



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, 14 de Marzo de 2016

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Wilmer Licerio Ladino Garzon, con C.C. No. 1.081.155.131 de Rivera (H), autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado "CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL), HONGOS Y LEVADURAS QUE INCIDEN DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE CAFÉ ARÁBICA (Coffea arabica) Y SU INFLUENCIA EN EL ANÁLISIS SENSORIAL Y CALIDAD DE LA TAZA" presentado y aprobado en el año 2017 como requisito para optar al título de Ingeniero Agrícola;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: Wilmer L. Ladino G.

Vigilada Mineducación



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:

“CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL), HONGOS Y LEVADURAS QUE INCIDEN DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE CAFÉ ARÁBICA (*Coffea arabica*) Y SU INFLUENCIA EN EL ANÁLISIS SENSORIAL Y CALIDAD DE LA TAZA”

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Ladino Garzon	Wilmer Licerio

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Amorocho Cruz	Claudia Milena

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Ruiz Osorio	Yaneth Liliana
Delgado Joven	Bertulfo

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Ingeniero Agrícola

FACULTAD: Ingeniería

PROGRAMA O POSGRADO: Ingeniería Agrícola

CIUDAD:

AÑO DE PRESENTACIÓN:

NÚMERO DE PÁGINAS:

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías__x_ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general___ Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___
Tablas o Cuadros_x_

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. variedades	varieties	6.	
2. evaluación sensorial	sensory evaluation	7.	
3. sabor	flavor	8.	
4. acidez	acidity	9.	
5.		10.	

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

El café (*Coffea arabica* L.) de Colombia es denominado “café suave lavado”; por las características que proporciona la adición de agua en el proceso de beneficio. Se evaluó la calidad en taza de muestras de café Caturra, Castillo y F6 procedentes del sur del departamento del Huila, se realizó beneficio semi-seco con fermentación, la metodología empleada consistió en someter inicialmente las muestras a procesos de fermentación sin adición de agua en tanques cerrados, con periodos de tiempo de 0, 12, 18, 24 y 30 horas (h). En cada tiempo de fermentación se llevó a cabo mediciones de parámetros fisicoquímicos del mucilago (°Brix y pH) y se realizó aislamiento para recuento en placa de Bacterias Acido Lácticas (BAL), levaduras; realizando identificación a nivel macroscópico y microscópico además se realizaron los aislados correspondientes para obtener una colección de cepas para posteriores investigaciones.

Después de la etapa de fermentación, las muestras fueron deshidratadas hasta la obtención de café pergamino seco (cps) con una humedad entre el 10 y 12 %, en esta etapa se desarrolló el análisis microbiológico para la caracterización de hongos en secado. La prueba de taza fue realizada por medio de un panel de catadores siguiendo los parámetros y metodologías establecidas por la Asociación de Cafés Especiales de América (SCAA), los resultados emitidos por los jueces fueron procesados mediante ANOVA de dos vías para determinar el efecto simultáneo del tiempo de fermentación y la variedad sobre la calidad final del producto.

Las variedades Castillo y F6 resultaron valoradas como cafés especiales para todos los tiempos de fermentación, al obtener entre 80.00 - 84.99 puntos, mientras que en la variedad Caturra disminuyó la calidad cuando la fermentación duró 24 y 30 horas, ubicándose por debajo de los 80.00 puntos de calificación, en el rango de los cafés de tipo “no especial”, esta etapa se llevó a cabo con catadores especializados en dos



jornadas de catación. El desarrollo experimental fue realizado en la sala de análisis sensorial y planta piloto del Centro Surcolombiano de Investigación en Café (CESURCAFE) ubicada en la facultad de ingeniería de la universidad Surcolombiana sede Neiva.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Colombian coffee (*Coffea arabica* L.) is called "Mild Coffee"; by the characteristics provided by the addition of water in the benefit process. Coffee samples of Caturra, Castillo and F6 from the southern department of Huila were evaluated with a sensory analysis. The methodology consisted in a semi-dry fermentation process without water addition in closed tanks, fermentation times were 0, 12, 18, 24 and 30 hours. Being located below the 80.00 points of qualification, in the range of the coffees of type "not special". This stage was carried out with tasters specialized in two journeys of catación. For each fermentation time, physicochemical determinations of were carried out in the mucilage samples ($^{\circ}$ Brix and pH), microbial isolation was also performed for lactic acid bacteria (BAL) and yeast; macroscopic and microscopic identification was done. In addition, the corresponding isolations were done to obtain a collection of strains for further investigations.

After the fermentation process, samples were sun dried; the target humidity was between 10 and 12%, at this point microbiological analysis was perform for fungi characterization in drying. The sensory analysis was perform through a tasters panel following the parameters and methodologies established by the Association of Special Coffees of America (SCAA), the judges results were processed by two-way ANOVA to determine the simultaneous effect of fermentation time and the variety effect on the product quality.

The varieties Castle and F6 were valued as special coffees for all fermentation times, obtaining a grade between 80.00 - 84.99 points, while the Caturra variety quality decreased when the fermentation lasted 24 and 30 hours. All the experimental procedures were carried out in Surcolombian Coffee Research Center (CESURCAFE) at the Surcolombian University, Neiva, Colombia, South America.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Claudia Milena Amorocho Cruz

Firma:

Nombre Jurado: Yaneth Liliana Ruiz Osorio

Firma:

Nombre Jurado: Rafael Delgado Jover

Firma:

**CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL), HONGOS Y
LEVADURAS QUE INCIDEN DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE
CAFÉ ARÁBICA (*Coffea arabica*) Y SU INFLUENCIA EN EL ANÁLISIS SENSORIAL Y
CALIDAD DE LA TAZA**

WILMER LICERIO LADINO GARZON

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA
NEIVA - HUILA**

2017

**CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL), HONGOS Y
LEVADURAS QUE INCIDEN DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE
CAFÉ ARÁBICA (*Coffea arabica*) Y SU INFLUENCIA EN EL ANÁLISIS SENSORIAL Y
CALIDAD DE LA TAZA**

WILMER LICERIO LADINO GARZON

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de:

INGENIERO AGRÍCOLA

Director

CLAUDIA MILENA AMOROCHO CRUZ

Ingeniero Agrícola

PhD Biotecnología

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

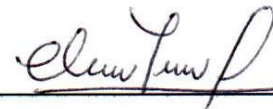
FACULTAD DE INGENIERÍA

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA

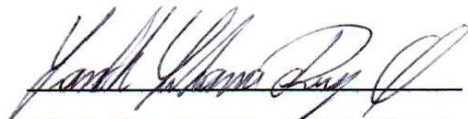
NEIVA - HUILA

2017

Nota de aceptación:



PhD. Claudia Milena Amorocho Cruz
Firma del Director del Proyecto



MsC. Yaneth Liliانا Ruiz Osorio
Firma del Jurado



Esp. Bertulfo Delgado Joven
Firma del Jurado

Neiva, Marzo de 2017

“Hay que tener la paciencia de una docena de Santos Job para dedicarse a la investigación”

Ernest Rutherford

A Dios.

A mis padres Luz Marina Garzón Vargas y Edgar Ladino Álvarez por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento.

A mis hermanos Jesús Antonio, Edgar, Luis Enrique y Sandy Julieht.

AGRADECIMIENTOS.

Expreso mis más sinceros agradecimientos a:

A Dios por iluminar mi camino.

A mis padres Luz Marina Garzon Vargas y Edgar Ladino Alvarez por el amor y paciencia que me han brindado, por el apoyo y motivación en cada momento que hubo un tropiezo, permitiéndome salir adelante y lograr mis metas propuestas.

A mi familia, mis hermanos Jesus Antonio, Edgar, Luis Enrique y Sandy Julieht por el apoyo constante en mi vida, el cual fue un punto clave en la culminación de esta etapa de formación profesional.

A mi directora Claudia Milena Amorocho Cruz por su asesoría, apoyo, tiempo y paciencia durante todo este proceso, aportando todo su conocimiento y experiencia permitiendo iniciarme en el mundo de la investigación.

Mis jurados Yaneth Liliana Ruiz Osorio y Bertulfo Delgado Joven, por su asesoría y tiempo de dedicación durante todo este proceso.

A Nelson Gutiérrez Guzmán por su apoyo, enseñanza y gran calidad humana, quien aportó su conocimiento y experiencia para enriquecer esta etapa de mi vida.

A Erika Tatiana Cortes Macías que más que una compañera de trabajo, es una amiga, la cual fue fundamental con sus buenos consejos, ayuda y dedicación que permitieron la culminación de este proyecto.

A mis compañeros Dayana Alejandra Orozco, Gentil Andres Escobar, Ricardo Cortes Bernal, Nataly Peña Gómez, Oscar Mauricio Bermeo, Bryan Leal Rojas, Marco Andres Ramirez Narvaez, Yeison Fernando Barrios, y demás integrantes del Centro Surcolombiano de Investigación en Café (CESURCAFÉ) que me ayudaron y prestaron su apoyo en todo momento durante este proyecto.

A la Universidad Surcolombiana por recibir de ella una gran formación académica de la mano de su cuerpo de docentes, como financiadora del proyecto y al Centro Surcolombiano de Investigación en Café (CESURCAFÉ) por permitir el uso de su planta de laboratorios.

A mis amigos y compañeros de estudio por ser personas que me dejaron grandes recuerdos y enseñanzas para la vida durante esta etapa de formación.

A todos ustedes muchísimas gracias porque sin ustedes no hubiera sido posible llevar a cabo este proyecto, realmente me siento muy afortunado de haberlos conocido no sólo por todo el conocimiento compartido sino por su calidad humana.

TABLA DE CONTENIDO.

ABSTRACT.	18
1. INTRODUCCIÓN.	19
1.1. Problema de investigación.	20
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.	22
3. OBJETIVOS.	24
3.1. OBJETIVO GENERAL.	24
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	24
4. MARCO CONCEPTUAL.	25
4.1. EL CAFÉ.	25
4.1.1. Origen y botánica.	25
4.1.2. Clasificación Taxonómica.	25
4.1.3. Especies.	26
4.1.4. Variedades de café (<i>Coffea arabica</i> L. y <i>Coffea canephora</i>).	26
4.1.4.1. Variedad <i>Coffea arabica</i> L.	26
4.1.4.1.1. Tipyca.	26
4.1.4.1.2. Bourbon.	26
4.1.4.1.3. Catuai.	27
4.1.4.1.4. Caturra.	27
4.1.4.1.5. Pache.	27
4.1.4.1.7. Mundo Novo.	27
4.1.4.1.8. Meragogype.	28
4.1.4.1.9. Amarello.	28
4.1.4.1.10. Blue Mountain.	28
4.1.4.1.11. Geisha.	28
4.1.4.2. Variedad <i>Coffea canephora</i> .	28
4.2. METODO DE RECOLECCIÓN.	28
4.2.1. Maduración.	28
4.2.2. Grado de maduración.	29
4.2.3. Recolección.	30
4.3. MANEJO POSCOSECHA.	31

4.3.1.	Beneficio del café.	31
4.3.2.	Beneficio por vía húmeda.	32
4.3.3.	Beneficio ecológico.	32
4.3.4.	Beneficio húmedo enzimático.	32
4.3.5.	Beneficio semihúmedo.	33
4.3.6.	Beneficio por vía seca.	33
4.4.	CALIDAD DEL CAFÉ.	33
4.4.1.	Factores Intrínsecos.	33
4.4.2.	Factores externos.	33
4.5.	CARACTERISITICAS DEL FRUTO.	33
4.5.1.	Estado físico del café.	34
4.5.1.1.	Cereza Madura.	34
4.5.1.2.	Pergamino seco.	35
4.5.1.3.	Café oro verde (Almendra Verde).	35
4.5.1.4.	Café tostado.	36
4.6.	ANALISIS FISICO.	36
4.7.	IMPORTANCIA ECONOMICA.	37
4.8.	ANALISIS SENSORIAL.	37
4.9.	MICROBIOLOGÍA EN EL CAFÉ.	38
4.9.1.	BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL).	38
4.9.1.1.	Filogenia de las BAL.	39
4.9.1.2.	Genero <i>Lactobacillus</i> .	40
4.9.1.3.	Género <i>Leuconostoc</i> .	40
4.9.1.4.	Género <i>Pediococcus</i> .	41
4.9.1.5.	Género <i>Streptococcus</i> .	41
4.10.	HONGOS O MOHOS.	42
4.10.1.	Reproducción.	43
4.10.1.1.	Reproducción sexual.	43
4.10.1.1.1.	<i>Oomycetes</i> .	43
4.10.1.1.2.	<i>Zygomycetes</i> .	43
4.10.1.1.2.	<i>Ascomycetes</i> .	43
4.10.1.1.3.	<i>Basidiomycetes</i> .	43

4.10.1.2. Reproducción Asexual.	44
4.10.1.2.1. <i>Deuteromycota</i> .	44
4.11. LEVADURAS.	44
4.11.1. <i>Zygosaccharomyces</i> .	44
4.11.2. <i>Debaryomyces hansenii</i> .	44
4.11.3. <i>Saccharomyces spp.</i>	45
4.11.4. <i>Candida</i> .	45
4.11.5. <i>Dekkera / Brettanomyces</i> .	45
4.12. CARACTERISTICAS FENOTIPICAS.	45
4.13. ANALISIS MICROBIOLOGICO.	45
4.1.3.1. Crecimiento microbiano.	46
4.1.3.2. Curva de crecimiento.	47
4.1.3.3. Recuento de células viables.	48
4.14. ANÁLISIS DE CONTAMINACIÓN POR SUBPRODUCTOS EN LA ETAPA DE BENEFICIO.	50
5. METODOLOGIA.	52
5.1. RECOLECCION DE MUESTRAS.	52
5.2. DESPULPADO DE MUESTRAS.	53
5.3. FERMENTACION.	53
5.4. ANALISIS MICROBIOLOGICO.	54
5.4.1. Análisis microbiológico de BAL y Levaduras.	54
5.4.1.1. Siembra y recuento de BAL y levaduras.	54
5.4.2. Análisis microbiológico de hongos.	54
5.4.2.1. Siembra de hongos.	54
5.4.3. Aislamiento de microorganismos.	55
5.5. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.	55
5.6. TINCIÓN DE GRAM.	55
5.7. SECADO.	56
5.8. ANALISIS FISICO.	56
5.9. ANALISIS SENSORIAL.	57
6. RESULTADOS Y DISCUSION.	58
6.1. Caracterización materia prima.	58
6.2. Análisis microbiológico.	59

6.2.1. Análisis microbiológico de BAL.	60
6.2.1. Análisis microbiológico de Levaduras.	63
6.2.3. Caracterización morfológica en placa y tinción Gram de las BAL y Levaduras.	67
6.2.4. Caracterización morfológica en placa de hongos.	72
6.3. Colección de microorganismos en conservación para posteriores investigaciones.	78
6.4. Análisis sensorial.	83
7. CONCLUSIONES.	87
8. RECOMENDACIONES.	89
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.	90
ANEXOS	100
CONGRESOS Y PUBLICACIONES	108

LISTADO DE ANEXOS.

Anexo A. Preparación de medios de cultivo.	101
Anexo B. Medios de cultivos utilizados.	102
Anexo C: Procedimiento análisis Físico del café.	106
Anexo D. Tinción de Gram.	106

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1: Comportamiento de °Brix y pH en Tiempos de Fermentación	58
Tabla 2: Códigos de muestras.	60
Tabla 3: Caracterización morfológica en placa y tinción Gram de las BAL. Medio de cultivo Agar MRS	68
Tabla 4: Caracterización morfológica en placa y tinción Gram de las Levaduras. Medio de cultivo Agar YGC.	69
Tabla 5: Colección de microorganismos para conservación.	78
Tabla 7: Descripción sensorial en los diferentes tiempos de fermentación de las tres variedades de café estudiadas	85

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1: Planta de café o cafeto con frutos.	25
Figura 2: Planta de café con frutos en diferentes estados de maduración.	29
Figura 3: Frutos de café con coloración de cereza ideal para cosecha (Criterio empírico del productor).	30
Figura 4: Proceso de recolección.	30
Figura 5: A). Recolección. B). Despulpado. C). Fermentación. D). Secado. E). Almacenado.	32
Figura 6: Composición de un fruto de café.	34
Figura 7: Café cereza.	34
Figura 8: Café Pergamino seco.	35
Figura 9: Café oro verde (Almendra Verde).	36
Figura 10: Café tostado.	36
Figura 11: A). Tostación de muestra. B). Molienda de muestra. C). Proporción de café en función del volumen de la taza seleccionada. D). Preparación de la taza. E). Panel catador entrenado para análisis sensorial.	38
Figura 12: Proceso general de la fisión binaria en un procariota con forma de bacilo.	46
Figura 13: Curva de crecimiento de una población bacteriana.	47
Figura 14: Método de siembra por extensión y Método de siembra por vertido en placa.	49
Figura 15: Determinación de células viables por diluciones seriadas y vertimiento en placa.	49
Figura 16: Ubicación de fincas donde se realizó el muestreo.	52
Figura 17: Embalaje de muestras.	52
Figura 18: Despulpado de muestras.	53
Figura 19: A). Medición de pH, B). Medición Grados Brix.	53
Figura 20: A). Toma de muestras. B). Preparación de diluciones. C). Siembra de alícuotas.	54
Figura 21: A). Siembra. B). Disposición de los granos de café.	55
Figura 22: A). Tamizado. B). Extensión en polisombra para secado.	56
Figura 23: Procedimiento en laboratorio para análisis físico de café pergamino.	57
Figura 24: Comportamiento pH en el tiempo. Barras con letras diferentes por tiempo de fermentación tienen diferencias estadísticamente significativas. Método HSD de Tukey ($p \leq 0,05$).	58
Figura 25: Comportamiento de Sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) en el tiempo. Barras con letras diferentes por tiempo de fermentación tienen diferencias estadísticamente significativas. Método HSD de Tukey ($p \leq 0,05$).	59
Figura 26: Codificación utilizada para la caracterización de las colonias para BAL, Levaduras y hongos.	59
Figura 27: Medias de crecimiento de BAL para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 0 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.	60

