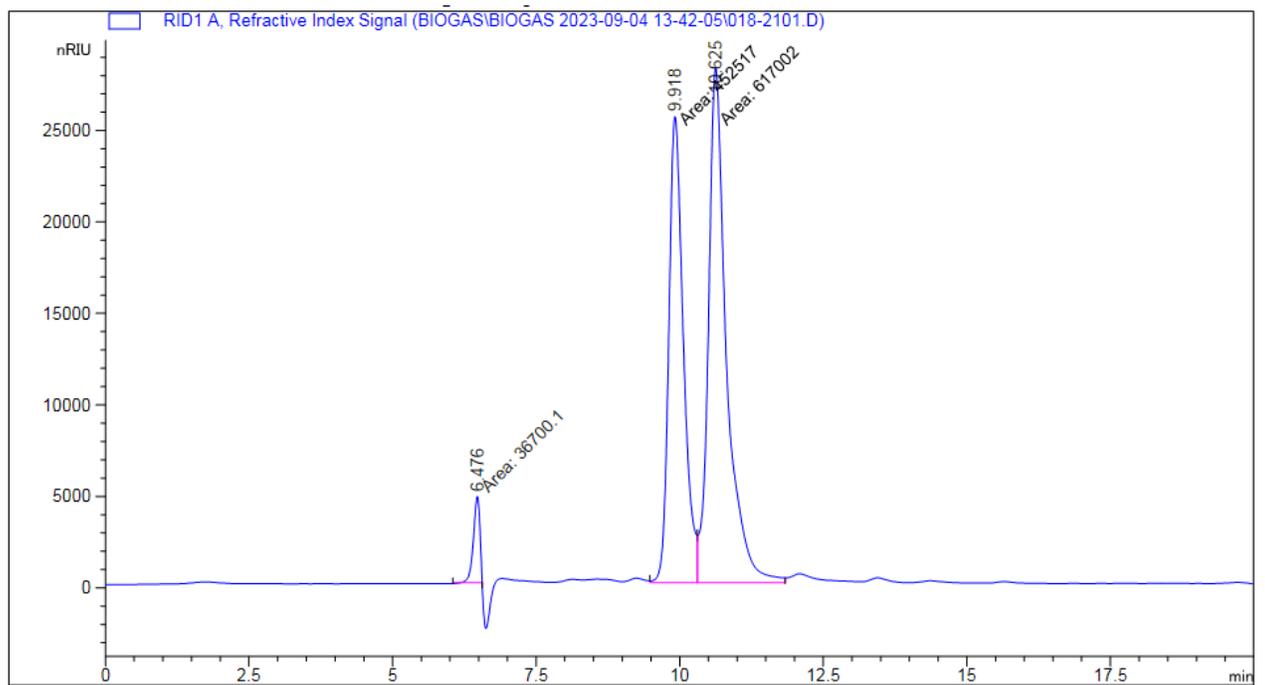
**Ilustración 2.** Cromatograma mucílago café variedad Colombia.



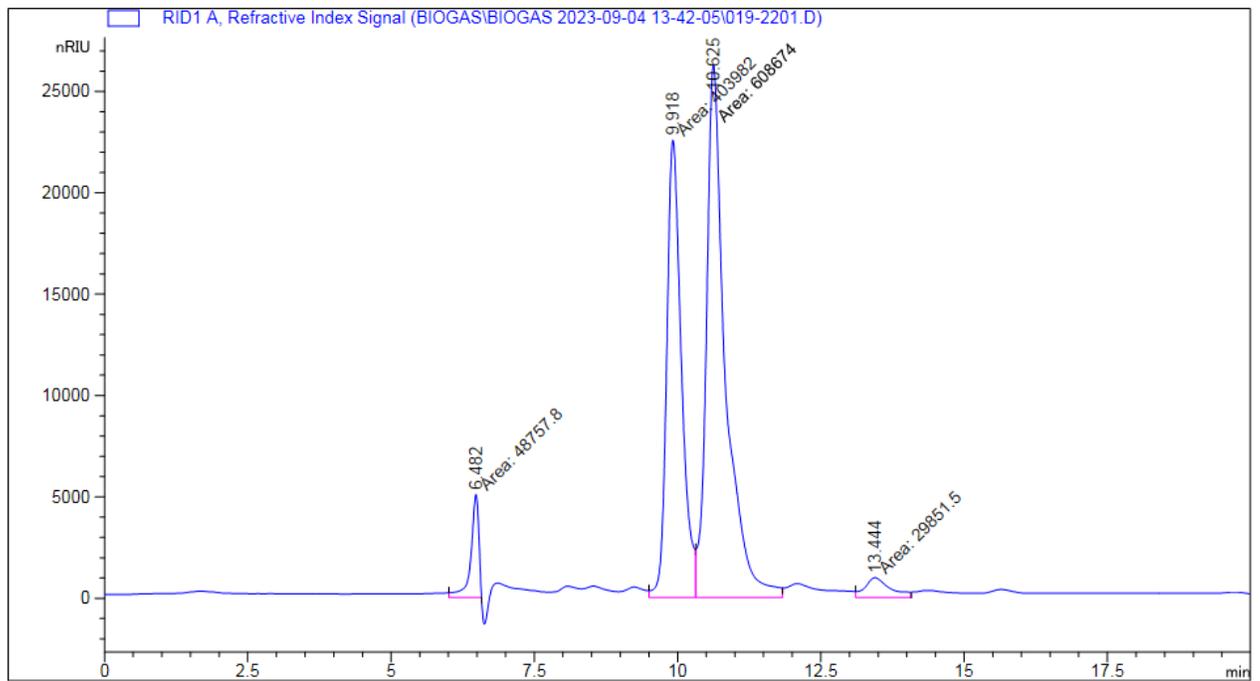
**Ilustración 3.** Cromatograma mucílago café variedad Tabi.



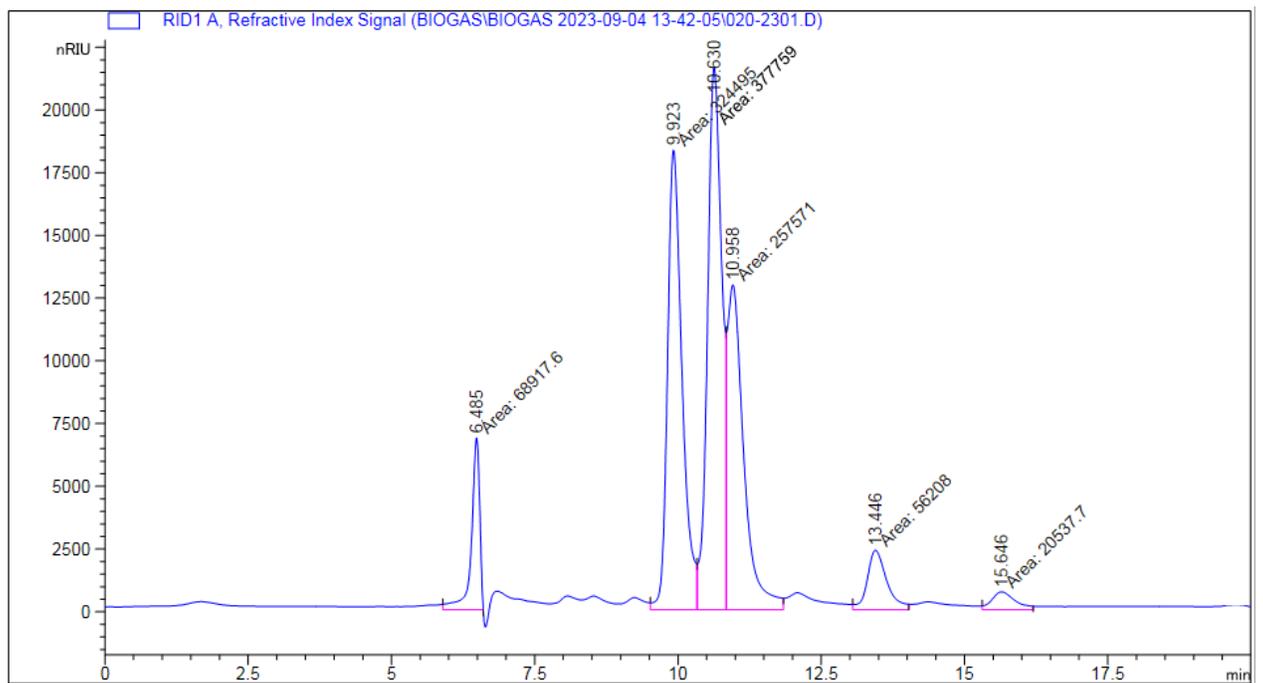
**Ilustración 4.** Cromatograma variedad Tabi tiempo 0 h.



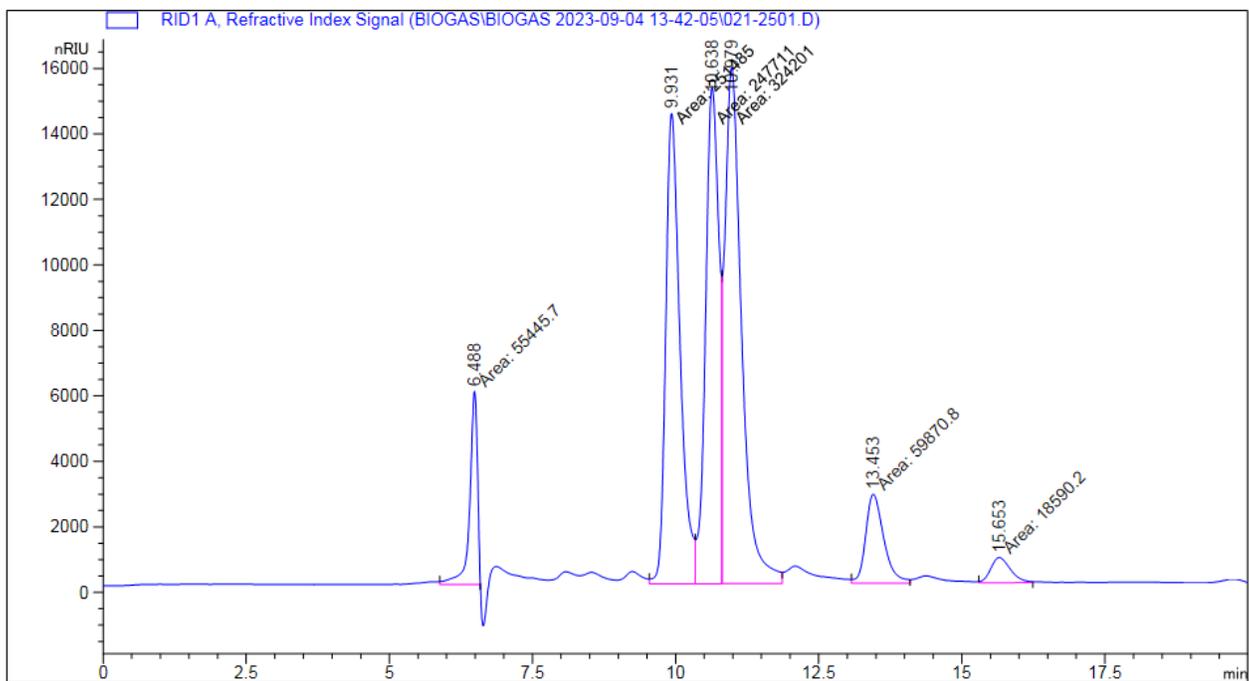
**Ilustración 5.** Cromatograma variedad Tabi tiempo 6 h.



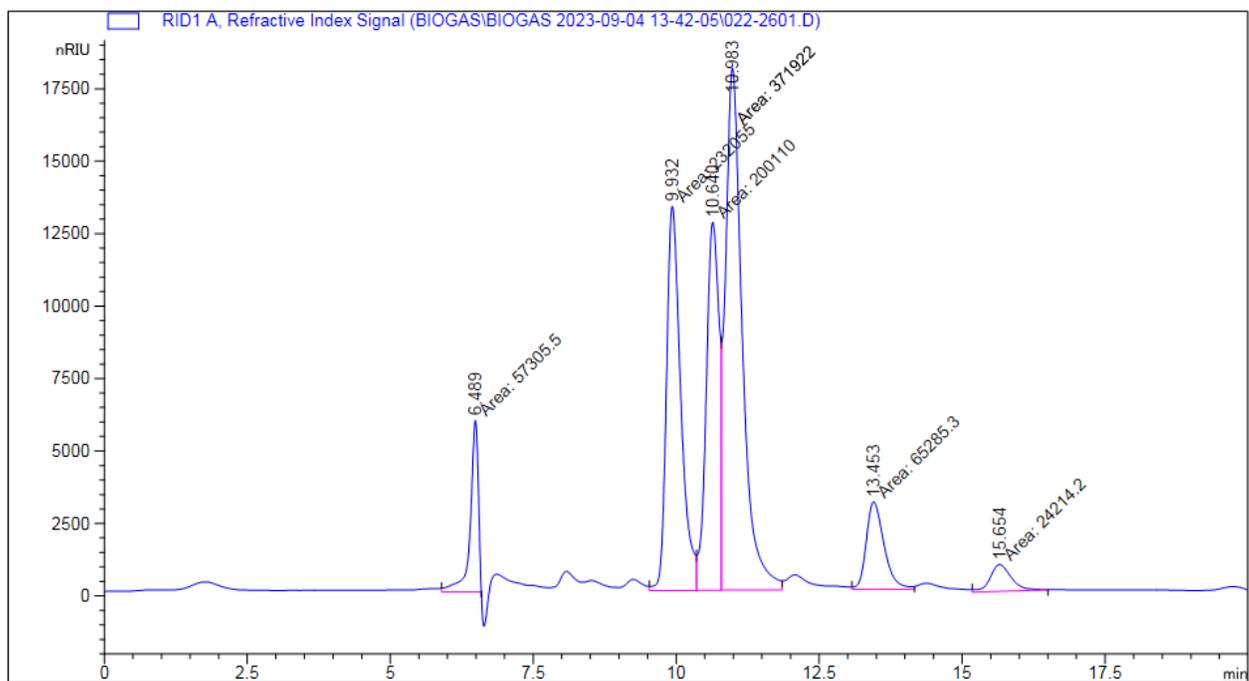
**Ilustración 6.** Cromatograma variedad Tabi tiempo 12 h.