Figura 28: Medias de crecimiento de BAL para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 12 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.	61
Figura 29: Medias de crecimiento de BAL para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 18 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.	61
Figura 30: Medias de crecimiento de BAL para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 24 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.	62
Figura 31: Medias de crecimiento de BAL para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 30 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.	62
Figura 32: Crecimiento de BAL representadas en Log UFC/gr en función del tiempo de fermentación.	63
Figura 33: Medias de crecimiento de Levaduras para la variedad Caturra, F6 y Castillo para 0 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.	64
Figura 34: Medias de crecimiento de Levaduras para la variedad Caturra, F6 y Castillo para 12 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.	64
Figura 35: Medias de crecimiento de Levaduras para la variedad Caturra, F6 y Castillo para 18 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.	65
Figura 36: Medias de crecimiento de Levaduras para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 24 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.	65
Figura 37: Medias de crecimiento de Levaduras para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 30 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.	66
Figura 38: Crecimiento de Levaduras representadas en Log UFC/gr en función del tiempo de fermentación.	67
Figura 39: PDA J CPA18-7 Hongo polvoriento de color verde-amarillo en la parte central, degradado a negro hacia los bordes. Coloración en la parte inferior amarillo.	72
Figura 40: PDA Q CPA24-2 Hongo filamentoso de coloración blanco y negro, filamentos de color blanco. Coloración negro y café con apariencia concéntrica.	72
Figura 41: PDA R CPA24-3 Hongo algodonoso-polvoriento de cobertura seccionada, parte polvorienta de coloración café, parte algodonosa blanca con presencia de gotas sobre la cobertura. Coloración en la parte inferior ámbar.	72
Figura 42: AVM D CPA18-2 Hongo esponjoso y polvoriento de coloración gris y negro. Coloración parte inferior negro y grisáceo.	72
Figura 43: AVM G CPA18-4 Hongo polvoriento de color verde. Coloración parte inferior grisáceo y blanco- lechoso.	73
Figura 44: AVM K CPA24-3 Hongo polvoriento de color blanco y negro. Coloración parte inferior lechosa con puntos negros en donde se encuentra la zona polvorienta de la superficie.	73
Figura 45: PDA E11 CIJ30-22 Hongo polvoriento de color verde degradado a amarillo lechoso en los bordes. Coloración parte inferior amarillo.	73
Figura 46: PDA A11 CIJ18-5 Hongo polvoriento-algodonoso de color verde. Coloración parte inferior gris.	73
Figura 47. PDA C11 CIJ24-2 Hongo polvoriento de color gris degradado a azul-grisáceo en los bordes. Coloración inferior gris-lechoso.	74

Figura 48: PDA H11 CJ30-5 Hongo polvoriento de color verde degradado a blanco-lechoso en los bordes. Coloración inferior amarillo.	74
Figura 49: PDA F11 CIJ30-3 Hongo polvoriento de color negro con bordes blancos, apariencia de nervaduras radiales desde la parte central hacia los bordes. Coloración parte inferior blanco-lechoso con apariencia de nervaduras.	74
Figura 50: AVM U CIJ18-5 Hongo polvoriento de color gris degradado a azul-grisáceo en los bordes. Coloración inferior gris.	74
Figura 51: AVM T CIJ18-4 Hongo algodonoso-polvoriento de color verde-amarilloso. Coloración inferior blanco-lechoso con dilataciones radiales de color gris.	75
Figura 52: AVM V CIJ24-1 Hongo polvoriento de color gris. Parte inferior coloración gris.	75
Figura 53: AVM W CIJ24-2. Hongo algodonoso-polvoriento, zona polvorienta de coloración verde y parte algodonosa de coloración blanca. Coloración parte inferior blanco-lechoso.	75
Figura 54: AVM Y CIJ30-2 Hongo algodonoso de color blanco. Coloración parte inferior café.	75
Figura 55: PDA Q CBS24-3 Hongo esponjoso de color blanco. Coloración parte inferior blanca	76
Figura 56: PDA U CBS30-3 Hongo polvoriento-algodonoso de color negro y blanco. Coloración de parte inferior gris-lechoso.	76
Figura 57: PDA S CBS30-1 Hongo polvoriento de color gris. Coloración parte inferior gris-lechoso.	76
Figura 58: PDA N CBS18-7 Hongo algodonoso de color blanco. Coloración parte inferior amarillo.	76
Figura 59: PDA E CBS12-2 Hongo filamentoso de apariencia concéntrica de color café en el centro, degradado a gris en bordes. Parte inferior con apariencia concéntrica de coloración gris-lechoso.	77
Figura 60: PDA O CBS24-1 Hongo filamentoso de color naranja. Coloración parte inferior naranja-lechoso.	77
Figura 61: PDA M CBS18-6 Hongo polvoriento de color negro con base de coloración amarilla. Coloración parte inferior amarillo-lechoso con apariencia concéntrica.	77
Figura 62: AVM K CBS30-2 Hongo polvoriento de color gris. Coloración parte inferior gris-lechoso.	77
Figura 63: AVM J CBS30-1 Hongo algodonoso-polvoriento de coloración blanco-amarilloso. Coloración de la parte inferior blanco-lechoso.	78
Figura 64: AVM A CBS0-1 Hongo algodonoso de color amarillo en la parte central, degradado a blanco en los bordes. Coloración parte inferior blanco-lechoso.	78
Figura 65: Interacción entre el puntaje de taza con respecto al tiempo de fermentación y la variedad.	83
Figura 66: Diferencias sensoriales de bebidas de café de cada variedad. Barras con letras diferentes por atributos tienen diferencias estadísticamente significativas. Método HSD de Tukey ($p \leq 0,05$).	84
Figura 67: Procedimiento análisis Físico del café.	106

RESUMEN.

El café (*Coffea arabica* L.) de Colombia es denominado “café suave lavado”; por las características que proporciona la adición de agua en el proceso de beneficio. Se evaluó la calidad en taza de muestras de café Caturra, Castillo y F6 procedentes del sur del departamento del Huila, se realizó beneficio semi-seco con fermentación, la metodología empleada consistió en someter inicialmente las muestras a procesos de fermentación sin adición de agua en tanques cerrados, con periodos de tiempo de 0, 12, 18, 24 y 30 horas (h). En cada tiempo de fermentación se llevó a cabo mediciones de parámetros fisicoquímicos del mucilago (°Brix y pH) y se realizó aislamiento para recuento en placa de Bacterias Acido Lácticas (BAL), levaduras; realizando identificación a nivel macroscópico y microscópico además se realizaron los aislados correspondientes para obtener una colección de cepas para posteriores investigaciones.

Después de la etapa de fermentación, las muestras fueron deshidratadas hasta la obtención de café pergamino seco (cps) con una humedad entre el 10 y 12 %, en esta etapa se desarrolló el análisis microbiológico para la caracterización de hongos en secado. La prueba de taza fue realizada por medio de un panel de catadores siguiendo los parámetros y metodologías establecidas por la Asociación de Cafés Especiales de América (SCAA), los resultados emitidos por los jueces fueron procesados mediante ANOVA de dos vías para determinar el efecto simultáneo del tiempo de fermentación y la variedad sobre la calidad final del producto.

Las variedades Castillo y F6 resultaron valoradas como cafés especiales para todos los tiempos de fermentación, al obtener entre 80.00 - 84.99 puntos, mientras que en la variedad Caturra disminuyó la calidad cuando la fermentación duró 24 y 30 horas, ubicándose por debajo de los 80.00 puntos de calificación, en el rango de los cafés de tipo “no especial”, esta etapa se llevó a cabo con catadores especializados en dos jornadas de catación. El desarrollo experimental fue realizado en la sala de análisis sensorial y planta piloto del Centro Surcolombiano de Investigación en Café (CESURCAFE) ubicada en la facultad de ingeniería de la universidad Surcolombiana sede Neiva.

Palabras Clave: variedades, evaluación sensorial, sabor, acidez.

ABSTRACT.

Colombian coffee (*Coffea arabica* L.) is called "Mild Coffee"; by the characteristics provided by the addition of water in the benefit process. Coffee samples of Caturra, Castillo and F6 from the southern department of Huila were evaluated with a sensory analysis. The methodology consisted in a semi-dry fermentation process without water addition in closed tanks, fermentation times were 0, 12, 18, 24 and 30 hours. Being located below the 80.00 points of qualification, in the range of the coffees of type "not special". This stage was carried out with tasters specialized in two journeys of catación. For each fermentation time, physicochemical determinations of were carried out in the mucilage samples (° Brix and pH), microbial isolation was also performed for lactic acid bacteria (BAL) and yeast; macroscopic and microscopic identification was done. In addition, the corresponding isolations were done to obtain a collection of strains for further investigations.

After the fermentation process, samples were sun dried; the target humidity was between 10 and 12%, at this point microbiological analysis was perform for fungi characterization in drying. The sensory analysis was perform through a tasters panel following the parameters and methodologies established by the Association of Special Coffees of America (SCAA), the judges results were processed by two-way ANOVA to determine the simultaneous effect of fermentation time and the variety effect on the product quality.

The varieties Castle and F6 were valued as special coffees for all fermentation times, obtaining a grade between 80.00 - 84.99 points, while the Caturra variety quality decreased when the fermentation lasted 24 and 30 hours. All the experimental procedures were carried out in Surcolombian Coffee Research Center (CESURCAFE) at the Surcolombian University, Neiva, Colombia, South America.

Key words: varieties, sensory evaluation, flavor, acidity.

1. INTRODUCCIÓN.

El café (*Coffea arabica L.*) es uno de los productos de mayor importancia económica y social en las costumbres de muchas regiones, haciendo parte de la vida cotidiana de miles de personas. Se cultiva en aproximadamente 80 países y de los cuales 50 tienen la tendencia a realizar exportación (Temis-Pérez, López-Malo y Sosa-Morales, 2011). Teniendo en cuenta la seguridad alimentaria de Colombia, el empleo rural y el comercio internacional, el café se encuentra dentro de los productos fundamentales para el desarrollo del sector agropecuario (FINAGRO, 2014). Pertenece a la familia de las rubiáceas, en su totalidad existen aproximadamente 70 especies. Principalmente las dos especies que tienen gran importancia económica son: arábigo (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora*) (Clifford, 1999 citado por Watawana, Jayawardena y Waisundara, 2015; Pandey, Soccol, Nigamc, Brand, Mohanb y Roussos, 2000).

El fruto del café por lo general consiste en una capa externa de la piel, llamado exocarpio en la que hay una capa de pasta, seguido de mucilago (mesocarpio) firmemente adherida a la capa rígida llamada pergamino (endocarpio). El pergamino protege dos semillas rodeadas por una membrana fina conocida como piel de plata (Evangelista, Pedroso, Silva, Marques y Freitas, 2015; Ramos, Sanz y Oliveros, 2010).

La calidad en taza de café se mide a través de los atributos sensoriales que sobresalen en la preparación de la infusión de la bebida, la cual está dada por factores de genotipo, tipo de suelo, condiciones agroecológicas, variedad, prácticas agronómicas, de cosecha, post-cosecha y de torrefacción (Suárez, Rodríguez y Duran, 2015). La calidad de una bebida de café está ligada fuertemente a las reacciones químicas que se presentan en el proceso de tostión y al tipo de beneficio realizado post-cosecha (Lee, Cheong, Curran, Yu y Liu, 2015).

El beneficio seco, semi-seco y húmedo son los métodos de mayor aplicación para el procesamiento de café (Pandey et al., 2000 citado por Vinícius de Melo, Neto, Thomaz, Pedroni, Lorenci y Soccol., 2015).

En el beneficio seco o natural se requiere poca maquinaria para el procesado, consiste en secar las cerezas enteras, posteriores a la selección y recolección; después a la etapa de secado, se trilla, clasifica y almacena en sacos (ICO, 2016a). El beneficio húmedo requiere un equipo de uso concreto y la utilización de agua, este procedimiento difiere del anterior en que las cerezas se someten a despulpado y retiro de mucilago (Por medio de fermentación o mecánicamente) antes de llevarse a deshidratación (ICO, 2016a). En el beneficio semi-seco se realiza despulpado de las cerezas, siendo llevadas inmediatamente a secado (Cafes Betiko, 2013; Duicela, Corral, Farfán, Fernández, Shiguango, Guamán y Guamán, 2010).

La fermentación en el café hace referencia a la reacción microbiana de levaduras y bacterias para descomponer los azúcares presentes en el mucílago. Este proceso produce ácidos que más tarde añaden propiedades positivas o negativas en la bebida (Silva, 2014).

La calidad final de una bebida de café es analizada sensorialmente posterior al tostado, en el cual sobresalen notablemente características especiales debido a las reacciones de Millard, la caramelización y otras reacciones térmicas, dichas características son precursoras de las ya presente en los granos en estado oro (Lee et al, 2015). El café es una de las materias primas de mayor valor a nivel mundial, se ha posicionado en segundo puesto con más comercialización después del petróleo, el café tiene una gran importancia económica y política en muchos países en desarrollo; en países menos adelantados del mundo, las exportaciones de café representan una parte sustancial de sus ingresos en divisas, en algunos casos más del 80% (ICO, 2016b).

Las exportaciones para el año cafetero de Arábica que acabó en agosto de 2016 se cifraron en 70,96 millones de sacos, en comparación con 68,51 millones de sacos el año pasado, mientras que las exportaciones de Robusta se cifraron en 40,68 millones de sacos en comparación con 44,45 millones de sacos, teniendo una tendencia al aumento de las exportaciones de la variedad Arábica y reducción en la variedad Robusta (ICO, 2016c). Las exportaciones de Colombia en los últimos cuatro años (2012-2015) han tenido tendencia al alza con valores correspondientes a 11.523, 13.488, 14.571, 14.845 sacos de 60 Kg respectivamente (ICO, 2016d).

En este trabajo de investigación se realizó la caracterización de las Bacterias Acido Lácticas (BAL), hongos y levaduras que inciden durante el proceso de fermentación de café arábica (*Coffea arabica*) y su influencia en el análisis sensorial y calidad de la taza, del café proveniente de fincas certificadas del sur del Departamento del Huila, en diferentes tiempos de fermentación.

1.1. Problema de investigación.

El café es la bebida más consumida en el mundo debido a su agradable aroma y sabor. En parte, se atribuye a su contenido de cafeína.

La importancia de este producto en el departamento del Huila se debe a que se ha destacado a nivel nacional e internacional en producción y calidad, cuenta con 35 municipios productores, 82.017 caficultores, 101.263 fincas y 154.090 hectáreas en café. Convirtiéndose en el principal productor del grano por encima de los tres departamentos del eje cafetero juntos. Por lo que su participación en el total nacional para el año 2015 fue del 16.30% de la producción del país destacándose la siembra de cafés de alta calidad principalmente en Acevedo, Pitalito, Garzón, Neiva y La Plata (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2015).

El café proviene de un fruto compuesto por el grano, la pulpa y el mucilago, estos dos últimos son sustratos con una composición que favorece el crecimiento de microorganismos (Rodarte, Dias, Vilela y Schwan., 2011). Las pectinas son una fracción importante de los alimentos vegetales, están relacionadas con la pared celular primaria y en la región intercelular de los tejidos vegetales. Pueden ser degradadas de manera natural por enzimas pécticas, presentes en plantas superiores o pueden ser producidas por diversos microorganismos. Estas enzimas producen cambios estructurales en frutos y vegetales durante la maduración (García, Balbín, Cabrera y Castelvi., 2002). La pulpa y el mucilago del grano del fruto de café está compuesto por agua, proteína, fibra, minerales, sustancias

solubles e insolubles como pectina, taninos, azúcares reductores y no reductores, cafeína, ácido clorogénico, ácido cafeico, celulosa, hemicelulosa, lignina, aminoácidos (Rodarte et al., 2011).

El beneficio húmedo de café se realiza con el fin de retirar el mucilago que cubre los granos del café y dicha labor influye en la calidad del café (evaluación sensorial). En este proceso se da una fermentación natural, en estudios previos han encontrado enzimas como las pectinasas, pectasas y bacterias pectinolíticas que se encuentran en los frutos de café, tales como *Erwinia herbicola* y *Klebsiella pneumoniae*. Además, *Enterobacter spp.*, *E. agglomerans*, *E. aerogenes*, *Erwinia sp.*, *E. coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Proteus sp.*, *Serratia fonticola*, *Citrobacter freundii* anaerobias facultativas productoras de fermentaciones mixtas (Puerta, 2012).

Las principales levaduras fermentadoras aisladas del mucilago y que se han identificado en trabajos anteriores son *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. parasilpsis*, *C.pintolopesii* productoras de etanol y dióxido de carbono. Dentro de las BAL están *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Streptococcus faecalis* productoras de ácido láctico, alcohol, ácido acético, ácido fórmico y dióxido de carbono. Las BAL y levaduras son microorganismos presentes en los procesos de fermentación de diferentes alimentos, ocasionando cambios en el sabor, textura, manteniendo las propiedades sensoriales y proporcionando un efecto conservante (Amorocho, 2011), se encuentran en alimentos que se consumen desde la antigüedad y que son catalogados como productos biotecnológicos de primera generación, entre los que se encuentran el pan, vino, cerveza, yogurt, quesos.

¿La caracterización de las bacterias ácido lácticas (BAL), hongos y levaduras presente en el proceso de fermentación de café arábica (*Coffea arabica*), permite definir su influencia sobre la calidad final en taza?

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación de sustancias orgánicas, los azúcares se convierten en energía, además producen etanol y ácido acético, láctico, butírico entre otros (Puerta, 2012) y debido a la presencia de los ácidos butírico y propiónico en particular se presenta una pérdida en calidad debido a la difusión al grano.

Este proceso tiene un tiempo de duración ideal para su posterior lavado de 24 – 48 horas en investigaciones realizadas en Brasil (Silva, Schwan, Dias y Wheals., 2000). El mucílago, está compuesto de azúcares naturales y alcoholes, jugando un papel crucial en el desarrollo del sabor final del café e influyendo en aspectos cruciales como la dulzura y la acidez. Es importante que en el proceso de lavado el mucílago se elimine por completo, dejando únicamente el sabor que se desarrolló en la estructura celular del grano antes de haber sido recogido. En el proceso de lavado el mucílago se elimina mediante fermentación (Método tradicional) o utilizando métodos mecánicos.

En Colombia, el tiempo de fermentación varía dependiendo de la altitud donde se localiza el cultivo y procesamiento del fruto; esa así como Oliveros-Tascón, Sanz-Urbe, Montoya-Restrepo y Ramirez-Gómez (2011) establecen un tiempo de 16 horas. Se cree que el papel de los microorganismos es la secreción de pectinasas que descomponen el pectínico del mucílago durante la fermentación. Posterior a este proceso, se realiza el secado al sol o de forma mecánica llegando a un porcentaje de humedad final del 12%. Por otro lado si se presenta sobrefermentación durante el beneficio a falta de luz y exceso de humedad dadas sus condiciones ambientales o falta de control propiciaría el deterioro y la producción de organismos que producen toxinas (Silva et al., 2000).

Las funciones más importantes que desempeñan estos microorganismos en el proceso son tres (Silva et al., 2000):

- a. Producción pectinolítica (quizás celulolítica) enzimas encargadas de la degradación del mucílago y la pulpa.
- b. Deterioro por organismos.
- c. Producción de micotoxinas debido al mal secado y almacenamiento.

La velocidad y los compuestos formados en la fermentación dependen de la calidad del sustrato, madurez y sanidad del fruto influyendo en la composición química y microbiológica de los granos despulpados. Otros factores que influyen en la fermentación son la temperatura externa, higiene de las instalaciones, ambientes, equipos, tiempo y sistema de fermentación (Puerta, 2012).

El cultivo del café específicamente las cerezas de café están sometidas a la contaminación y por consiguiente colonización por microorganismos durante las diferentes fases de su desarrollo: cosecha, preparación, transporte y almacenamiento. La acción microbiana perjudicial para la calidad y la seguridad del producto final dependerá de las condiciones ambientales. Los estudios sobre la microbiología de las cerezas de café y los frijoles han encontrado que predominan hongos toxigénicos como los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, los cuales son contaminantes naturales del café y están presentes desde el cultivo

hasta el almacenamiento (Batista, Chalfoun, Prado, Schwan y Wheals., 2003), pueden llegar a través de las heridas en el fruto, las cuales se generan por la acción de insectos o daño mecánico.

Dada la gran cantidad de estudios realizados sobre el café en todas las etapas productivas se puede realizar una investigación para la Caracterización de las bacterias ácido lácticas (BAL), hongos y levaduras que inciden durante el proceso de fermentación de café arábica (*Coffea arabica*) y su influencia en el análisis sensorial y calidad de la taza, lo cual es de vital importancia para obtener un producto final de excelentes condiciones para los consumidores a nivel mundial.

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Aislar e identificar la microbiota presente en el fruto y en el proceso de fermentación del café proveniente de fincas certificadas del sur del Departamento del Huila, en diferentes tiempos de fermentación y su relación con la calidad en taza.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Aislar Bacterias Acido Lácticas (BAL), levaduras y hongos presentes en el beneficio de café a diferentes tiempos de fermentación.
- Evaluar el comportamiento de crecimiento de las BAL, levaduras y hongos a través de los diferentes tiempos de fermentación.
- Identificar morfológica, fisiológica y microscópicamente los microorganismos aislados.
- Obtener una colección de cepas aisladas del proceso propuesto para posteriores investigaciones.
- Evaluar cada muestra de café a través del análisis sensorial por un panel de catación.
- Evaluar los parámetros fisicoquímicos de cada una de las muestras de café.
- Realizar un análisis estadístico ANOVA para determinar los efectos combinados de tiempo de fermentación y tipo de microorganismo, sobre los parámetros fisicoquímicos (°Brix y pH) y sensoriales evaluados.

4. MARCO CONCEPTUAL.

4.1. EL CAFÉ.

4.1.1. Origen y botánica.

Se le conoce como cafeto o planta productora de café a un arbusto que se da en la región tropical de la tierra, es originario de África, su nombre se deriva de la ciudad de Kaffa, en Etiopia (Temis-Perez et al., 2011).

El café pertenece a la familia de las rubiáceas (*Rubiaceae*), grupo que engloba unos 500 géneros y más de 6.000 especies, la mayoría árboles y arbustos tropicales. Dentro del género *Coffea* hay más de 100 especies, todas ellas autóctonas de África tropical y de algunas islas de Océano Índico, como Madagascar. Todas son leñosas, pero comprenden desde arbustos hasta árboles de 5 a 10 metros de altura. Sus hojas son elípticas, acabadas en punta y aparecen por pares. Presentan peciolos cortos y pequeñas estipulas, y en el envés pueden aparecer unas pequeñas cavidades que albergan pequeños artrópodos, conocidas como domotia. Las hojas pueden ser también de distintos colores: verde lima, verde oscuro, bronce o con matices purpúreos. Los frutos son tipo drupa, con epicarpio carnoso y doble semilla. Las flores aparecen en inflorescencias (Rojo, 2014).

Los granos de café o semillas están contenidos en el fruto del arbusto, los cuales en estado de madurez toman un color rojizo o amarillo según su variedad y se les denomina "cereza". Cada una de ellas consiste en una piel exterior que envuelve una pulpa dulce. El fruto del cafeto cuyas semillas tostadas y molidas se utilizan para el consumo humano (Barrera, 2014).

4.1.2. Clasificación Taxonómica.



Figura 1: Planta de café o cafeto con frutos.

Fuente: Autor

La planta de cafeto o café (Figura. 1) pertenece al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, orden *Gentianales*, familia *Rubiaceae*, subfamilia *Ixoroideae*, tribu *Coffeae*, género *Coffea*, de cuyo genero se desprenden las especies *Coffea arabica* L. (café arábica), *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (café robusta), *Coffea liberica* (café libérica) entre otras (Gamogal, 2014).

4.1.3. Especies.

Desde el punto de vista económico, las especies de mayor abundancia económicas son: *Coffea arabica* L. (café arábica), *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (café robusta) y *Coffea liberica* (café libérica) son los de mayor producción a nivel comercial, con porcentajes en producción a nivel mundial de 60 %, 39 % y 1 % respectivamente (Waller, Bigger y Hillocks, 2007).

El lugar de origen del café Arábico son los montes de Abisinia hoy Etiopía, país donde se inició su cultivo, una evidencia que corrobora esta hipótesis es que en las áreas montañosas de este país y áreas vecinas de Sudán actualmente el café Arábico crece en forma silvestre sobre los 1500 msnm (Cárdenas, 2007).

El café robusta (*C. canephora*) es una planta nativa de los bosques ecuatoriales de África occidental, desde la costa Oeste en Uganda y la parte Sur del Sudán, en alturas que van desde el nivel del mar hasta aproximadamente los 1,000 metros (Vergara, 2012; Mendez, 2011).

Coffea liberica es un árbol de hasta 20 metros de altura, con hojas grandes y coriáceas. Se cultiva en Malasia y en África Occidental y sólo se comercia en pequeñas cantidades ya que su demanda es escasa, debido a que sus características de aroma y sabor, le hacen menos valorado (Waller et al., 2007).

4.1.4. Variedades de café (*Coffea arabica* L. y *Coffea canephora*).

Según Vergara, 2012 los cultivos de café de mayor reconocimiento comercialmente son las variedades de café perteneciente a la especie *Coffea arabica* L. se destaca por ser cultivadas en las zonas altas de América Latina y África en países como: Colombia, México, Perú, Kenya y Etiopía. Por otra parte las plantaciones provenientes de la especie *Coffea canephora* se caracteriza por ser cultivada en alturas a nivel del mar y hasta 600 msnm.

4.1.4.1. Variedad *Coffea arabica* L.

4.1.4.1.1. Tipyca.

Históricamente esta variedad fue cultivada en los jardines botánicos holandeses, se introdujo por los franceses al Caribe y desde allí se difundió a los países de Centro y Suramérica; es la base a partir de la cual muchas variedades de café se han desarrollado, se caracteriza por tener una producción baja, pero una excelente calidad (Gamogal, 2014; Puerta, 1998).

4.1.4.1.2. Bourbon.

Esta variedad fue cultivada por los franceses en las islas Bourbon hoy llamada Reunión de ahí proviene su nombre “Bourbon” (Gamogal, 2014; Vergara, 2012; Puerta, 1998),

posteriormente fue cultivado en América Latina y África, siendo El Salvador uno de los países que hoy destacan en la producción de esta variedad (Baru Black Mountain, 2008). Los frutos presentan maduración rápida, lo que permite tener una mayor probabilidad de caerse durante vientos y lluvias fuertes (ANACAFÉ, 2016; Gamogal, 2014; Vergara, 2012).

4.1.4.1.3. Catuai.

Es un cruce entre la variedad Caturra y la variedad Mundo Nuevo en Sao Pablo, Brasil. Es una variedad de porte bajo y alta producción. Presenta una característica de gran importancia que radica en que los frutos no se desprenden fácilmente de las ramas, especial para ser cultivado en zonas de vientos y lluvias fuertes. Además el rendimiento del grano es bueno así como la calidad de la bebida (ANACAFÉ, 2016; Gamogal, 2014; Vergara, 2012; Baru Black Mountain, 2008).

4.1.4.1.4. Caturra.

Esta variedad es una mutación del Borbón en el estado Minas Gerais en Brasil. Es una planta de porte bajo, tronco grueso y poco ramificado e inflexible (ANACAFÉ, 2016; Baru Black Mountain, 2008). Presenta una buena producción y alta calidad, se adapta muy bien a diversos tipos de ambiente, especialmente a 500 y 1700 metros de altura con precipitaciones anuales entre 2500- 3500 mm, la calidad mejora a mayor altura pero disminuyendo la producción (ANACAFÉ, 2016; Gamogal, 2014; Vergara, 2012).

4.1.4.1.5. Pache.

Es una planta que se caracteriza por ser de porte bajo con gran resistencia a la caída después de maduración del grano, en la actualidad hay dos variedades de Pache: el Pache Común (mutación del Typica) que fue descubierta en la Granja El Brito, en Santa Cruz del Naranjo, Guatemala, y el Pache Colis (mutación entre el Pache Común y el Caturra) (ANACAFÉ, 2016; Gamogal, 2014).

4.1.4.1.6. Catimor.

Es un cruce entre Timor (híbrido de robusta y arábica muy resistente a la oxidación) y Caturra. Fue creada en Portugal en 1959 (ANACAFÉ, 2016; Gamogal, 2014; Vergara, 2012). Según Banegas, 2009 este híbrido de Timor se caracteriza por tener genes de resistencia a la roya (*Hemileia vastatrix*). Se adapta bien a regiones más bajas pero a una altura mayor tiene una mejor calidad de taza (Gamogal, 2014; Vergara, 2012).

4.1.4.1.7. Mundo Novo.

Híbrido natural de Typica y Bourbon. La planta fue encontrada por primera vez en Brasil. Es fuerte y resistente a las enfermedades. Mundo Novo tiene una alta producción, pero madura un poco más tarde que otros tipos de café. Se da especialmente bien con una altura entre 1000 y 1700 metros con precipitaciones anuales de 1200-1800 mm (ANACAFÉ, 2016; Vergara, 2012).

4.1.4.1.8. Meragogype.

Esta variedad de café es una mutación de café Typica y fue descubierto en Brasil, la planta del café Maragogype es grande y es más alto que cualquiera de Bourbon o Typica. La producción es baja, pero las semillas son muy grandes y muy apreciadas en determinados mercados de café justamente por su apariencia (ANACAFÉ, 2016; Vergara, 2012).

4.1.4.1.9. Amarello.

Variedad de café poco cultivada pero apreciada por su fuerza y aroma. Híbrido de Mundo Novo y Caturra (Vergara, 2012).

4.1.4.1.10. Blue Mountain.

Blue Mountain es una región en Jamaica pero también una variedad apreciada por su resistencia a enfermedades y su capacidad para prosperar en altitudes elevadas. Se cultivó por primera vez en Jamaica pero actualmente también se encuentra en otras zonas como en Kona, Hawaii (Vergara, 2012).

4.1.4.1.11. Geisha.

Es de las variedades más exclusivas de café, de las hasta hoy conocidas a nivel mundial, es llamado el Champan de los cafés (Specialty Green Coffe Xorxios, 2016). Por el momento solo se produce en las tierras más altas de la provincia de Chiriquí, Panamá. Se trata de una variedad arábiga cuyo origen es Etiopía, y que al parecer fue traído hace algunos años desde Costa Rica. Este café está catalogado como uno de los más caros y exóticos (Vergara, 2012; Baru Black Mountain, 2008).

4.1.4.2. Variedad *Coffea canephora*.

Este tipo de café esta mejor adaptado para las tierras bajas, cálidas y húmedas como lo son las de Indonesia, Celia e India entre otras donde ha fallado las variedades de café arábiga, se caracteriza por tener resistencia a la roya (*Hemileia Spp*), gran capacidad productora y el fruto es resistente a la caída una vez se encuentra en estado de maduración (Mendez, 2011).

4.2. METODO DE RECOLECCIÓN.

4.2.1. Maduración.

En las condiciones climáticas de la zona cafetera el café presenta alta variación de maduración, observándose en una misma rama frutos en diferentes estados de desarrollo y en varios grados de madurez (Figura. 2) de acuerdo con López, Pulgarín, Restrepo y Tascon, 2003.

Esto se debe a que el arbusto florece varias veces durante el año. Por tanto, es necesario hacer una selección juiciosa y hábil de los granos que han madurado en un determinado tiempo. Esto conlleva realizar varios “pases” o recogidas durante la temporada de cosecha para evitar que los frutos se maduren excesivamente o se caigan (Monroig, 2015).



Figura 2: Planta de café con frutos en diferentes estados de maduración.

Fuente: Autor

4.2.2. Grado de maduración.

En el caso particular del café, la calidad en taza guarda relación con el grado de maduración del fruto y este a su vez está asociado con el color del epicarpio ó parte externa visible de la pulpa o cáscara (Azcón y Talón, 2000).

Cuando las personas clasifican visualmente los frutos de café por estados de maduración, hay mucha subjetividad debido a que existen diferentes estados de desarrollo que aparentemente comparten igual coloración sobre la epidermis (Carvajal, Aristizábal, Oliveros y Mejía, 2011).

La cosecha de los frutos de café se hace habitualmente con el criterio empírico sobre el color de la cereza, la cual al madurar presenta una mezcla de tonalidades verdes, amarillas y rojas, según el cultivar o variedad (Figura. 3), de acuerdo con López et al., 2003.



Figura 3: Frutos de café con coloración de cereza ideal para cosecha (Criterio empírico del productor).

Fuente: Autor

4.2.3. Recolección.

Según Gamonal, 2014 el proceso de recolección (Figura. 4) es primordial ya que permite realizar un manejo adecuado de postcosecha de los granos de café, para lo cual se debe de realizar las actividades siguientes:



Figura 4: Proceso de recolección.

Fuente: Autor

- Cortar los frutos maduros torciéndolos levemente para desprenderlos de la rama. Evitando cortar el café verde en la medida que le sea posible.
- El grano debe desprenderse sin arrancar el pedúnculo o “pezón” para que en el futuro se produzcan buenas cosechas.

- Se debe reducir a un mínimo el tumbar las hojas o romper las ramas y los tallos del arbusto de café.
- Siempre que sea posible el recogedor debe usar ambas manos. Una de ellas se utiliza para sostener la rama y la otra para recoger los frutos.
- Para evitar la rotura de ramas no las cruce de un lado para el otro. Es preferible darle la vuelta al arbusto.
- Cuando las ramas y los tallos están muy altos use un gancho o “garabato” para doblarlas y poder cosecharlas.
- Es necesario usar canastas u otros envases livianos firmemente ajustados a la cintura o cuello del trabajador. Esto evita que se le gire y se derrame el café. Si desea cosechar más café utilice una malla o toldo tendido en la hilera debajo de los arbustos de café. Esto aumenta su eficiencia.

4.3. MANEJO POSCOSECHA.

4.3.1. Beneficio del café.

Según Duicela, Corral y Fernández, 2010 el beneficio del café se define como el procedimiento de preparación del grano (café verde o café oro) a partir de los frutos maduros, mediante la eliminación de todas las envolturas, usando diversos métodos. El proceso de beneficio del café se inicia luego de la cosecha selectiva, el beneficiado del grano es un factor determinante de la calidad de la taza (Quiliguango, 2013). En Colombia se utiliza el beneficio por vía húmeda, que comprende las siguientes etapas (Figura. 5):

- Recolección (Selección de granos maduros).
- Despulpado (separación del exocarpio y parte del mesocarpio de la semilla).
- Remoción del mucílago (por fermentación natural o remoción mecánica).
- Lavado.
- Secado.
- Empacado.
- Almacenado.
- Pruebas físicas y sensoriales.
- Comercialización.



Figura 5: A). Recolección. B). Despulpado. C). Fermentación. D). Secado. E). Almacenado.

Fuente: Autor

Duicela *et al.*, 2010, mencionan cinco sistemas de manipulación que se describen a continuación:

4.3.2. Beneficio por vía húmeda.

El beneficiado húmedo es un proceso para transformar los frutos del cafeto de su estado de café cereza a café pergamino. Este proceso comprende las etapas de despulpado de café cereza, remoción del mucílago, lavado y secado, hasta obtener el café pergamino que posteriormente es trillado para la obtención del café oro o almendra. Con este proceso se obtiene café con características más suave en la bebida (Gamogal, 2014; Vergara, 2012; Puerta, 2000).

4.3.3. Beneficio ecológico.

La tecnología del beneficio ecológico del café, fue desarrollada en Colombia, esta soportada fundamentalmente en la eliminación del uso del agua en el despulpado y como medio de transporte de café en baba y de pulpa (Chacón, 2001). En este beneficio se obtiene una reducción en el consumo de agua mayor al 95% y un control de la contaminación de las aguas de más del 90%, sin afectar la calidad intrínseca del producto (Sanz, Oliveros, Ramírez, López y Velásquez, 2011; Pabón, Sanz y Oliveros, 2009).

4.3.4. Beneficio húmedo enzimático.

El beneficio húmedo enzimático es un proceso de transformación del café cereza a café pergamino húmedo, usando enzimas pectinolíticas aceleradoras de la fermentación (Gamogal, 2014; Duicela *et al.*, 2010).

4.3.5. Beneficio semihúmedo.

El beneficio semihúmedo es un proceso de transformación del café cereza maduro a café pergamino seco “con miel”, que involucra el despulpado secado del “café baba” con todo el mucílago (Gamogal, 2014).

4.3.6. Beneficio por vía seca.

El método por vía seca (método natural) es el más antiguo y el más sencillo y requiere poca maquinaria. Este método consiste en secar la cereza entera y consiste en deshidratarlo, por medios naturales o artificiales, hasta un nivel en que puede ser llevado a la trilladora para la eliminación física de las envolturas del fruto en almendra seca (Gamogal, 2014; Vergara, 2012). Los cafés obtenidos por vía seca presenta cuerpos y amargos más espesos y fuertes (Puerta, 2000).

4.4. CALIDAD DEL CAFÉ.

El café posee sabores básicos cuya intensidad depende de factores como la zona de cultivo, el suelo, la recolección del fruto, procesamiento y el nivel de tostado entre otros. La evaluación sensorial permite encontrar y valorar todas las características que definen su calidad (Sustainable Commodity Assistance Network SCAN, 2015).

Según Vergara, 2012 la calidad del café está determinada por factores intrínsecos y factores externos que se mencionaran a continuación:

4.4.1. Factores Intrínsecos.

- Tipo de café (Especie).
- Variedad de café obtenida por selección.
- Latitud.
- Altitud.
- Condiciones del suelo y el climáticas.

4.4.2. Factores externos.

Buenas prácticas agrícolas (B.P.A)

- Labranza.
- Recolección.
- Beneficiado primario.

4.5. CARACTERISITICAS DEL FRUTO.

El fruto maduro del café (café cereza), una vez cosechado, es un material perecedero, por lo cual debe ser transformado rápidamente a café pergamino seco, con humedad en el rango del 10% al 12%, base húmeda, para preservar su calidad intrínseca (Rodríguez, Sanz, Oliveros y Ramírez, 2015).

Se define un fruto de café como una baya drupácea, conformada por la pulpa, epidermis o exocarpio, y el mucílago o mesocarpio, que es una sustancia azucarada y gelatinosa, que forma una capa de 0,5 mm de espesor promedio, la cual recubre los dos granos enfrentados por su cara plana (Figura. 6) (Ramos et al., 2010).

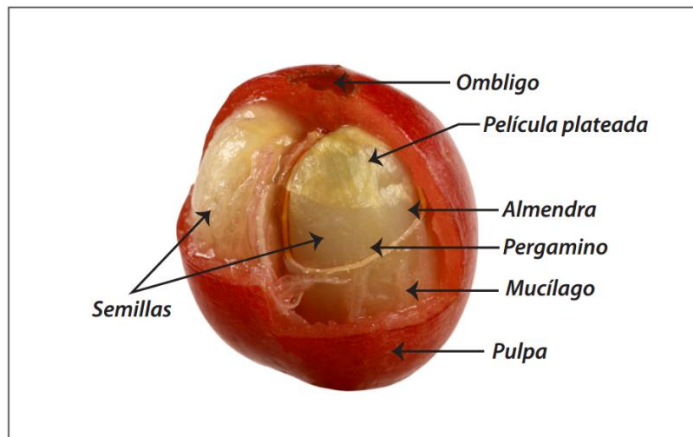


Figura 6: Composición de un fruto de café.
Fuente: Ramos et al., 2010.