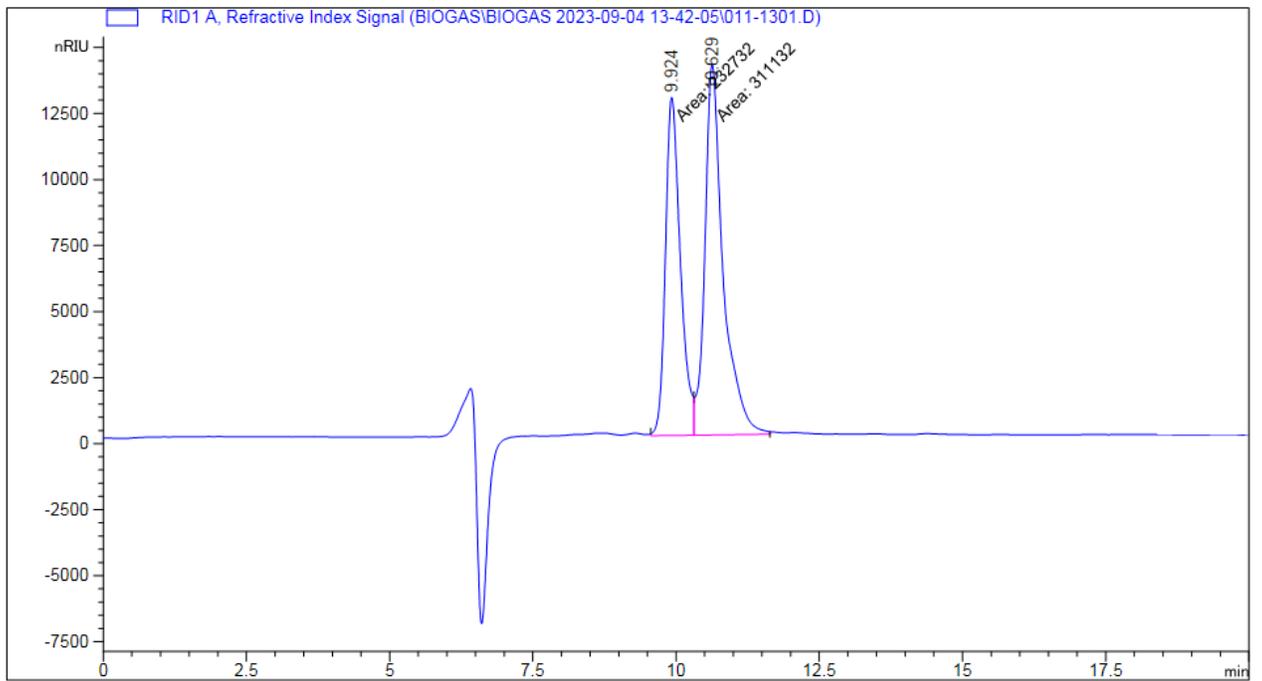
**Ilustración 7.** Cromatograma variedad Tabi tiempo 18 h.



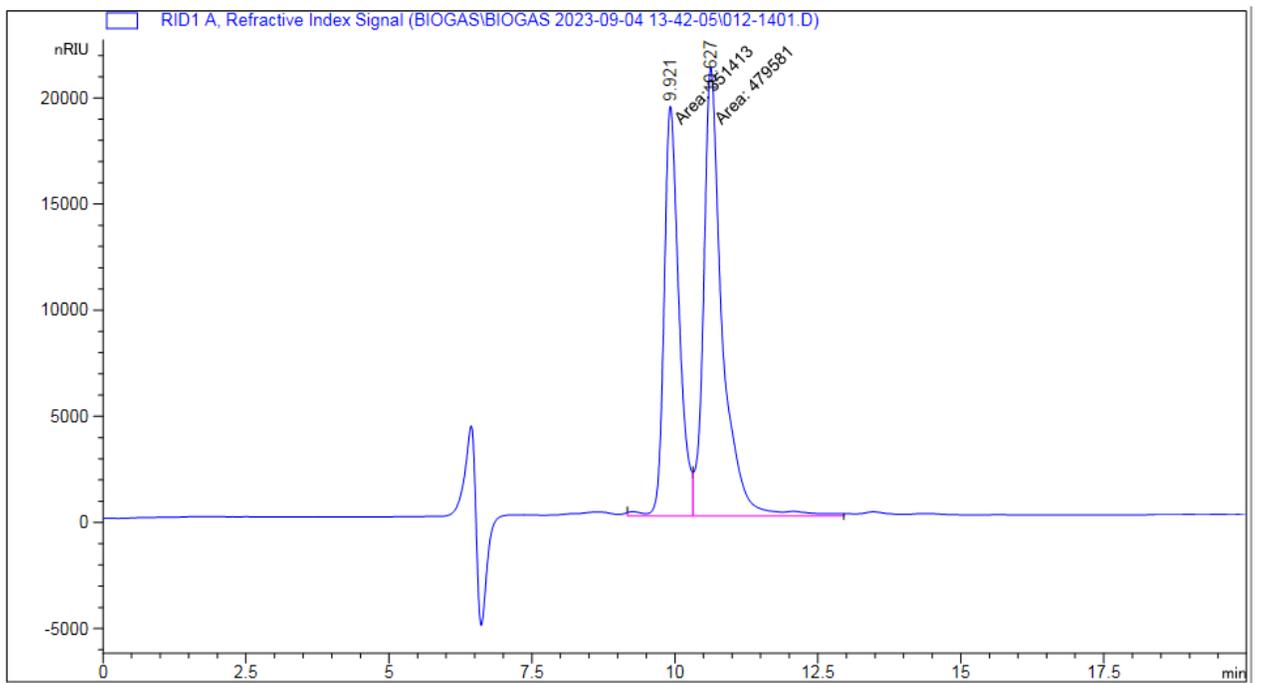
**Ilustración 8.** Cromatograma variedad Tabi tiempo 24 h.