4.5.1. Estado físico del café.

4.5.1.1. Cereza Madura.

Se le denomina “Uva o Cereza Madura” al fruto recién recolectado en su etapa óptima de madurez antes de ser procesado en el beneficio (Figura. 7).



Figura 7: Café cereza.
Fuente: Autor

Técnicamente, el estado físico del café maduro, tiene que ser un fruto fresco completamente maduro, que haya tenido todo el tratamiento de preparación durante su desarrollo, para que al momento de su corte tenga toda la vigorosidad posible, y en el momento de su transformación de maduro a pergamino, de pergamino a oro, de oro a tostado y finalmente de tostado y molido a consumo final en taza, produzca una alta calidad (USAID, 2005).

4.5.1.2. Pergamino seco.

Es el que proviene del proceso de la línea de secado en el beneficio, obteniéndose del resultado del secado mediante radiación solar (secado natural) o por medio de equipos mecánicos de secado (secado artificial con condiciones de temperatura y tiempo controlado), el buen proceso en esta línea dará como resultado un café parejo en secamiento, con una humedad de 10% a 12%, la coloración del pergamino es amarillo claro (Figura. 8), limpio y con un aroma de trigo agradable (USAID, 2005).



Figura 8: Café Pergamino seco.

Fuente: Autor

4.5.1.3. Café oro verde (Almendra Verde).

Es el café que resulta de la transformación del pergamino a oro, en el proceso del beneficio seco, obteniéndose de la trilla y de los equipos de clasificación por tamaño, densidad y color; su presentación tiene que ser verde homogéneo (Figura. 9), el porcentaje de humedad para el café oro debe ser de 10% a 12% y su rendimiento es de 76% a 83% con relación al café pergamino (USAID, 2005).



Figura 9: Café oro verde (Almendra Verde).

Fuente: Autor

4.5.1.4. Café tostado.

El proceso de tostado de café consiste en someter el café oro a calor para deshidratarlo y transformarlo mediante las reacciones de Maillard y un proceso de caramelización (Figura. 10). El proceso del tueste es afectado por muchos factores incluyendo la forma de la aplicación de calor, el tiempo y las características del grano a tostar (Garay, 2014; USAID, 2005; López, 2003).



Figura 10: Café tostado.

Fuente: Autor

4.6. ANALISIS FISICO.

Las características físicas de los granos, repercuten sobre la calidad de la bebida y la apariencia (presentación). Por lo tanto, es importante disponer de granos de buena calidad y apariencia, para tener la seguridad de elaborar una bebida de excelente calidad. Las

características físicas del grano se relacionan con la forma, tamaño, color, uniformidad, humedad, densidad y defectos de los granos de café. Un café puede estropearse por una cosecha o proceso postcosecha incorrectos; pues, influyen en el grano, que se evidencia notablemente en su apariencia física y por el número y tipo de defectos encontrados en una muestra de café verde (Quiliguango, 2013).

4.7. IMPORTANCIA ECONOMICA.

El café es el segundo producto básico más valioso y comercializado del mundo, después del petróleo, lo que significa su importancia para la economía global (Hughes, López, Jones, Moser, Cox, Lindquist, Galindo, Riaño, Rodríguez, Gast, Cedeño, Tasaki, Brown, Darzins y Brunner, 2014; Pérez, 2013; Beelaerts, 2011). Durante el periodo comprendido en los años 2012 - 2013 su consumo fue de 143.1 millones sacos de 60 kg, lo que significa su importancia para la economía global. Colombia participó con una producción de 10,2 millones de sacos en este período. En el país más de 2 millones de personas viven directamente de la producción de café. El fruto del café es sólo el 7,6% del peso fresco en la preparación de la bebida, y el 92,4% corresponde a residuos de desecho (Hughes et al., 2014).

Es crucial para la economía y la política de muchos países en desarrollo debido a que su cultivo, procesamiento, comercialización y marketing proporcionan empleo a millones de personas (Mussatto, Machado, Martins y Teixeira., 2010).

En Colombia, el café se considera la principal industria exportadora del país de origen agrario, propició con su difusión el cambio económico y social, ya que con su dinámica se convirtió en una especie de motor del crecimiento. La relevancia del café como industria, con sus efectos externos y complementariedades, se consolidó como una actividad socialmente productiva, por sus efectos de arrastre e impulso a industrias complementarias (Pérez, 2013).

4.8. ANALISIS SENSORIAL.

Según Sanmiguel, 2013 el Instituto de Alimentos de EEUU (Institute of Food Technologists IFT), define la evaluación sensorial como “la disciplina científica utilizada para evocar, medir analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído” (Figura. 11).

La evaluación sensorial de los alimentos es una función primaria del hombre: desde su infancia y de una forma consciente o inconsciente, acepta o rechaza los alimentos de acuerdo con las sensaciones que experimenta al consumirlos. Las sensaciones que motivan al rechazo o a la aceptación varían con el tiempo y el momento en que se perciben; depende tanto de la persona como del entorno en el que se encuentra (Sustainable Commodity Assistance Network SCAN, 2015).

En el café, por medio de la técnica de análisis sensorial se pueden determinar los defectos presentes en la bebida de café, medir la intensidad de una característica sensorial como la

acidez y el dulzor, y de igual forma calificar el sabor, la acidez y la calidad global del producto (Puerta, 2009).



Figura 11: A). Tostación de muestra. B). Molienda de muestra. C). Proporción de café en función del volumen de la taza seleccionada. D). Preparación de la taza. E). Panel catador entrenado para análisis sensorial.

Fuente: Autor

4.9. MICROBIOLOGÍA EN EL CAFÉ.

4.9.1. BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL).

Las BAL tienen en común la producción de ácido láctico como producto mayoritario del catabolismo de los azúcares (Sánchez, 2005).

Los límites de este grupo han sido objeto de controversia, pero históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* son los más importantes (Hernández, 2010).

Las revisiones taxonómicas de este género y la descripción de nuevos géneros sugieren que el grupo de las BAL está formado por los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Dicha clasificación corresponde a similitudes en las características morfológicas, metabólicas, fisiológicas, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, capacidad de crecer a elevadas concentraciones de sales y en la tolerancia ácido-base (Ramírez, Rosas, Velasquez, Ulloa y Arce, 2011; Parra, 2010; Hernández, 2010; Fox, Guinee, Cogan y McSweeney, 2000; Axelson, 1998).

Las BAL tienen características genéticas diversas, en general son microorganismos Gram-positivos, no pigmentados, no forman esporas, y no reducen los nitratos, ni producen catalasa (Rodríguez, 2007; Fox et al., 2000), con forma cocoide o bacilar (Amorocho, 2011; Mora y García, 2007).

La clasificación de las BAL en diferentes géneros está basada en la morfología, modo de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a elevadas concentraciones de sales y la tolerancia ácido base (Hernández, 2010; Collado, 2004).

Las BAL mediante la fosforilación de los carbohidratos obtienen la energía metabólica formando como principal metabolito ácido láctico, de donde proviene el su nombre (Hernández, 2010; Sánchez, 2005; Collado, 2004). Se han encontrado en mucilago de café (Puerta, 2015; Puerta, 2012). Su actividad proteolítica le permite obtener aminoácidos a partir de proteínas. A lo largo de la historia se han empleado en la fermentación de variados alimentos induciendo cambios en el sabor, la textura y tienen efecto conservante incrementando su vida útil, al mantener las propiedades sensoriales y reológicas de los mismos (Di Cagno, Cardinali, Minervini, Antonielli, Giuseppe, Ricciuti y Gobetti, 2010; Liu, Griffiths y Shang, 2010).

Varias cepas lácticas producen exopolisacáridos que son secretados en el medio donde crecen o permanecen fuertemente adheridos a la superficie de la célula, son de especial interés en la elaboración de productos funcionales y muchos de ellos son heteropolisacáridos empleados como bioespesantes que mejoran la textura y la estabilidad de productos lácteos como leches fermentadas y quesos (Rodríguez-Carvajal, Sánchez, Campelo, Martínez, Rodríguez y Gil-Serrano, 2008). En contraste, los homopolisacáridos son poco evaluados y se emplean para fermentar productos no lácteos como por ejemplo productos de masas fermentadas (Garai-Ibabe, Areizaga, Aznar, Elizaquivel, Prieto, Irastorza y Dueñas, 2010).

4.9.1.1. Filogenia de las BAL.

La determinación de las relaciones filogenéticas es posible de forma óptima a partir de comparaciones de la secuencia de ARNr. Se ha podido conocer en detalle las relaciones filogenéticas entre los género de las BAL y otros géneros con bajo contenido de guanina más citosina (G+C) por medio del uso de la transcriptasa y las técnicas de secuenciación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las bacterias Gram-positivas se agrupan en uno de los 11 principales taxones, en donde su pared celular tiene una fuerte relevancia filogenética (Amorocho, 2011; Hernández 2010; Collado 2004).

Entre cepas de la misma especie se encuentran variaciones de 3-5% en el contenido de G+C y del 10-12% entre especies del mismo género. Por tanto, diferencias entre el 15-20% indican heterogeneidad filogenética. Sin embargo, aunque el porcentaje molar de G+C es un parámetro característico del genoma, tiene un valor taxonómico limitado. Aunque diferencias en dicho porcentaje evidencian divergencia filogenética, la determinación de valores similares no asegura una relación de proximidad (Amorocho, 2011; Hernández 2010; Collado 2004).

4.9.1.2. Género *Lactobacillus*.

El género *Lactobacillus* se encuentra ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la flora normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. No son considerados patógenos. Tienen una gran importancia industrial, pues se utilizan en diversos procesos de fermentación láctica en derivados de lácteos y en la fabricación de productos derivados de los vegetales (Hernández 2010; Collado 2004).

Este género pertenece a la familia *Lactobacillaceae*, existen actualmente 96 especies y 16 subespecies. Son bacilos largos y finos, algunos curvados o cortos y morfología cocobacilar corniforme, es habitual la formación de cadenas (Amarocho, 2011; Hernández, 2010; Collado 2004). La longitud de los bacilos y el grado de curvatura está en función de la edad del cultivo, composición y pH del medio. No es común la movilidad, aunque algunos presentan flagelos peritricos (Amarocho, 2011; Hernández, 2010; Collado 2004).

Son anaerobios facultativos, algunas veces microaerófilos, crecen en la superficie de medios con tensiones de oxígeno bajas y un 5-10% de Dioxido de carbono (CO₂), en rangos de temperatura comprendidos entre 2-53°C, pH óptimo entre 5.5–6.2, la velocidad de crecimiento a menudo se reduce en pH neutro y alcalino (Amarocho, 2011; Hernández, 2010; Collado 2004). Tienen metabolismo fermentativo, son sacarolíticos y su característica principal es fermentar azúcares con producción de ácido láctico. Son homofermentadores cuando originan ácido láctico y heterofermentadores al producir ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono (CO₂), etanol, ácido fórmico o succínico. El porcentaje molar G+C tiene valores de 32-53 (Hernández 2010; De Vos, Garrity, Krieg, Ludwig, Rainey, Schleifer y Whitman, 2009; Pot y Tsakalidou, 2009).

Los requerimientos nutricionales incluyen aminoácidos, péptidos derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables. El medio Man Rogosa Sharpe (MRS) es uno de los más empleados, puede ser utilizado para el cultivo de todo el grupo de bacterias de ácido láctico, el medio MRS está especialmente recomendado para la enumeración y mantenimiento de bacilos lácticos, ya sea por la técnica del número más probable (NMP) en caldo o por siembra en masa (Collado, 2004).

Este género contribuye positivamente en la tecnología de alimentos, producen compuestos volátiles que pueden otorgar un aroma placentero de alimento fermentado o deteriorarlos afectando las propiedades sensoriales como el sabor, textura, color, limo y formación de aminas biogénicas (De Vos et al., 2009).

4.9.1.3. Género *Leuconostoc*.

El género *Leuconostoc* son cocobacilos Gram-positivos resistentes a vancomicina, distribuidos en la naturaleza y empleados en la industria alimentaria (Martínez, Díaz, Acosta y Ramos., 2012; Jofré, Sakurada, Ulloa, Hormázabal, Godoy, Fernández, Gutiérrez, Monteverde, Castillo y Canales, 2006; Winn, Allen, Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger y Woods, 2006). Pertenece a la familia *Leuconostocaceae*, usualmente la

agrupación es en diplococos o cadenas, morfológicamente se parecen a los *Lactobacillus* y *Streptococcus* (De Vos et al., 2009).

Anaerobias facultativas, catalasa negativa, no proteolítico, no reduce el nitrato, no hemolítico, no hidroliza la arginina, no forma indol, heterofermentativo; comprende 10 especies. Normalmente no acidifican, ni cuajan la leche, la temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 30°C y crece en medios ricos suplementados con aminoácidos. Las colonias se desarrollan después de 3-5 días, son lisas, color blanco a grisáceo con diámetros de menos de 1 mm, son más ácido tolerantes que los *Lactobacillus* (De Vos et al., 2009).

Las especies de *Leuconostoc* están asociadas a variedad de productos fermentados y cárnicos. Algunas especies son empleadas como iniciadores en mantequilla, crema de queso, leche cortada y producción de kéfir (Martínez et al., 2012; De Vos et al., 2009; Jofré et al., 2006).

Fenotípicamente, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* comparten muchas características y a menudo son aislados del mismo hábitat. Filogenéticamente la rama de *Leuconostoc* está próxima a la de *Lactobacillus*. La identificación molecular con amplificación del DNA mediante iniciadores aleatorios (RAPD) podría diferenciar aislados a nivel de cepa (De Vos et al., 2009).

4.9.1.4. Género *Pediococcus*.

Los microorganismos del género *Pediococcus* se encuentran dentro de los cocos Gram-positivos, catalasa negativos. Se trata de bacterias esféricas cuya división tiene lugar en dos planos en ángulos rectos con lo que se forman tétradas, si bien no siempre sucede así, observándose solamente parejas de células. El tamaño celular varía de 0,6-1,0 µm dependiendo de las cepas pero en un mismo cultivo esta característica es uniforme (De Vos et al., 2009; Zumárraga y Barbero, 2009; Moreira, 1993).

Los pediococos crecen bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas facultativas en todos los habitats que les proporcionen carbohidratos, productos del catabolismo proteico, nucleótidos y vitaminas. Las temperaturas mesófilas les son favorables (Pot y Tsakalidou, 2009; Moreira, 1993).

Algunos estudios sugieren la presencia de especies de *Pediococcus* de humanos en la boca, tracto digestivo, heces y en animales (De Vos et al., 2009). Se encuentran en material vegetal, alimentos y deterioran bebidas alcohólicas como cerveza y vino (Amorocho, 2011; Winn et al., 2006).

4.9.1.5. Género *Streptococcus*.

El género *Streptococcus* es un grupo muy numeroso y heterogéneo de bacterias, algunas de las cuales son importantes patógenos para el ser humano, pero la mayoría son comensales, miembros de la microbiota normal humana de piel y mucosas (Gomes, 2013; Montes y García, 2007).

Los estreptococos son bacterias Gram-positivas, esféricas, tienen agrupación de crecimiento en cadenas o pares, donde cada división celular ocurre a lo largo de un eje (Fox, 2016; Prado,

Rodríguez, Figueroa y Shirai., 2013; Gomes, 2013; Hernández, 2010; Montes y García, 2007; Whiley y Hardie, 1884). De allí que su nombre, del Griego streptos, significa que se dobla y retuerce con facilidad, como una cadena, son oxidasa y catalasa negativas (Fox, 2016; Prado et al., 2013; Hernández, 2010; Whiley y Hardie, 1884).

Según Whiley y Hardie , 1884 en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology describen los estreptococos como microorganismos fermentadores de la glucosa produciendo ácido láctico con diámetro de células menores a 2 μm . Además el contenido de guanina y citosina (G + C) del ADN está entre 34 y 46 mol %, crecen bien en medios enriquecidos con sangre, suero o carbohidratos, a 35-37 °C, especialmente si son incubados en una atmósfera con dióxido de carbono al 5-7%, la mayoría crecen mejor en condiciones anaerobias.

Este género de BAL tiene gran importancia para la medicina y la industria, son esenciales en procesos industriales, lácteos y como indicadores de contaminación (Suárez, 2002). La contaminación de alimentos por este tipo de microorganismos es el resultado de la poca higiene, los manipuladores de alimentos enfermos o por el uso de leche no pasteurizada (Starovičová y Hartemink, 2016).

4.10. HONGOS O MOHOS.

Los hongos no son plantas ni animales se encuentran agrupados en un reino aparte, el Reino Fungí (Kuhar, Castiglia y Papinutti., 2013). Son organismos con núcleo que se reproducen por esporas, carecen de clorofila por lo tanto no realizan el proceso de fotosíntesis (Ruiz, 2002).

Este tipo de microorganismo se caracterizan por ser filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso, en ocasiones con cierta pigmentación; tienen estructuras somáticas y ramificadas rodeadas por una pared celular hecha de celulosa, quitina o ambas (Ruiz, 2002). Generalmente todo alimento con este tipo de característica se considera no apto para el consumo; por otra parte la identificación y clasificación de estos microorganismos se basa en observaciones macroscópicas y microscópicas (Camacho, Giles, Ortegón, Palao, Serrano y Velázquez., 2009).

Los hongos son agrupados de acuerdo a diversos criterios que convergen en la taxonomía, es decir, el arte de ordenar a los seres según sus interrelaciones fisiológicas, morfológicas o moleculares (Carrillo, 2003).

La reproducción puede efectuarse asexualmente (hongos imperfectos) o sexualmente (hongos perfectos) por medio de esporas, los hongos de reproducción sexual se encuentran divididos en *Oomycetes* y *Zygomycetes* los cuales no son septados, o bien en *Ascomycetes* y *Basidiomycetes* que si son septados (Camacho et al., 2009; Morales, 2009; Ruiz, 2002).

Los mohos para su desarrollo en alimentos deshidratados, necesitan porcentajes de humedad superiores al 14 %, estos microorganismos se pueden considerar mesófilos aunque la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 25 y 30 °C con excepciones de unos psicrótrofos y termófilos, crecen en un amplio intervalo de pH comprendido entre 2 y

8.5 (Camacho et al., 2009) (Morales, 2009). Los hongos son microorganismos implacables en la degradación de materia orgánica, por lo cual se consideran indeseable si el material es atacado por ellos (Ruiz, 2002).

4.10.1. Reproducción.

4.10.1.1. Reproducción sexual.

Tiene lugar en medios de deficiencia nutritivas, para la preservación dichos microorganismos generan células especiales resistentes (esporas). Este tipo de reproducción no se da en hongos que causen patología en el ser humano (Morales, 2009).

4.10.1.1.1. *Oomycetes*.

Son llamados mohos acuáticos ya que proliferan en agua dulce, preferiblemente corrientes de agua bien aireadas, aunque hay especies anaerobias facultativas. Desempeñan un papel importantísimo en la degradación y reciclaje de la materia orgánica en entornos acuáticos. Existen especies parásitas de algas, animales e incluso de seres humanos (Carrillo, 2003).

La reproducción es por medio de Zigosporas, la cuales se dan por la fusión de dos gametos similares que se encuentran en el extremo de las hifas (Andino y Castillo., 2010; Morales, 2009).

4.10.1.1.2. *Zygomycetes*.

Los *Zygomycetes* son saprobios comunes en el suelo, algunas especies están asociadas al estiércol y otras son parásitas de insectos. También incluye hongos asociados simbióticamente con plantas formando micorrizas vesículoarbusculares (Carrillo, 2003).

La reproducción es por medio de Oosporas que se forman por la unión de dos gametos desiguales en cuanto a tamaño (Andino y Castillo, 2010; Morales, 2009).

4.10.1.1.2. *Ascomycetes*.

Los *Ascomycetes* abarcan hongos miceliales y levaduras, empleadas en la panificación y la producción de cerveza. Las levaduras están asociadas a frutas, pero también se hallan en agua dulce y ambientes marinos (Carrillo, 2003).

La reproducción se realiza por medio de Ascosporas se produce por la unión de dos hifas, desapareciendo la pared celular que las separa. Posteriormente ocurre la fecundación originando de 4 a 8 esporas dentro de un saco denominado asco (Andino y Castillo., 2010; Morales, 2009).

4.10.1.1.3. *Basidiomycetes*.

Los *Basidiomycetes* incluyen los hongos que viven asociados con plantas formando micorrizas, comprenden a la mayoría de los hongos comestibles, y algunos causan enfermedades de vegetales como las royas, pero la mayoría son saprobios que crecen sobre mantillo, compost, estiércol o suelo. Su tamaño es variable, desde levaduriformes hasta enormes hongos en repisa (Carrillo, 2003).

La reproducción se realiza por medio de Basidiosporas, las cuales se forman por la fusión de dos núcleos de una hifa, posteriormente los cuatro núcleos haploides se dirigen hacia fuera y se rodean de citoplasma dando lugar a las basidiosporas (Andino y Castillo., 2010; Morales, 2009).

4.10.1.2. Reproducción Asexual.

Este tipo de reproducción se presenta en hongos donde el medio que habitan proporciona gran cantidad de material nutritivo, existen varios tipos de reproducción asexual en los que se encuentra la gemación, bipartición y esporulación (Morales, 2009).

4.10.1.2.1. *Deuteromycota*.

Son denominados hongos imperfectos, son unicelulares y pluricelulares. Se les proporciona este nombre ya que no se sabe cómo efectúan una parte de su reproducción, sus hifas presentan septos simples, algunas especies tienen tanto la fase de levadura como la de micelio, su reproducción asexual es por conidios y carecen de estructuras reproductoras sexuales (Carrillo, 2003).

4.11. LEVADURAS.

Las levaduras son hongos unicelulares, con una morfología característica esférica u ovalada. Las levaduras se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran frecuentemente en forma de polvillo blanco que cubre los frutos y las hojas (Petrenko, 2004).

Las levaduras son microorganismos de gran importancia en la industria alimentaria, son útiles en la elaboración de alimentos y bebidas, por otra parte puede involucrarse en procesos de degradación por procesos de fermentación o contaminación de las frutas en la etapa de postcosecha (Senses-Ergul, Ágoston, Belák y Deák., 2005, citado por Uribe, 2007; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Según Rawat, (2015), existen cuatro grupos principales de levaduras que ocasionan deterioro: *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces spp*, *Candida* y *Dekkera / Brettanomyces*.

Estos microorganismos tienen la característica de ser unicelulares que se desarrollan con o sin oxígeno (Facultativo) se adaptan con gran facilidad a ambientes líquidos y a diferencia algunos hongos, no producen metabolitos secundarios tóxicos (Rawat, 2015; Ebabhi, Adekunle, Okunowo y Osuntoki., 2013, Petrenko, 2004).

4.11.1. *Zygosaccharomyces*.

Este grupo y géneros relacionados son tolerantes a altas concentraciones de sal y altos niveles de azúcar, estos microorganismos son los principales causantes de deterioro en alimentos como la miel, frutos frescos y mermeladas; su crecimiento es lento, producen malos olores y sabores, además la producción de dióxido de carbono hace que los embaces que contienen a los alimentos se hinchen y revienten (Rawat, 2015).

4.11.2. *Debaryomyces hansenii*.

Se desarrolla en concentraciones de sal de hasta 24%, lo que permite que las salmueras utilizadas para embutidos, quesos y aceitunas sean un ambiente idóneo para el crecimiento.

También hace parte de los microorganismos más importantes en la descomposición del aderezo para ensaladas (Rawat, 2015).

4.11.3. *Saccharomyces spp.*

Este grupo es reconocido en la elaboración de alimentos (pan y vino), hay que tener en cuenta que también existen cepas que deterioran dichos alimentos mediante la producción de gases, turbidez y sabores no agradables que se encuentran asociado a sulfuro de hidrogeno y ácido acético. Estas especies pueden crecer en las frutas y algunas son resistentes a tratamientos térmicos (Rawat, 2015; Jay, 1994 citado por Petrenko, 2004).

4.11.4. *Candida.*

Es un grupo heterogéneo de levaduras que generan deterioro de las frutas, algunas verduras y productos lácteos. Además está asociado con infecciones en el humano (Casey y Dobson., 2003 citado por Rawat, 2015; Petrenko, 2004).

4.11.5. *Dekkera / Brettanomyces.*

Son causante del deterioro de alimentos fermentados incluyendo bebidas alcohólicas y productos lácteos. Pueden producir compuestos fenólicos volátiles responsables de malos sabores (Couto, Neves, Campos y Hogg., 2005 citado por Rawat, 2015; Wedral, Shewfelt y Frank., 2010; Suárez, Suárez-Lepe, Morata y Calderón., 2007; Loureiro y Malfeito-Ferreira., 2003).

4.12. CARACTERISTICAS FENOTIPICAS.

Son métodos clásicos de identificación basados en las relaciones filogenéticas en función de similitudes entre una serie de caracteres expresados por las cepas estudiadas. El estudio de estas propiedades tienen gran validez predictiva y representan una pequeña parte de la información genética en donde su expresión está condicionada por los factores ambientales (Amarocho, 2011). Este tipo de estudio comprende la caracterización cultural, morfológica, fisiológica y bioquímica (Amarocho, 2011; Bou, Fernández, García, Sáez y Valdezate, 2010).

En el proceso de identificación bacteriana tradicional, la experiencia del microbiólogo es fundamental para la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial, en función de la fiabilidad de las mismas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar, del origen del aislado bacteriano, así como del coste de las mismas (Bou et al., 2010).

Los laboratorios deben tener procedimientos normalizados que utilicen de forma secuencial o simultánea un conjunto de pruebas que permita la identificación de microorganismos a nivel de género y especie (Bou et al., 2010).

4.13. ANALISIS MICROBIOLÓGICO.

En la industria de los alimentos, el análisis microbiológico se convierte en una herramienta fundamental para el control de materias primas, procesos, productos y manipulación,

permitiendo establecer valores de contaminación biológica en estos, convirtiéndose en un análisis primordial durante todo el proceso (Alonso y Poveda., 2008).

El objetivo principal del análisis microbiológico es determinar el número total de microorganismos presentes en un alimento, se considera un indicador de las características higiénicas generales del alimento, es decir que no puede usarse como índice de presencia de microorganismos patógenos (Universidad Navarra, 2011; citado por Bernal y Castro, 2014).

Dependiendo de las diferentes especies de microorganismos analizados, se emplean medios de cultivos con características particulares (medio rico, medio limitado en nutrientes para medida de la flora no láctica de alimentos fermentados) y condiciones de incubación diferentes (mesófilos, psicrófilos, termófilos) (Universidad Navarra., 2011; citado por Bernal y Castro, 2014).

Para determinar la cantidad de microorganismos que se encuentran en una muestra se utiliza la técnica basada en el conteo de las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo (Camacho et al., 2009).

4.1.3.1. Crecimiento microbiano.

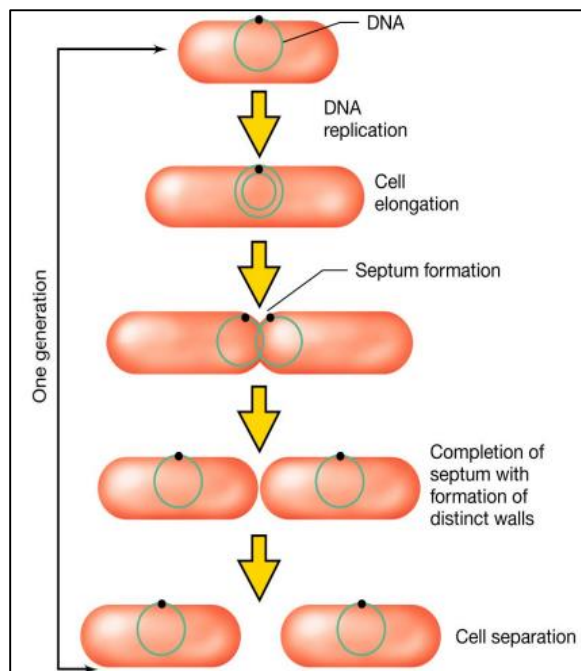


Figura 12: Proceso general de la fisión binaria en un procariota con forma de bacilo.

Fuente: Madigan et al., 2004.

El crecimiento microbiano hace referencia a un incremento en el número de células más que en el cambio de tamaño de las células individuales. El crecimiento de la mayoría de los microorganismos ocurre por fisión binaria (Figura. 12). La división celular y la replicación del cromosoma están reguladas de modo coordinado, y las proteínas Fts (Filamentous temperature sensitive) son claves en estos procesos (Madigan, Martinko y Parker., 2004)

4.1.3.2. Curva de crecimiento.

En un sistema cerrado o cultivo en medio no renovado, también conocido como cultivo monofásico, se obtiene una curva de crecimiento típica (Figura. 13). Esta curva de crecimiento puede dividirse en distintas fases llamadas fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. Las fases de la curva de crecimiento, corresponden a sucesos que ocurren en una población de células, no en células individuales o aisladas (Bernal y Castro., 2014).

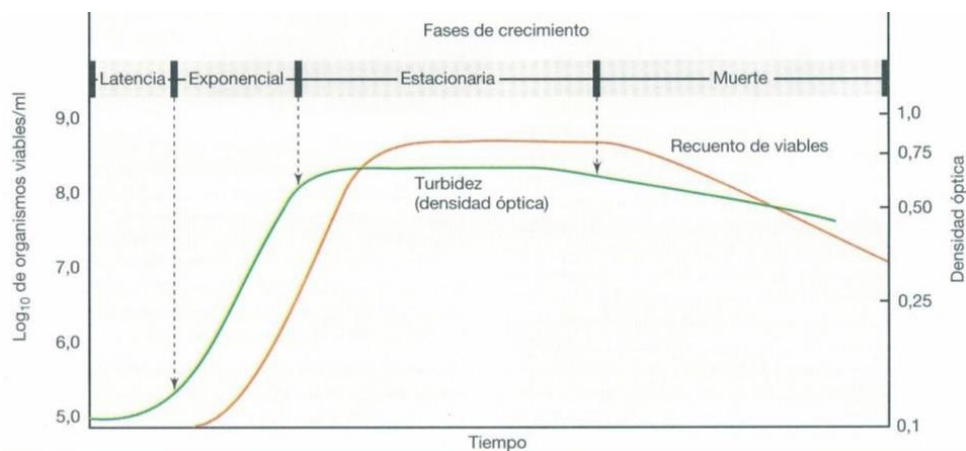


Figura 13: Curva de crecimiento de una población bacteriana.

Fuente: Madigan et al., 2004.

Fase de latencia.

Las bacterias transferidas de un cultivo en fase estacionaria a un medio fresco, sufren un cambio en su composición química antes de ser capaces de iniciar la multiplicación (Varela y Grotiuz., 2008).

Cuando se inocula una población microbiana en un medio fresco, por lo general el crecimiento no comienza inmediatamente sino sólo tras un periodo de tiempo que constituye la fase de latencia, la cual puede ser breve o larga dependiendo de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento (Madigan et al., 2004).

Es un tiempo en el que el microorganismo se está adaptando al medio de cultivo, ya que las células requieren de un equipamiento enzimático completo que permita la síntesis de metabolitos esenciales que no estén presentes en el medio. En el momento en el que cambian de medio, necesitan tiempo para la síntesis de nuevas enzimas (Bernal y Castro., 2014).

a) Fase exponencial.

También conocida como fase logarítmica, los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético, el tipo de medio y las condiciones dadas. La velocidad de crecimiento es constante durante esta fase; esto es, los microorganismos se duplican en número a intervalos regulares. El crecimiento exponencial es un crecimiento equilibrado, es decir, todos los componentes celulares se producen a una velocidad constante, unos respecto de otros (Prescott, Harley y Klein., 2004). Las células microbianas se encuentran en un estado fisiológico más sano, el cual es apropiado para estudios enzimáticos y estructurales (Madigan et al., 2004).

b) Fase estacionaria.

El crecimiento de la población cesa y la curva de crecimiento se vuelve horizontal. Este hecho puede ser el resultado del equilibrio entre la división y la muerte de las células, o que la población deja de dividirse aunque siga metabólicamente activa. El tamaño final de la población depende, de la disposición de nutrientes y otros factores, así como del tipo de microorganismo que se cultive (Prescott et al., 2004).

c) Fase de muerte.

Si la incubación continúa después de que la población haya alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero también pueden morir. Si ocurre esto último, se dice que la población está en fase de muerte. La curva de crecimiento muestra que la fase de muerte también es exponencial, no obstante, en la mayoría de los casos la velocidad de muerte celular es mucho más lenta que la de crecimiento exponencial (Madigan et al., 2004).

4.1.3.3. Recuento de células viables.

Las células viables son aquellas que dan lugar a descendencia por medio de la división celular (bipartición). Para determinar el número de células viables se utilizan los métodos como el recuento en placa o recuento de colonias, se basa en contar el número de células de la muestra que es capaz de formar colonias sobre un medio sólido adecuado. Indicando que mediante este procedimiento cada célula puede formar una colonia (Madigan et al., 2004).

Existe dos métodos para realizar recuento en placa para células viables: el método de extensión en placa y el método de vertido en placa (Figura. 14). En el método de extensión en placa un cierto volumen de cultivo diluido no superior a 0,1 ml, se extiende por la superficie de una placa con medio sólido utilizando un asa estéril de extensión. La placa se incuba después hasta que aparecen las colonias y se cuenta su número. En el método de vertido en placa o siembra en profundidad se pipetea un volumen conocido (normalmente 0,1-1,0 ml) de cultivo en una placa Petri estéril sobre la que se añade el medio con agar fundido y se mezcla todo con suaves movimientos circulares antes de que se solidifique, en

este método el organismo que se cuenta debe ser capaz de resistir la temperatura del agar fundido a 45°C (Madigan et al., 2004).

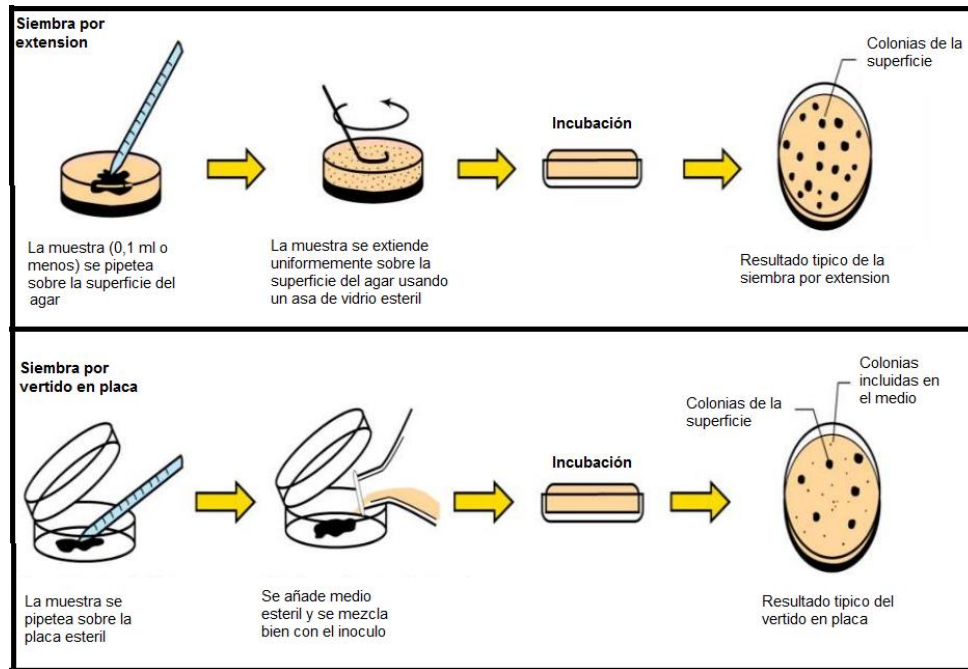


Figura 14: Método de siembra por extensión y Método de siembra por vertido en placa.

Fuente: Madigan et al. 2004.

Para obtener el número apropiado de colonias casi siempre se diluye la muestra, normalmente se hace más de una dilución. Por ejemplo, si se requiere una dilución de 10^{-6} se puede lograr haciendo tres diluciones sucesivas de 10^{-2} o seis sucesivas de 10^{-1} (Figura. 15) (Bernal y Castro., 2014).

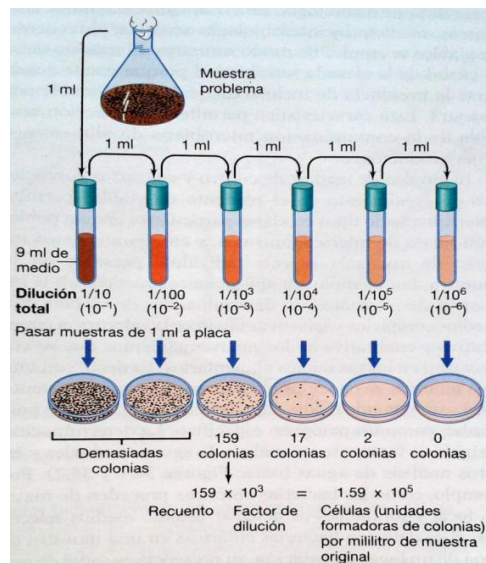


Figura 15: Determinación de células viables por diluciones seriadas y vertimiento en placa.

Fuente: Madigan et al. 2004.

4.14. ANÁLISIS DE CONTAMINACIÓN POR SUBPRODUCTOS EN LA ETAPA DE BENEFICIO.

En el beneficio de café convencional (beneficio húmedo) se requiere un flujo de agua continuo para el despulpado y transporte de la pulpa, este proceso tiene un consumo de 40 L de agua/Kg cps producido. Además la pulpa y mucilago se arrojan directamente a las fuentes hídricas (CENICAFÉ, 2016; CONtexto ganadero, 2014; Roa et al., 1999 citado por Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2011; Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2010; Rodríguez, 2009).

El proceso de fermentación natural para retirar el mucilago del café es el más utilizado en Colombia, dicho proceso produce 4 – 5 L agua residual/Kg cps, con una carga orgánica en términos de demanda química de oxígeno (DQO) cercana a 27000 ppm (Rodríguez, 2009). Solamente el 9,5% en peso del fruto maduro de café es utilizado en la preparación de la bebida, siendo el 90,5% restante agua y subproductos del proceso, de los cuales son pulpa y mucilago (Calle, 1977 citado por Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2011).