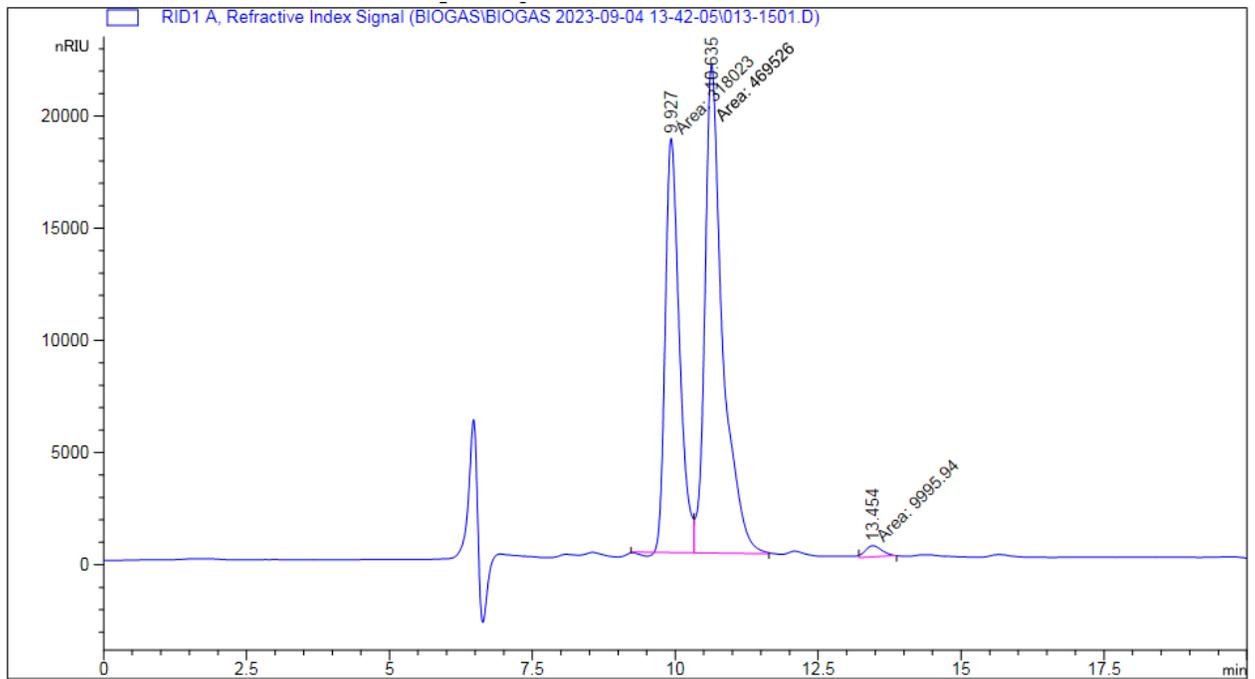
**Ilustración 9.** Cromatograma variedad Tabi tiempo 36 h.



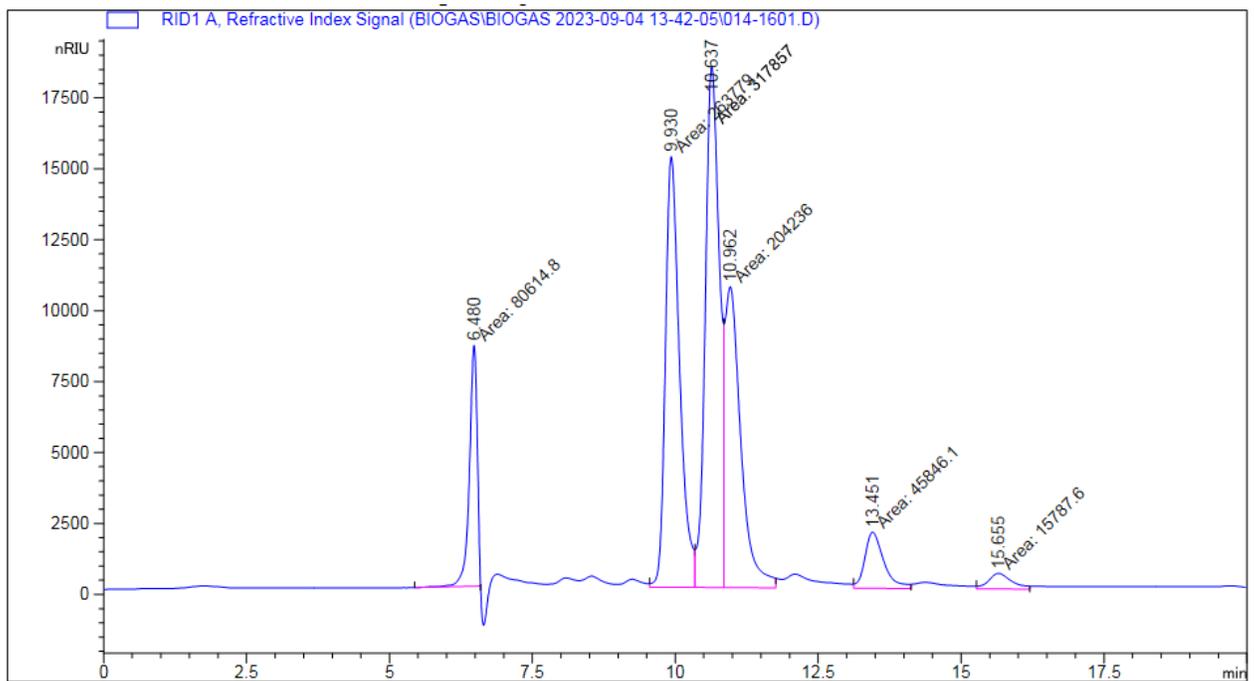
**Ilustración 10.** Cromatograma variedad Colombia tiempo 0 h.