Los microorganismos encargados de consumir los azúcares y pectina del agua contaminada requiere oxígeno para las reacciones químicas necesarias para desintegrar la materia orgánica. La demanda bioquímica de oxígeno (DBO), representa la cantidad de oxígeno requerida para neutralizar completamente la contaminación, esta demanda para purificar las aguas residuales de café a menudo exceden el oxígeno disuelto en ríos y arroyos. Al presentarse esta situación, ocurre un efecto anaeróbico y producción de bacterias nocivas para la vida acuática, causando “zonas muertas” en los ríos similares a las generadas por aguas residuales sin tratar (SCAA, 2016).

En el beneficio ecológico se realiza despulpado y transporte de pulpa sin adición de agua, con un consumo de agua en el lavado del café de 5 L de agua /Kg cps y 0,3 - 5 L de agua/Kg cps usando desmucilaginosos mecánicos, se realiza tratamiento de aguas residuales, pulpa y lixiviados para la remoción de la carga orgánica contaminante (CENICAFÉ, 2016; CONtexto ganadero, 2014; Rodríguez, 2009). Los caficultores mediante desmucilaginosos mecánicos generan entre 0,5 – 0,6 L de agua residual/Kg de cps, con carga orgánica en términos de DBO cercana a las 110000 ppm (Ramírez, Oliveros y Sanz, 2015; Rodríguez, 2009).

Las limitantes de vertimientos en fuente hídricas procedente de los efluentes de beneficiaderos dada por legislaciones ambientales del país, ha permitido que se desarrolle sistemas que disminuyan la producción de desechos contaminantes, hasta el momento el beneficio ecológico de subproductos (BELCOSUB) integra todas las actividades nombradas anteriormente permitiendo un mayor control de la contaminación generada hasta el 90 % y el ECOMILL[®] que integra el proceso de fermentación natural debido a los requerimientos comerciales que controla la contaminación hasta 95 % (CENICAFÉ, 2016; Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2016; Ramírez et al., 2015; CONtexto ganadero, 2014).

Otros métodos utilizados que muestran los tratamientos realizados para mitigar el consumo y la contaminación del agua en la zona cafetera de Colombia es el canal de correteo con

consumo de 20 L de agua/kg de cps, el lavado en tanques de mayor tamaño con bombas sumergibles entre 6 y 9 L de agua/kg de cps y el lavado en tanque-tina con agitación manual 4,2 L de agua/kg de cps (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2016).

Se encontró que en el beneficio semi-seco con fermentación implementado presenta ventajas ambientales debido a que se suprime el lavado del grano comparado con los sistemas tradicionales implementados en las zonas cafeteras de Colombia. Además, dicho proceso de beneficio permite mantener rangos de calidad para el café dentro del intervalo de “Café especial”.

Según A,-K. Neu et al., 2016 durante el procesamiento de café la producción de residuos supera los 15 millones de toneladas por año; así la implementación de la fermentación semi-seca representa una alternativa valiosa para mitigar daños ambientales en las fuentes hídricas. Aunque se han encontrado diferencias en los atributos sensoriales en función del tipo de beneficio.

5. METODOLOGIA.

5.1. RECOLECCION DE MUESTRAS.

Las muestras se tomaron en el sur del departamento del Huila, en los municipios de Isnos, Palestina y Pitalito con las especificaciones mostradas en la Figura. 16. Teniendo en cuenta que el café cereza es de la misma jornada de recolección; se registraron en el sitio las condiciones del cultivo como temperatura (Hygro-Thrmometer BRIXCO), altitud (Datos suministrado por los productores) y humedad relativa (Hygro-Thrmometer BRIXCO). Se realizó un control riguroso de calidad en la recolección para la separación de impurezas (granos verdes, sobre maduros, con daños físicos, hojas, etc.). Finalmente se procedió a embalar las muestras en termos de icopor (poliestireno expandido) estériles (Figura. 17), adicionando geles refrigerantes para retardar la actividad microbiana durante el transporte hasta la facultad de ingeniería de la Universidad Surcolombiana en la ciudad de Neiva.

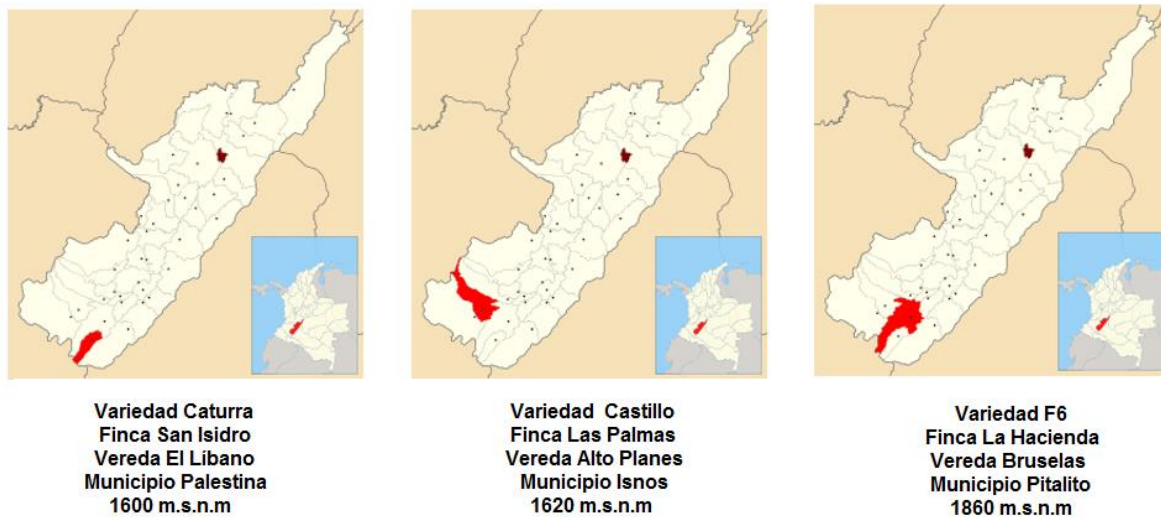


Figura 16: Ubicación de fincas donde se realizó el muestreo.

Fuente: Autor



Figura 17: Embalaje de muestras.

Fuente: Autor

5.2. DESPULPADO DE MUESTRAS.

Las muestras se procesaron en la planta piloto de beneficio de café del Centro Surcolombiano de Investigación en Café (CESURCAFÉ) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Surcolombiana – Neiva, con una despulpadora GAVIOTA 300 (300 kg/h) con zaranda cilíndrica en varillas para clasificación, con especificaciones de la Norma técnica Colombia 2090 (NTC 2090) (Figura. 18).



Figura 18: Despulpeo de muestras.

Fuente: Autor

5.3. FERMENTACION.

Se realizó en recipientes cerrados, con una capa de café despulpado de 11 cm de altura, en tiempos de fermentación con duración de 0, 12, 18, 24 y 30 horas por triplicado. Se llevó a cabo monitoreo de la temperatura superficial (Infrared Thermometer MASTERCOOL “World Class Quality” 52224-A), ambiente (Hygro-Thrmometer BRIXCO), pH (Potenciómetro OHAUS Starter 5000), sólidos solubles (Refractómetro ATAGO Palette PR-2010 (Brix 0-60%)) (Figura. 19).

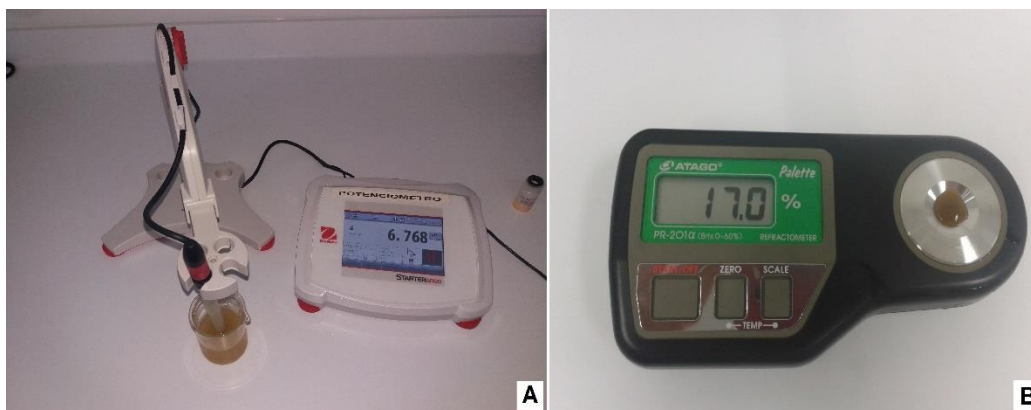


Figura 19: A). Medición de pH, B). Medición Grados Brix.

Fuente: Autor

5.4. ANALISIS MICROBIOLÓGICO.

5.4.1. Análisis microbiológico de BAL y Levaduras.

Finalizado el tiempo de fermentación establecido, se toman muestras en las 0, 12, 18, 24 y 30 horas, de mucilago para realizar diluciones seriadas, procediendo a homogenizar 10 ml de mucilago en 90 ml de MRS y agua de peptona respectivamente (Anexo A) (Anexo B); este procedimiento se realizó por triplicado (Figura. 20).

5.4.1.1. Siembra y recuento de BAL y levaduras.

Se realizó siembra en profundidad con agar MRS y agar YGC (Anexo A) (Anexo B) por triplicado, en la cabina de flujo laminar horizontal (DISEÑO INDUSTRIAL[®]) (Figura. 20c) y se llevó a incubación durante 48 horas a temperatura de 37 y 30 °C en la incubadora HERA THERM (Thermo SCIENTIFIC). Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el respectivo recuento e identificación morfológica de las unidades formadoras de colonia (UFC).



Figura 20: A). Toma de muestras. B). Preparación de diluciones. C). Siembra de alícuotas.
Fuente: Autor

5.4.2. Análisis microbiológico de hongos.

Posterior a la etapa de secado se tomó 100 granos de café pergamino seco (c.p.s) de forma aleatoria por muestra, se desinfecto con hipoclorito de sodio al 15 % (PISCICLOR[®]) se realizó lavado dos veces con agua destilada y finalmente se depositaron en la superficie de placas de Petri con agar PDA y Verde de Malaquita (Anexo A) (Anexo B).

5.4.2.1. Siembra de hongos.

Posterior a la desinfección se depositaron por placa 5 granos de café en la superficie de placas de Petri con medio de cultivo PDA con adición de Gentamicina 160 mg de laboratorio Genfar (Anexo A) (Anexo B), de igual forma se procedió con el medio de cultivo AVM (Anexo A) (Anexo B). Las placas de Petri se incubaron durante un intervalo de tiempo de 7 a 10 días a temperatura de 28 °C para asegurar su crecimiento (Figura. 21).

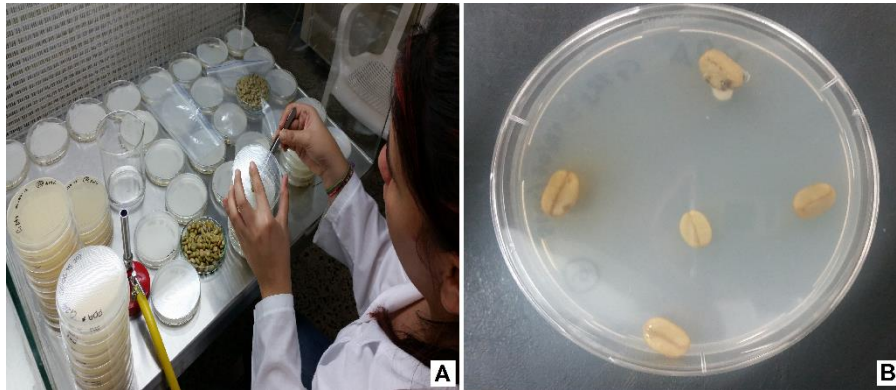


Figura 21: A). Siembra. B). Disposición de los granos de café.

Fuente: Autor

5.4.3. Aislamiento de microorganismos.

Posterior a la clasificación morfológica de las colonias, se realizó resiembra para la obtención de cultivos puros. Este procedimiento se realizó para las BAL, levaduras en masa y para los hongos por repiques, teniendo en cuenta los mismos tiempos de incubación y temperatura. La finalidad del aislamiento está dada para realizar la caracterización microscópica de dichos microorganismos por métodos de tinción de las células. Además las colonias aisladas se almacenaron en congelación a -20°C en criovial con crioperlas para la conservación “BAL, Levaduras y Hongos” (PROTEC™), en refrigeración a 4°C en tubos con agar y aceite mineral en pico de flauta para “BAL, Levaduras y Hongos” y agua destilada en tubos Eppendorf.

5.5. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.

Se realizó la identificación de forma macroscópica (BAL. Levaduras y hongos) y microscópica (BAL. Levaduras); para la observación a través del microscopio de BAL y levaduras presentes en los procesos de fermentación de café se emplearon técnicas que facilitaron la identificación, para ello se empleó la técnica de tinción Gram.

5.6. TINCIÓN DE GRAM.

En la cabina de flujo laminar horizontal y mediante una pinza se sostuvo el porta objeto previamente rotulado con el código de la colonia a identificar, se depositó una gota de agua destilada sobre el porta objeto, con una asa de platino previamente esterilizada con mechero al rojo vivo se tomó una pequeña porción la colonia aislada en la superficial y se depositó sobre la gota de agua.

Luego, se extendió y se dejó desecar, se fijó cada una de las muestras haciendo pases lentamente por el fuego desprendido por el mechero por tres veces, posteriormente se tiñó con violeta de genciana MOL LABS LTDA (ISO 9001:2008) dejando actuar durante 1 minuto, sin lavar se reemplazó el colorante por el reactivo lugol de Gram MOL LABS LTDA (ISO 9001:2008) dejándolo actuar por 1 minuto, se adiciono alcohol CIACOMEQ S.A.S. (Ethanol 96%) dejando actuar por 30 segundos. Se lavó con agua destilada y se tiñó con fucsina de Gram BiopharChem® (Bioquigen Advanced Chemical) durante 3 minutos, se lavó

con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se realizó la observación a través del microscopio manual OLYMPUS® CH-2 SERIES.

5.7. SECADO.

El café se escurrió por medio de un tamiz y se depositó en polisombra de área aproximada de un metro cuadrado (1 m²) (Figura. 22a), en una zona que proporcionara las condiciones idóneas de brillo solar necesario para el retiro de la humedad del grano (Figura. 22b), se sometió a secado solar en patio, hasta llegar a humedad entre el 10 y 12%, el contenido de humedad se registró con el medidor KETT PM – 450. El café después de despulpado se encuentra en una humedad entre el 50 y 55 % (USAID, 2005), por lo cual es necesario disminuir dicha humedad para menguar la actividad microbiana y proporcionar las condiciones recomendadas para almacenamiento, comercialización y procesado.



Figura 22: A). Tamizado. B). Extensión en polisombra para secado.

Fuente: Autor

5.8. ANALISIS FISICO.

El análisis físico del café pergamino seco y del café almendra se realizó bajo los estándares de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia para la comercialización de café pergamino seco y las normas técnicas colombianas 2323; 2324; 3566 (NTC 2323; NTC 2324; NTC 3566).

Según las normas establecidas para el análisis físico de café, se procedió de la siguiente manera: Posterior al secado, se determinara el contenido de humedad con el equipo marca KETT PM-450 asegurando un rango de contenido de humedad entre 10 % y 12 %, se realizó la homogenización de cada muestra mediante el equipo tipo Boerner, se tomaron 250 gramos de c.p.s., el cual se trillo con el equipo de trillado de muestras ING-C-200, luego se realizó el pesado de la almendra en la balanza digital OHAUS Scout Pro 2000g . Posteriormente, se llevó a una zaranda eléctrica ING-Z-TAMIZ-E, se hizo la clasificación de defectos con el respectivo registro de la masa para la obtención del factor de rendimiento, porcentaje de merma, porcentaje de pasilla y porcentaje de broca (Figura. 23).

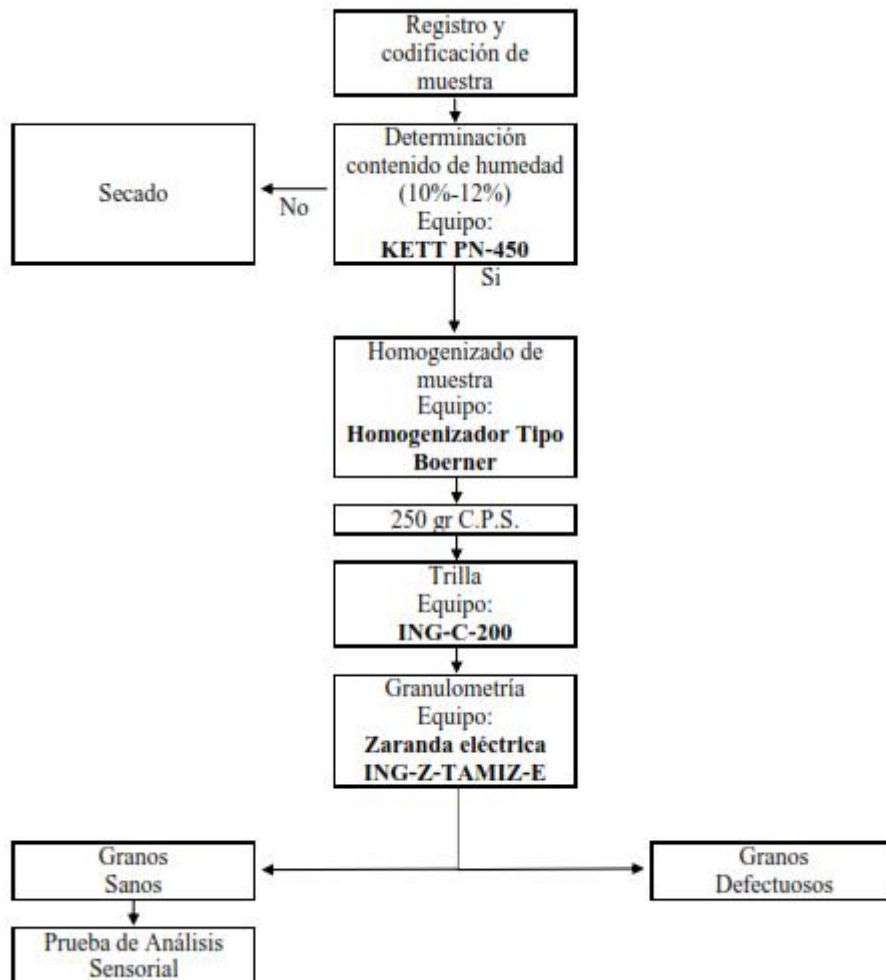


Figura 23: Procedimiento en laboratorio para análisis físico de café pergamino.
Fuente: Autor

5.9. ANALISIS SENSORIAL.

El análisis sensorial se realizó en Centro Surcolombiano de Investigación en Café (CESURCAFE), por medio de un panel conformado por cuatro evaluadores entrenados en dos secciones de catación; siguiendo el protocolo de la Asociación de Cafés Especiales de América, por sus siglas en inglés SCAA (Barrera, 2014; Peña, 2013) y siguiendo los parámetros establecidos por las normas técnicas colombianas 2758 y 3566 (NTC 2758; NTC 3566).

Las pruebas sensoriales se realizan para determinar las diferencias sensoriales entre muestras, describir el sabor de las muestras y finalmente determinar la preferencia de los productos (SCAA, 2015). El panel de evaluadores debe estar conformados por personas idóneas, capacitadas, expertas y que utilicen métodos estandarizados y conocidos; con buena salud, hábitos de vida saludable y alto grado de disciplina (Puerta, 2009).

6. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1. Caracterización materia prima.

En la Tabla 1 se observa las características iniciales de las muestras de café estudiadas, mostrando que el pH inicial de las muestras de café en baba antes de la fermentación pueden catalogarse como ligeramente ácidos, coincidiendo con (Cordoba-Castro y Guerrero-Fajardo, 2016), puesto que se ubicó en un rango de 4.60, 4,43 y 3,80 para las variedades estudiadas. Según el análisis de varianza mostrado en la Figura 24, no existen diferencias significativas en cada muestra entre tiempos de fermentación.

Tabla 1: Comportamiento de °Brix y pH en Tiempos de Fermentación

			Tiempos de Fermentación (horas)				
			0	12	18	24	30
Variedad	Caturra (C ₁)	pH	4,60 ± 0,05	4,19 ± 0,01	3,95 ± 0,04	3,97 ± 0,02	3,97 ± 0,00
		°Brix	13,20 ± 0,20	12,53 ± 0,70	12,43 ± 0,72	12,03 ± 0,85	12,10 ± 0,00
	F6 (C ₂)	pH	4,43 ± 0,18	3,97 ± 0,08	3,79 ± 0,16	3,54 ± 0,03	3,54 ± 0,10
		°Brix	16,50 ± 0,44	17,20 ± 0,30	17,33 ± 0,06	15,80 ± 0,50	15,63 ± 0,15
	Castillo (C ₃)	pH	3,80 ± 0,06	3,72 ± 0,05	3,80 ± 0,04	3,87 ± 0,01	3,87 ± 0,03
		°Brix	11,47 ± 0,29	14,67 ± 1,02	15,43 ± 0,21	15,73 ± 0,15	15,10 ± 0,79

Además como se observa en la Tabla 1 y Figura 24 existe una leve disminución en el pH a través del tiempo, dado por la acidificación que se da por los microorganismos responsables de la fermentación.

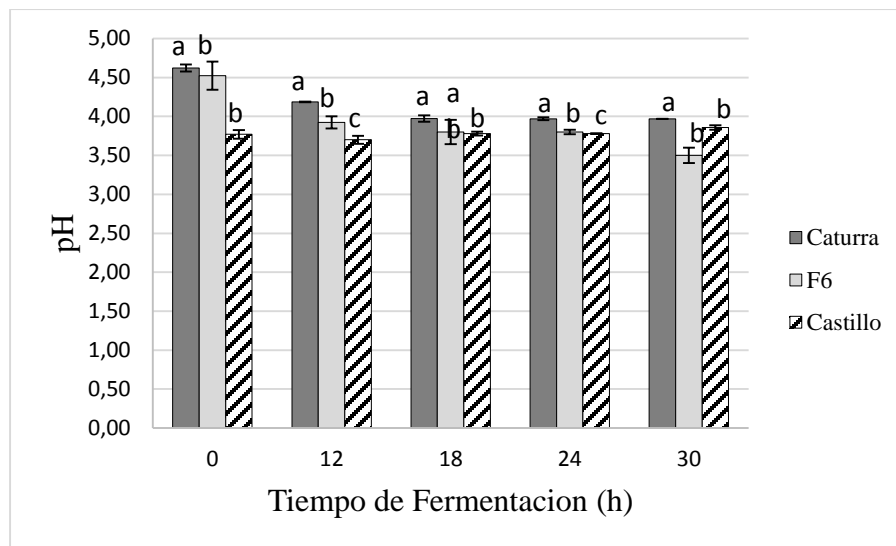


Figura 24: Comportamiento pH en el tiempo. Barras con letras diferentes por tiempo de fermentación tienen diferencias estadísticamente significativas. Método HSD de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fuente: Autor

Según el análisis de varianza realizado para °Brix, en la Figura 25 se observa diferencia estadísticamente significativas en función de la cantidad de solidos solubles presentes inicialmente en el fruto de las tres variedades estudiadas, la cual tiene una tendencia a mantenerse durante las 18 h de fermentación.

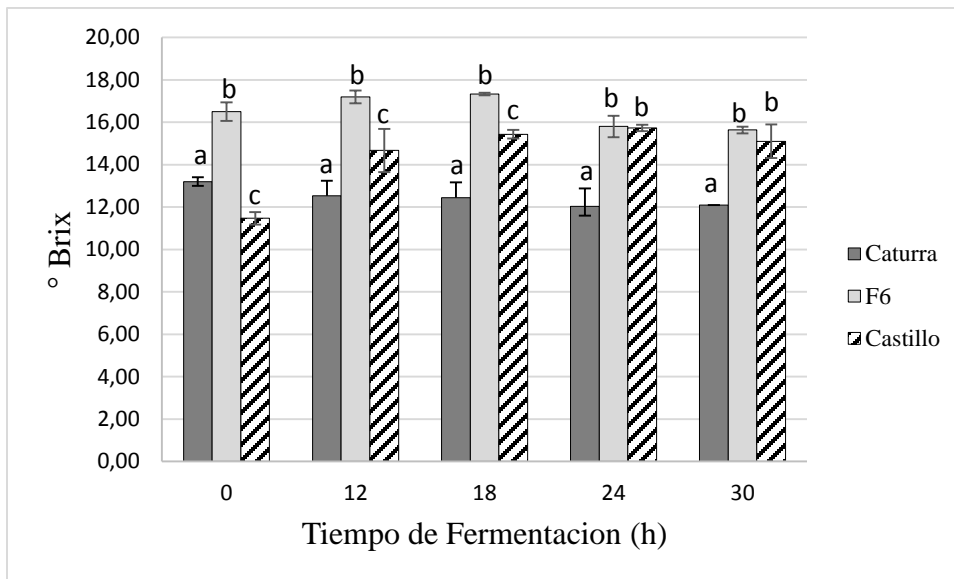


Figura 25: Comportamiento de Solidos solubles (°Brix) en el tiempo. Barras con letras diferentes por tiempo de fermentación tienen diferencias estadísticamente significativas. Método HSD de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fuente: Autor

6.2. Análisis microbiológico.

En la Figura 26 y Tabla 2 se muestra la codificación utilizada para la caracterización de las colonias analizadas en el proyecto, esta codificación está dada para facilitar la recolección de datos durante el desarrollo del estudio microbiológico en BAL, Levaduras y hongos.

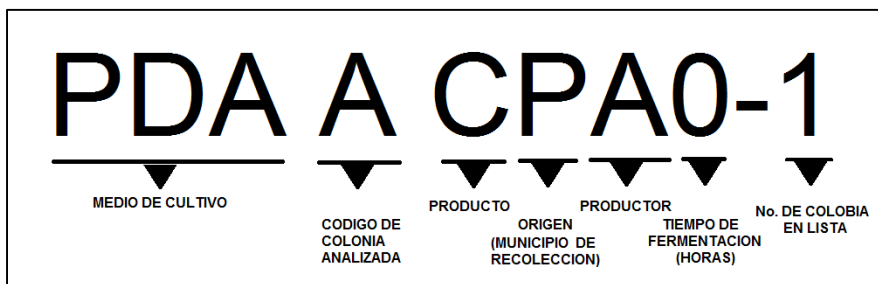


Figura 26: Codificación utilizada para la caracterización de las colonias para BAL, Levaduras y hongos.

Fuente: Autor

Tabla 2: Códigos de muestras.

Medio de Cultivo	Variedad	Codificación
MRS	Caturra	CPA
	F6	CIJ
	Castillo	CBS
YGC	Caturra	CPA
	F6	CIJ
	Castillo	CBS
PDA	Caturra	CPA
	F6	CIJ
	Castillo	CBS
PDA	Caturra	CPA
	F6	CIJ
	Castillo	CBS

6.2.1. Análisis microbiológico de BAL.

En la Figura 27 se observa las medias del crecimiento de BAL Log UFC/g en función de la variedad para el tiempo de fermentación 0 horas, se muestra que mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% se obtuvo diferencia estadísticamente significativas entre la variedad F6 con respecto a la variedad Castillo y Caturra.

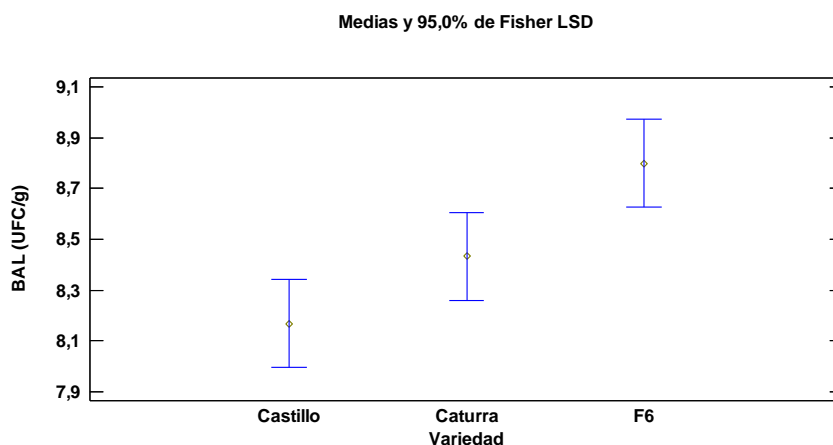


Figura 27: Medias de crecimiento de BAL para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 0 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.

Fuente: Autor

En la Figura 28 se observa las medias del crecimiento de BAL Log UFC/g en función de la variedad para el tiempo de fermentación 12 horas, se muestra que mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% no hubo diferencia estadísticamente significativas entre las variedades estudiadas.

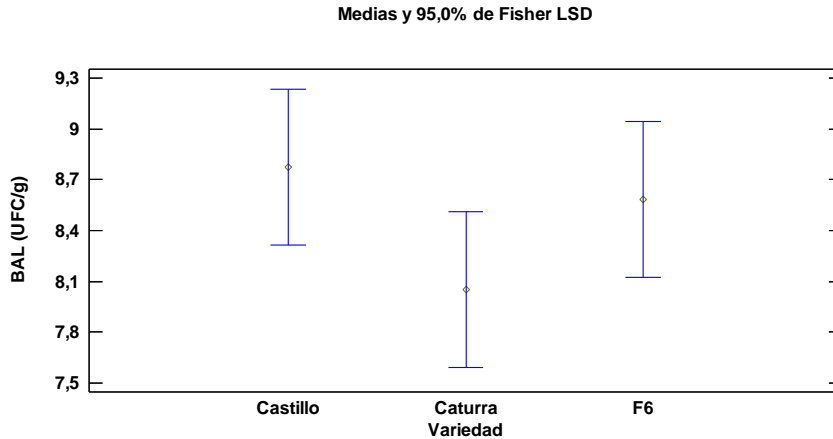


Figura 28: Medias de crecimiento de BAL para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 12 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.

Fuente: Autor

En la Figura 29 se observa las medias del crecimiento de BAL Log UFC/g en función de la variedad para el tiempo de fermentación 18 horas, se muestra que mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% no hubo diferencia estadísticamente significativas entre las variedades estudiadas.

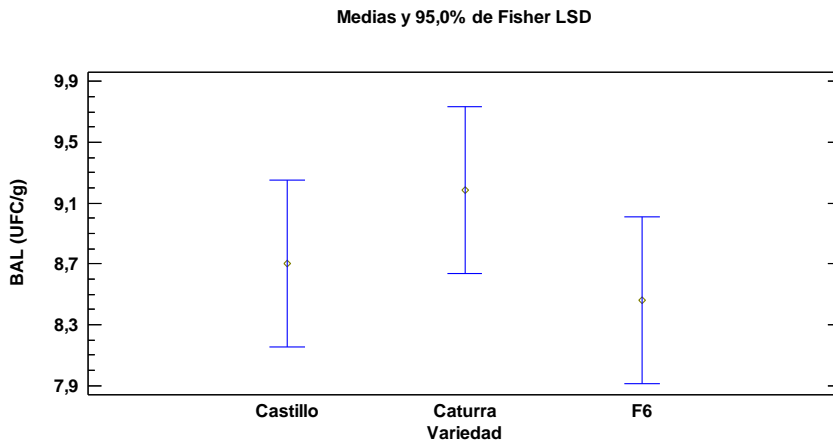


Figura 29: Medias de crecimiento de BAL para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 18 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.

Fuente: Autor

En la Figura 30 se observa las medias del crecimiento de BAL Log UFC/g en función de la variedad para el tiempo de fermentación 24 horas, se muestra que mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% se obtuvo diferencia estadísticamente significativas entre la variedad Caturra con respecto a la variedad Castillo y F6.

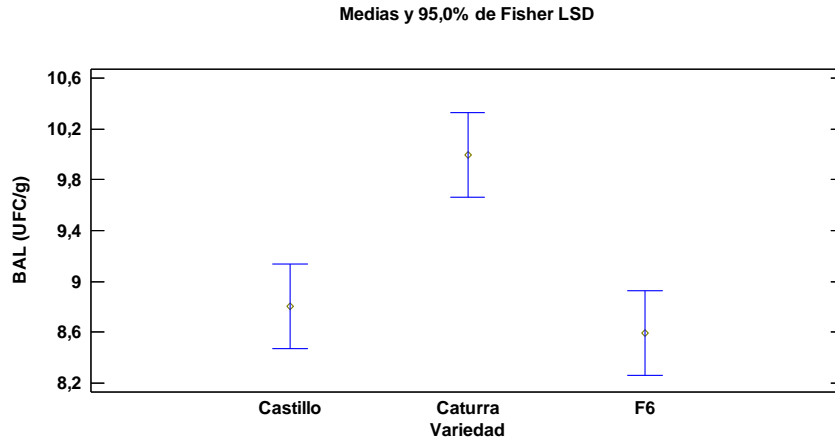


Figura 30: Medias de crecimiento de BAL para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 24 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.

Fuente: Autor

En la Figura 31 se observa las medias del crecimiento de BAL Log UFC/g en función de la variedad para el tiempo de fermentación 30 horas, se muestra que mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% se obtuvo diferencia estadísticamente significativas entre todas las variedades estudiadas.

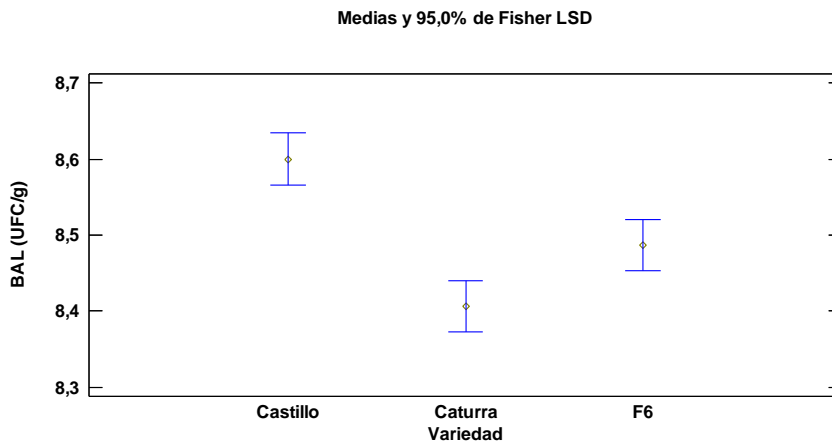


Figura 31: Medias de crecimiento de BAL para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 30 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.

Fuente: Autor

Teniendo en cuenta el crecimiento de las BAL, se analizó el comportamiento medido en logaritmo en base 10 de las unidades formadoras de colonia por gramo (Log_{10} UFC/g); en la Figura 32 se observa el comportamiento del crecimiento de las BAL durante el tiempo de fermentación en las tres variedades estudiadas.

La curva de crecimiento bacteriano representativa para la variedad Caturra muestra una fase de latencia en el intervalo de tiempo de 0 horas (8,43 UFC/g) a 12 horas (8,05 UFC/g), posterior a este tiempo se da la fase de crecimiento exponencial pasando por las 18 (9,18

UFC/g) horas hasta las 24 (10,00 UFC/g) horas teniendo un descenso en la hora 30 (8,41 UFC/g) de fermentación.

Entre la variedad F6 y Castillo presentan comportamientos similares en la curva de crecimiento bacteriano, a diferencia de las 0 horas de fermentación donde tiene valores de 8,80 y 8,17 UFC/g respectivamente, siendo mayor el crecimiento de colonia para la variedad F6; dicho comportamiento cambio durante las siguientes etapas de fermentación con tendencia a ser mayor el crecimiento bacteriano para la variedad Castillo.

El comportamiento de las curvas de crecimiento está relacionado directamente con el comportamiento de pH mostrado en la Tabla 1, donde se observa la disminución de la medida de este parámetro dado por la producción de ácidos orgánicos de los microorganismos presentes, concordando con Huch y Franz, 2015 quien dice que las BAL predominan y disminuyen el pH en la etapa de fermentación, evitando la proliferación de bacterias deteriorantes.

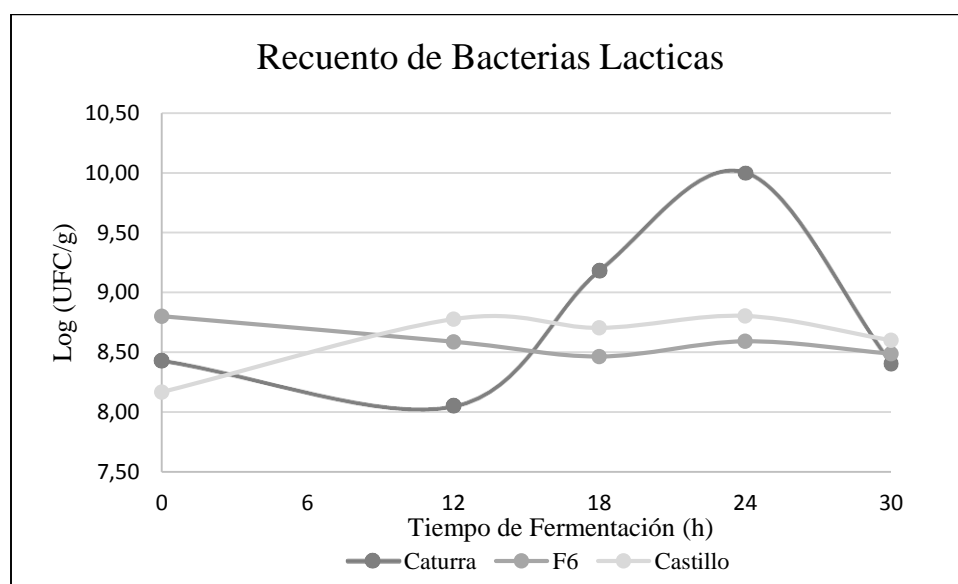


Figura 32: Crecimiento de BAL representadas en Log UFC/gr en función del tiempo de fermentación.