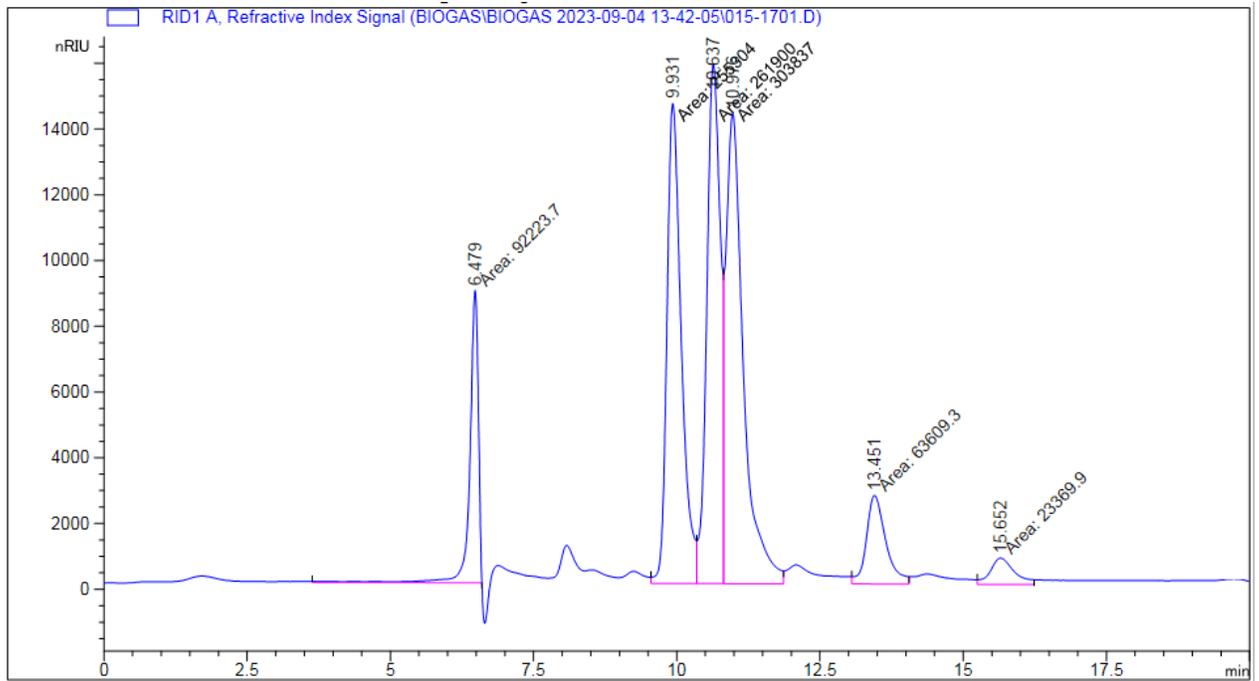
**Ilustración 11.** Cromatograma variedad Colombia tiempo 6 h.



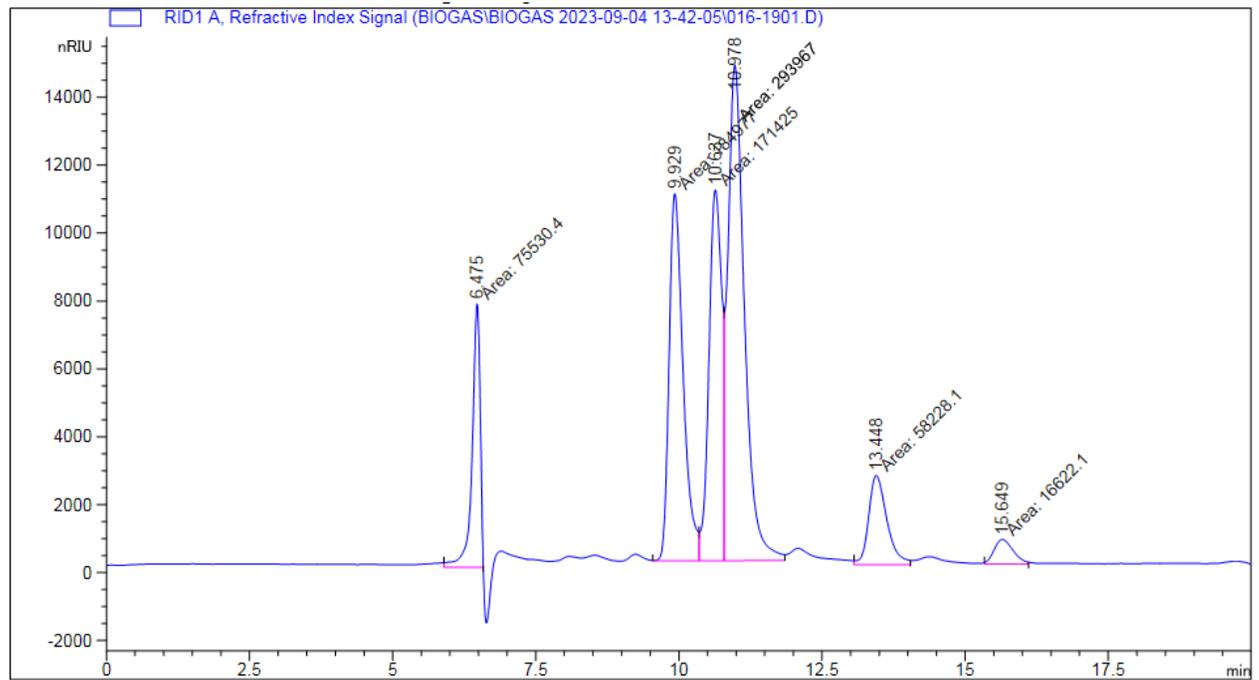
**Ilustración 12.** Cromatograma variedad Colombia tiempo 12 h.



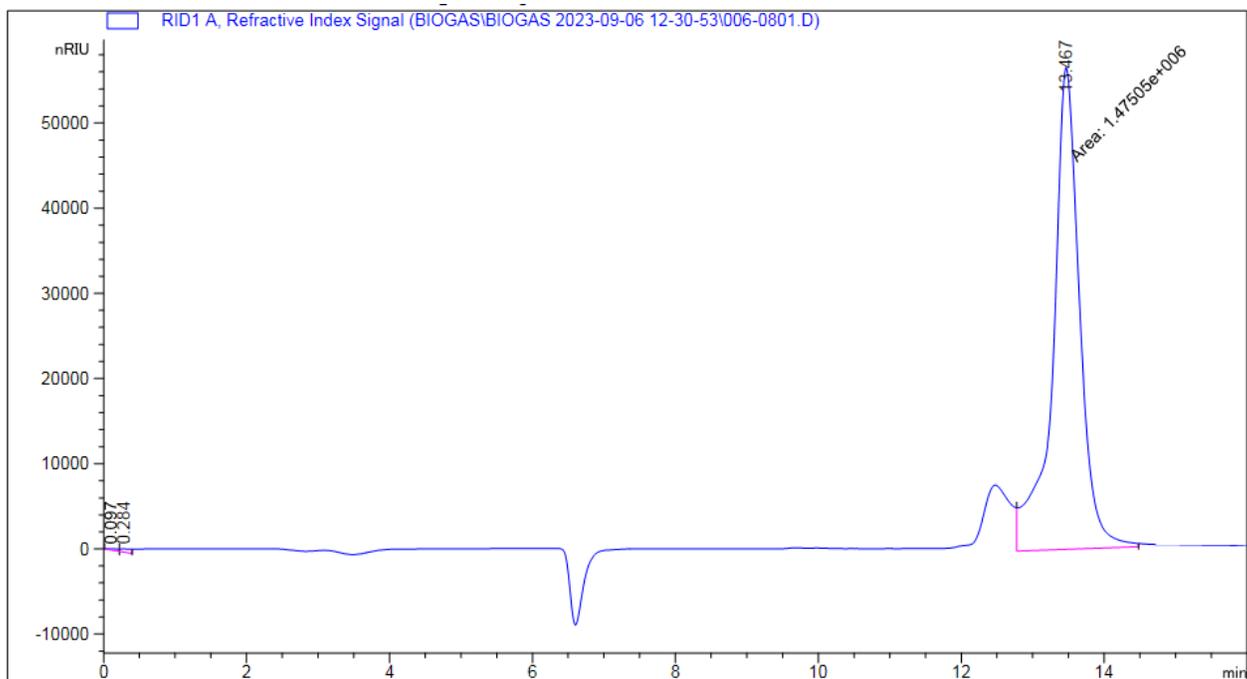
**Ilustración 13.** Cromatograma variedad Colombia tiempo 18 h.



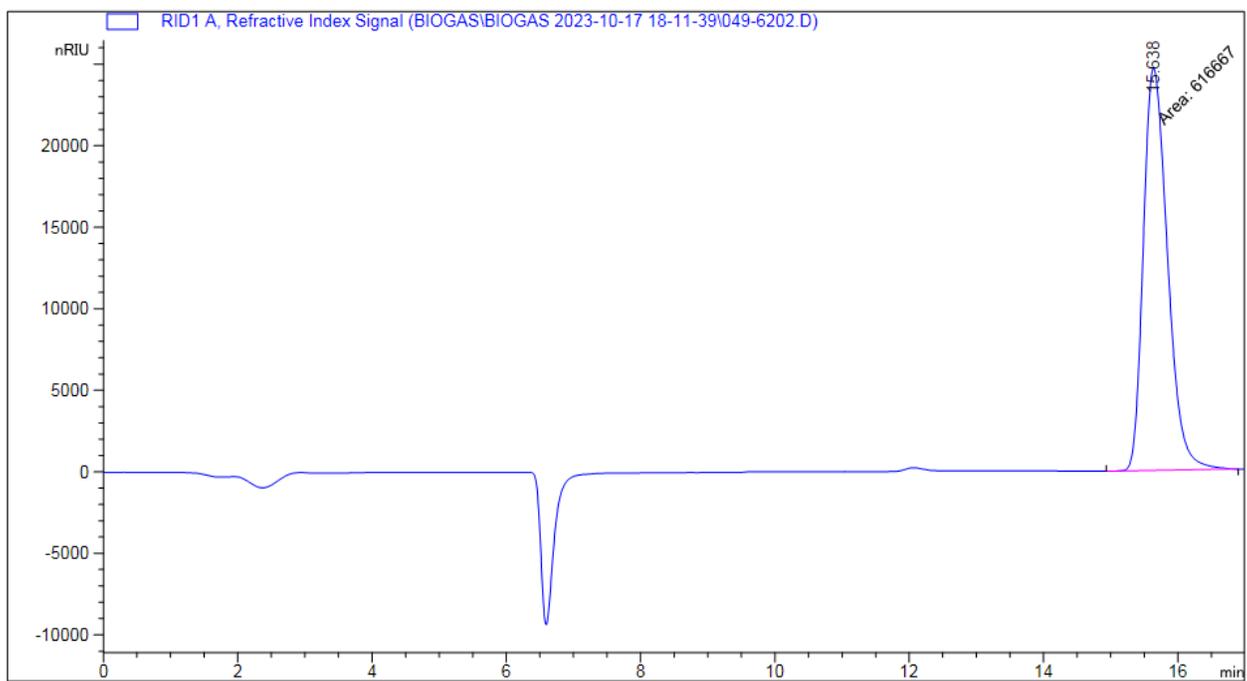
**Ilustración 14.** Cromatograma variedad Colombia tiempo 24 h.



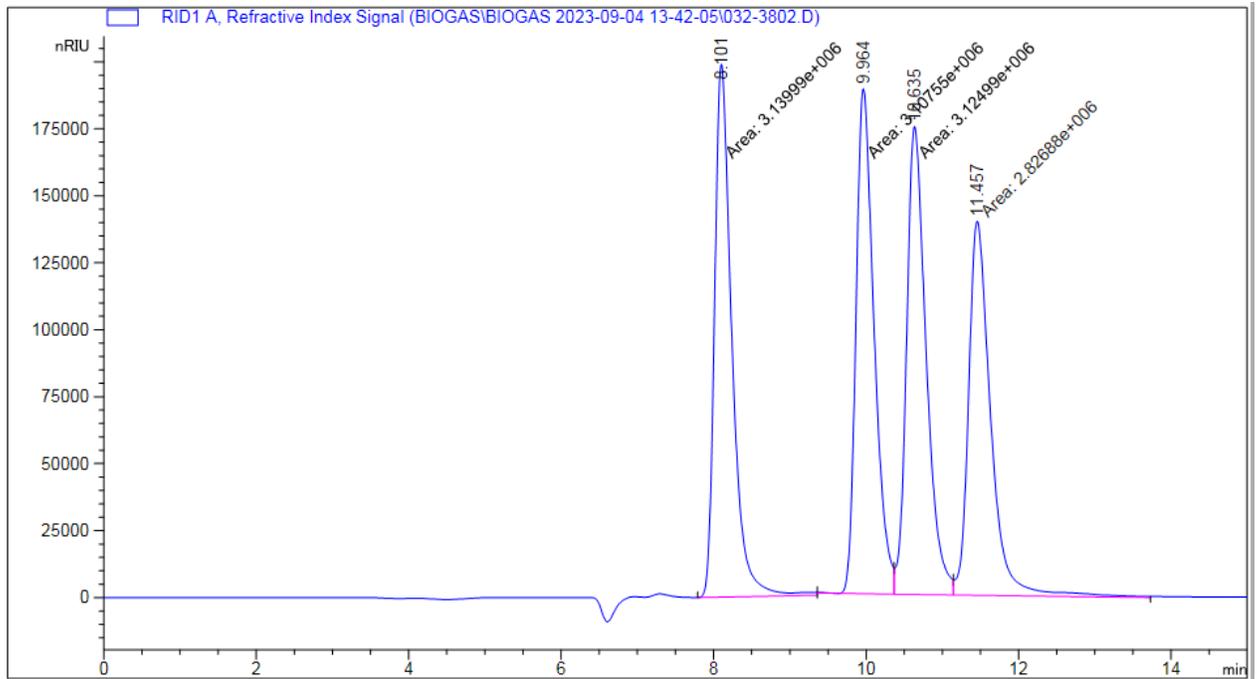
**Ilustración 15.** Cromatograma variedad Colombia tiempo 36 h.



**Ilustración 16.** Cromatograma estándar ácido láctico.

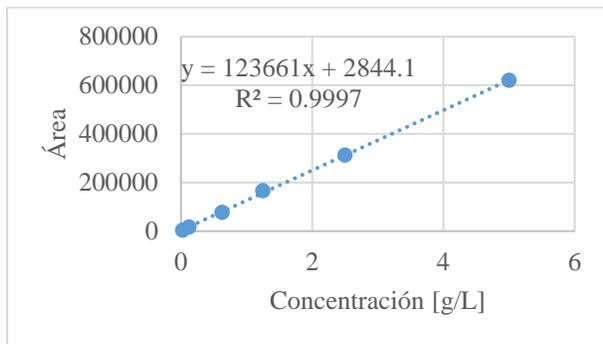


**Ilustración 17.** Cromatograma estándar ácido acético.

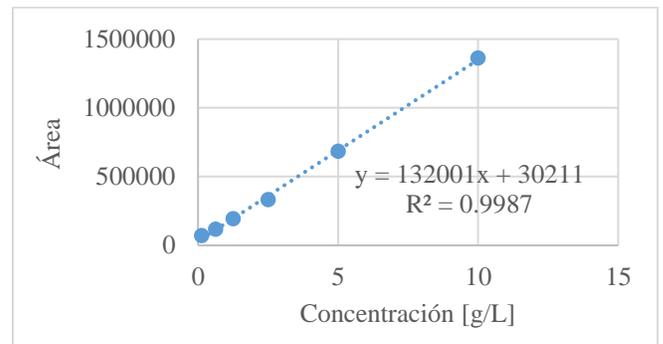


**Ilustración 18.** Cromatograma estándares celobiosa, glucosa, xilosa, arabinosa.

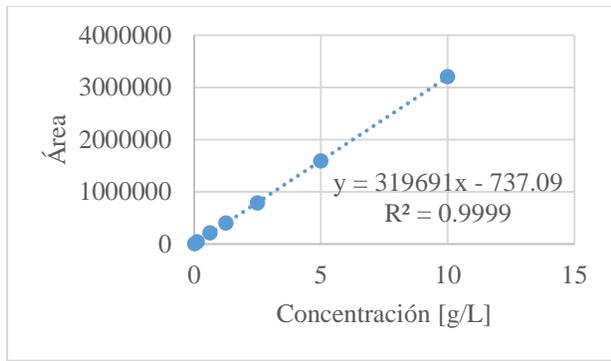
**Anexo D. Curvas de calibración**



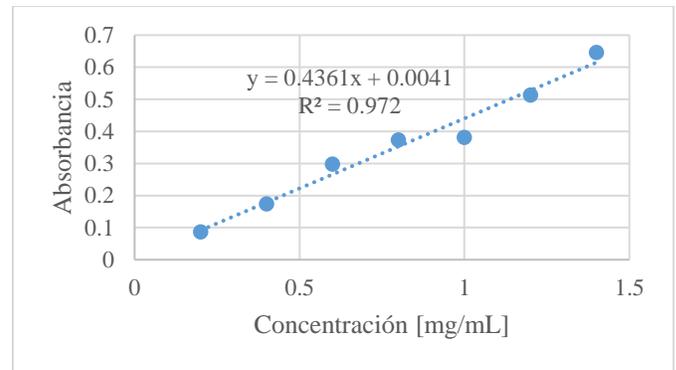
**Ilustración 19.** Curva de calibración Ácido acético.



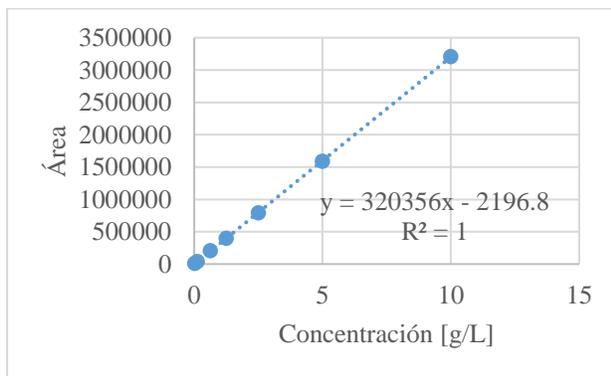
**Ilustración 20.** Curva de calibración ácido láctico.



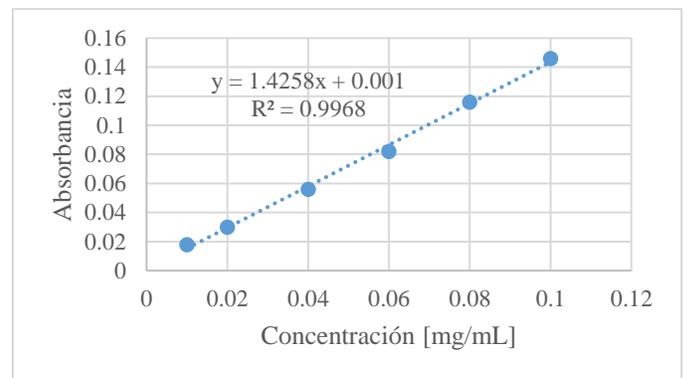
**Ilustración 21.** Curva de calibración glucosa.



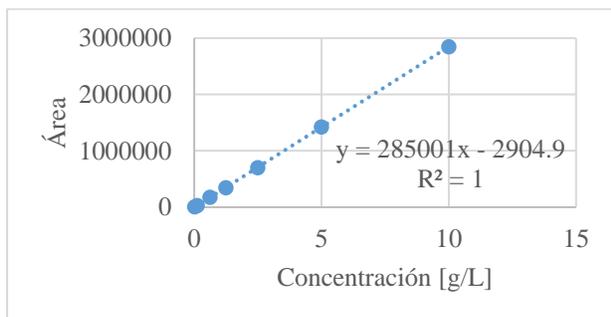
**Ilustración 24.** Curva de calibración Bradford (intervalo I).



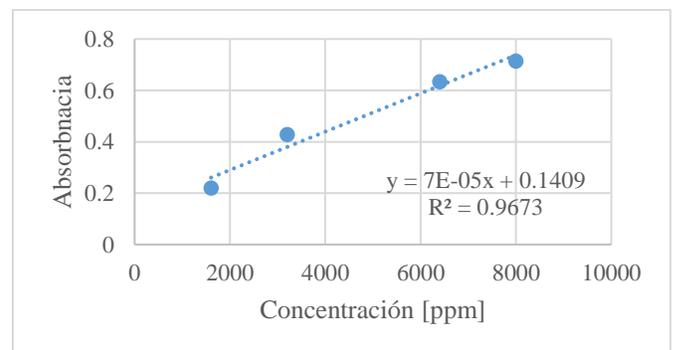
**Ilustración 22.** Curva de calibración xilosa.



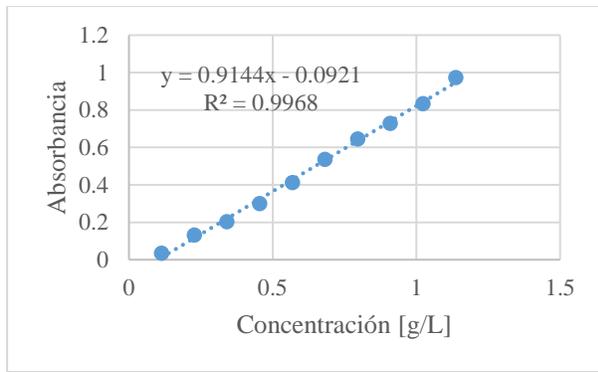
**Ilustración 25.** Curva de calibración Bradford (intervalo II).



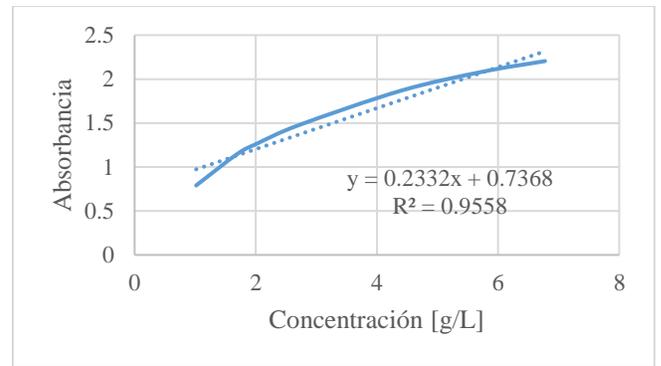
**Ilustración 23.** Curva de calibración arabinosa.



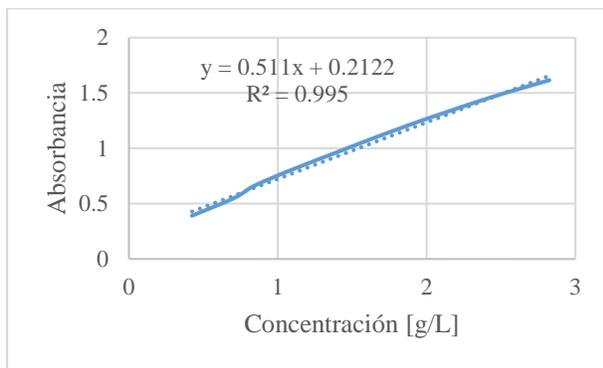
**Ilustración 26.** Curva de calibración alcoholes.



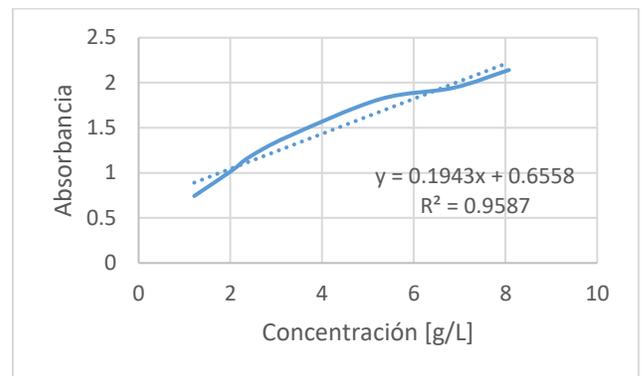
**Ilustración 27.** Curva de calibración ART.



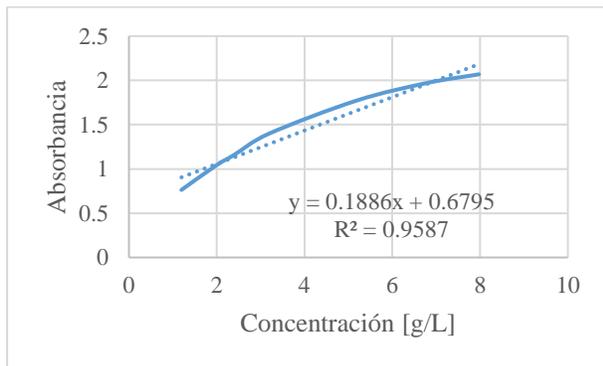
**Ilustración 30.** Curva de calibración peso seco LB.



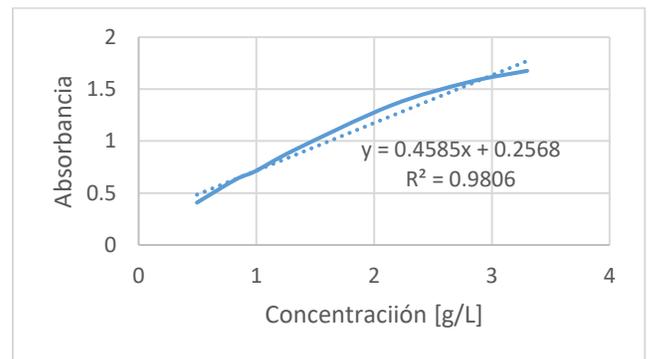
**Ilustración 28.** Curva de calibración peso seco CG.



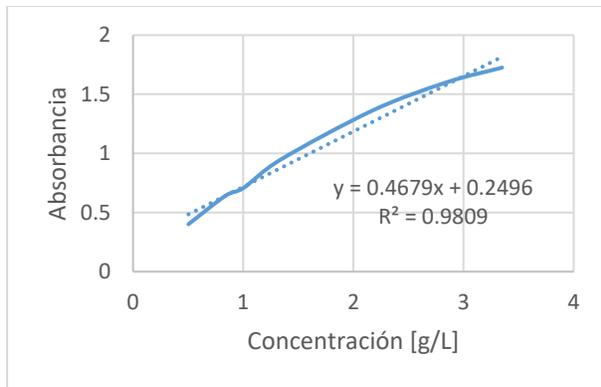
**Ilustración 31.** Curva de calibración peso seco LC.



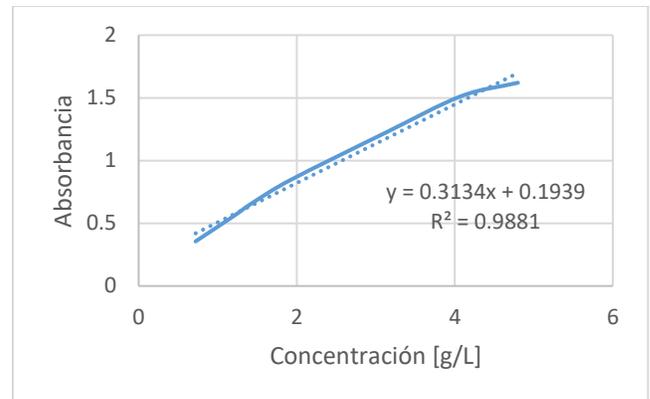
**Ilustración 29.** Curva de calibración peso seco SC.



**Ilustración 32.** Curva de calibración peso seco LP.



**Ilustración 33.** Curva de calibración peso seco LAB B.



**Ilustración 34.** Curva de calibración peso seco LAB C