Fuente: Autor

6.2.1. Análisis microbiológico de Levaduras.

En la Figura 33 se observa las medias del crecimiento de Levaduras Log UFC/g en función de la variedad para el tiempo de fermentación 0 horas, se muestra que mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% se obtuvo diferencia estadísticamente significativas entre la variedad Caturra con respecto a la variedad Castillo y F6.

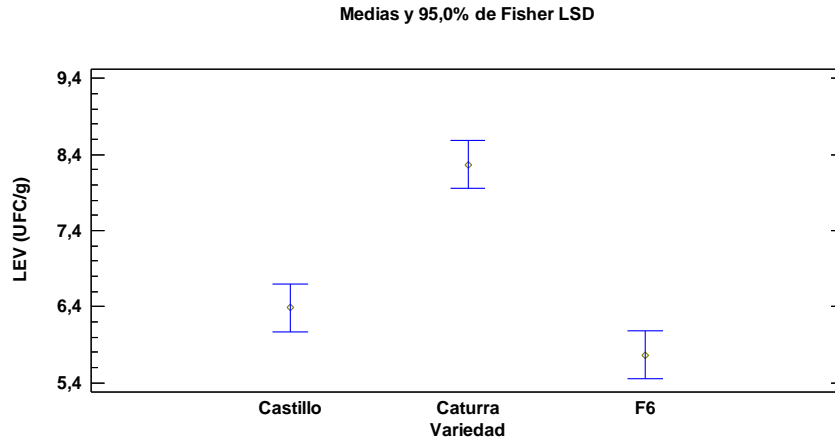


Figura 33: Medias de crecimiento de Levaduras para la variedad Caturra, F6 y Castillo para 0 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.

Fuente: Autor

En la Figura 34 se observa las medias del crecimiento de Levaduras Log UFC/g en función de la variedad para el tiempo de fermentación 12 horas, se muestra que mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% se obtuvo diferencia estadísticamente significativas entre la variedad Caturra con respecto a la variedad Castillo y F6.

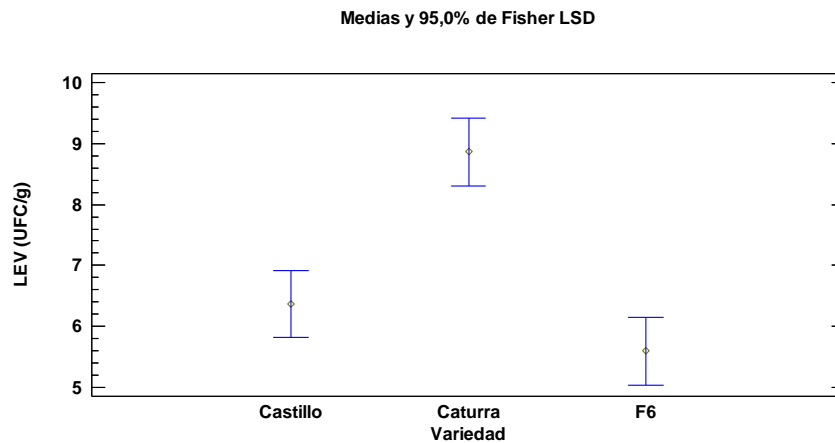


Figura 34: Medias de crecimiento de Levaduras para la variedad Caturra, F6 y Castillo para 12 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.

Fuente: Autor

En la Figura 35 se observa las medias del crecimiento de Levaduras Log UFC/g en función de la variedad para el tiempo de fermentación 18 horas, se muestra que mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% se obtuvo diferencia estadísticamente significativas entre todas las variedades estudiadas.

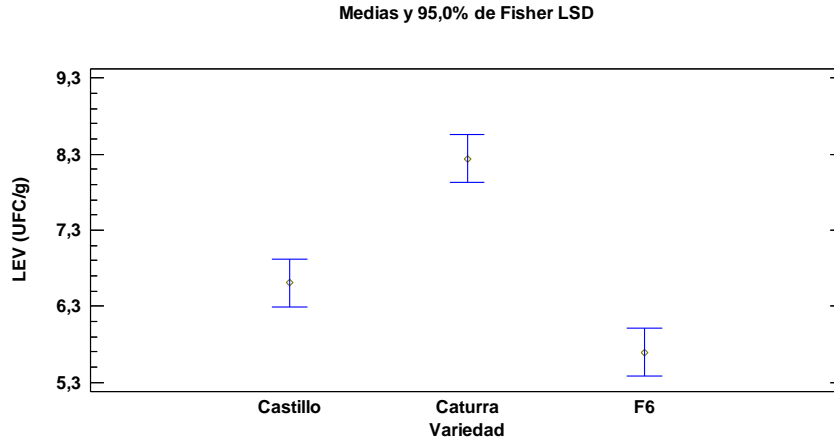


Figura 35: Medias de crecimiento de Levaduras para la variedad Caturra, F6 y Castillo para 18 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.

Fuente: Autor

En la Figura 36 se observa las medias del crecimiento de Levaduras Log UFC/g en función de la variedad para el tiempo de fermentación 24 horas, se muestra que mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% se obtuvo diferencia estadísticamente significativas entre la variedad Caturra con respecto a la variedad Castillo y F6.

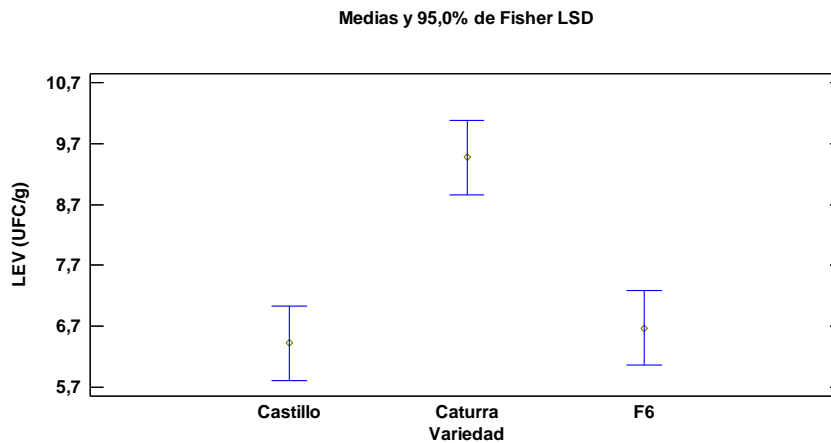


Figura 36: Medias de crecimiento de Levaduras para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 24 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.

Fuente: Autor

En la Figura 37 se observa las medias del crecimiento de Levaduras Log UFC/g en función de la variedad para el tiempo de fermentación 12 horas, se muestra que mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95% se obtuvo diferencia estadísticamente significativas entre la variedad Castillo con respecto a la variedad Caturra y F6.

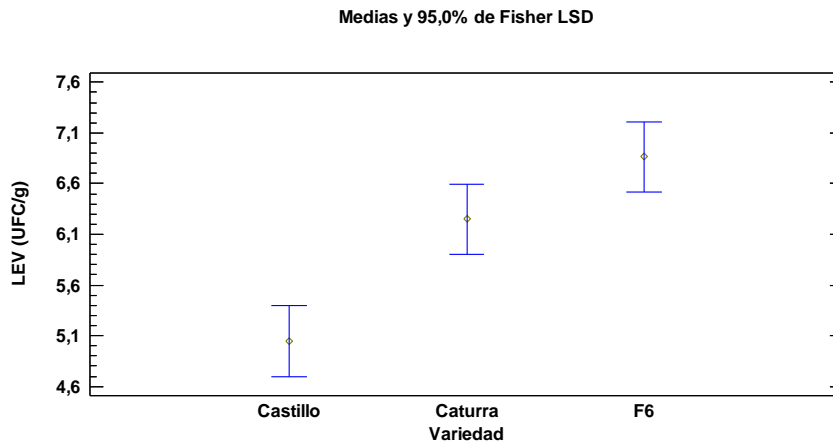


Figura 37: Medias de crecimiento de Levaduras para la variedad Caturra, F6 y Catillo para 30 horas de fermentación. Método Fisher LSD con nivel de confianza del 95%.

Fuente: Autor

Teniendo en cuenta el crecimiento de las levaduras, se analizó el comportamiento medido en logaritmo en base 10 de las unidades formadoras de colonia por gramo (Log_{10} UFC/g); en la Figura 38 se observa el comportamiento del crecimiento de las levaduras durante el tiempo de fermentación en las tres variedades estudiadas, la muestra de la variedad Caturra presenta el mayor crecimiento de UFC de levaduras en los primeros cuatro tiempos de fermentación comparado con el crecimiento de la variedad F6 y Castillo que tienen un comportamiento similar entre ellas, lo cual se corrobora con el comportamiento de las medias entre tiempo de fermentación mostrado en las Figuras 33, 34, 35 y 36; mediante la prueba de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%.

Al igual que las BAL, la curva de crecimiento bacteriano representativa de las levaduras para la variedad Caturra muestra una fase de latencia en el intervalo de tiempo de 0 (8,27 UFC/g), 12 (8,86 UFC/g) y 18 (8,24 UFC/g) horas, posterior a este tiempo se da la fase de crecimiento exponencial pasando por las 24 (9,47 UFC/g) horas, teniendo un descenso en la hora 30 (6,25 UFC/g) de fermentación, por otra parte es la variedad estudiada que presentó mayor actividad microbiana.

Entre la variedad F6 y Castillo la curva de crecimiento microbiano presentan comportamientos similares hasta las 18 horas de fermentación, manteniendo el mayor crecimiento de microorganismos la variedad Castillo; en las 24 horas de fermentación existe gran similitud como se observa en la Figura 36 de medias, aunque la Variedad F6 toma el lugar de mayor crecimiento (6,67 UFC/g para F6 y para 6,42 UFC/g Castillo) manteniéndose el aumento hasta el tiempo de finalización del estudio, mientras que el crecimiento de la variedad Castillo descende drásticamente en este tiempo (6,86 UFC/g para F6 y para 5,05 UFC/g Castillo).

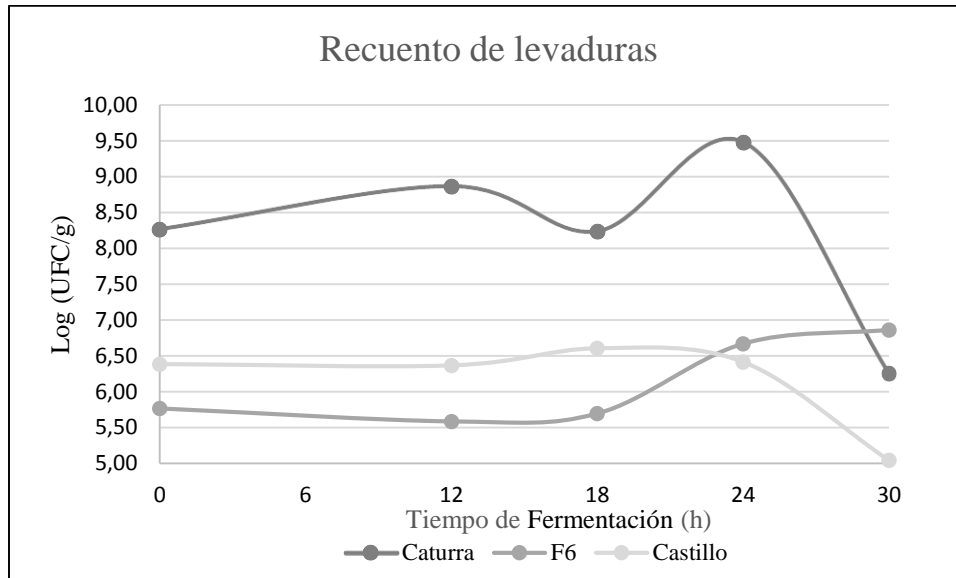


Figura 38: Crecimiento de Levaduras representadas en Log UFC/gr en función del tiempo de fermentación.

Fuente: Autor

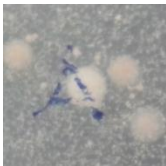

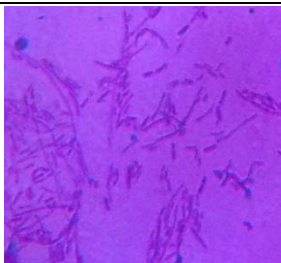
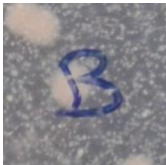
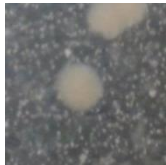
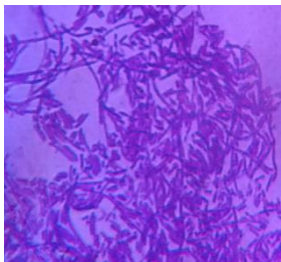

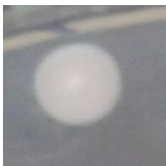
En las muestras estudiadas procedentes del sur del departamento del Huila se aislaron BAL, levaduras y hongos filamentosos; coincidiendo con la microbiota encontrado por Silva, Batista, Abreu, Dias y Schwan, 2008 citado por Huch y Franz, 2015.

Al observar el comportamiento de la microbiota de café en la Figura 32 y Figura 38, presenta mayor actividad la variedad Caturra en comparación con F6 y Castillo, dicho comportamiento esta dado en función de muchos parámetros según lo reportado por Huch & Franz, 2015, así como: la variedad de la planta, contenido de humedad del grano, método de beneficio, capacidad enzimática de las especies colonizadoras, actividad microbiana y factores ambientales. En este sentido, se considera que la variedad caturra al no estar modificada genéticamente, puede determinar el alto recuento de BAL y levaduras durante el proceso de fermentación hasta las 24 horas, en comparación con las variedades F6 y castillo.

6.2.3. Caracterización morfológica en placa y tinción Gram de las BAL y Levaduras.

En las tablas 3 y 4 se muestra la caracterización morfológica correspondiente a las BAL y levaduras en placa (macroscópica) y las respectivas tinciones (microscópica) obtenidas en el muestreo. Se pudo observar que las muestras de café analizadas (Caturra, F6 y Castillo) presentan microorganismos Gram-positivos con características correspondientes a bacilos, cocos, diplococos, ovaladas, elipsoidal y elipsoidal fusiforme.

Tabla 3: Caracterización morfológica en placa y tinción Gram de las BAL. Medio de cultivo Agar MRS

Caracterización	Descripción	Colonia y Tinción Gram	
	A = C₁Ø₁ – 3 MRS 06/06 /2015		
Caracterización macroscópica.	COLOR: Colonia blanca lechosa. DIAMETRO: 2 mm. FORMA: Formación circular definida.		
Caracterización microscópica.	MRS A = CPAØ – 1 TIPO DE CELULA: Células Gram positivas. FORMA: Bacilos de diferentes longitudes, no presentan ningún tipo de agrupación.		
	B = C₁Ø₁ – 3 MRS 06/06 /2015		
Caracterización macroscópica.	COLOR: Colonia amarillo lechosa. DIAMETRO: 2 mm. FORMA: Formación circular definida.		
Caracterización microscópica.	MRS B = CPAØ – 2 TIPO DE CELULA: Células Gram positivas. FORMA: Bacilos de diferente longitud, no presentan ningún tipo de agrupación definida. Cocos con presencia en agrupación de diplococos aislados.		
	C = C₁Ø₁ – 7 MRS 06/06 /2015		
Caracterización macroscópica.	COLOR: Colonia blanca lechosa. DIAMETRO: 3 mm. FORMA: Formación circular definida.		

Continuación de la Tabla 3: Caracterización morfológica en placa y tinción Gram de las BAL. Medio de cultivo Agar MRS

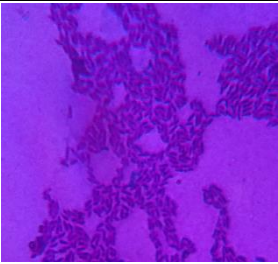
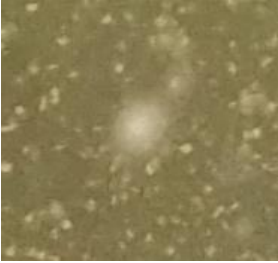
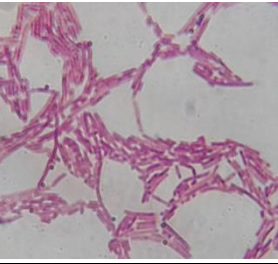

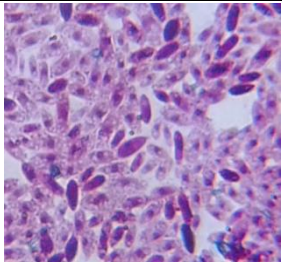
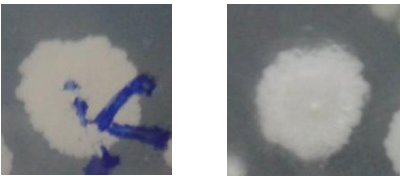
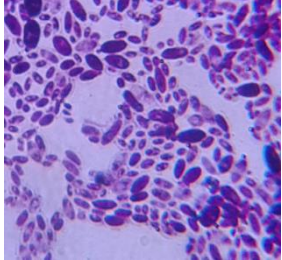
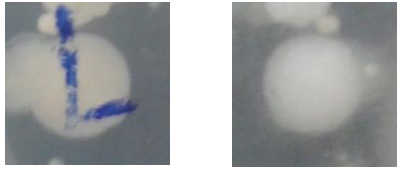
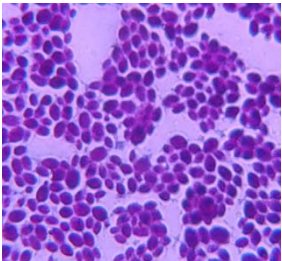
	MRS C = CPA\emptyset – 3	
Caracterización microscópica.	TIPO DE CELULA: Células Gram positivas. FORMA: Bacilos cortos con extremos lisos, no presentan ningún tipo de agrupación.	
	L = C₁30 – 7 MRS 10/06 /2015	
Caracterización macroscópica.	COLOR: Colonia blanca lechosa. DIAMETRO: 4.5 mm. FORMA: Formación circular definida.	
	MRS L = CPA30 – 1	
Caracterización microscópica.	TIPO DE CELULA: Células Gram positivas. FORMA: Bacilos de diversos tamaños, no presentan ningún tipo de agrupación.	

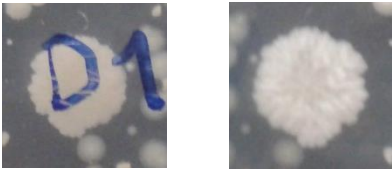
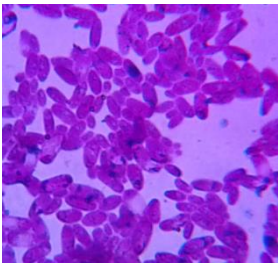
Tabla 4: Caracterización morfológica en placa y tinción Gram de las Levaduras. Medio de cultivo Agar YGC.

Caracterización	Descripción	Colonia y Tinción Gram
	A = C₁\emptyset₁ – 9 YGC 06/06 /2015	
Caracterización macroscópica.	COLOR: Colonia naranja – rosa. DIAMETRO: 8 mm. FORMA: Formación en anillos concéntricos en diferentes tonalidades rosa.	

Continuación de la Tabla 5: Caracterización morfológica en placa y tinción Gram de las Levaduras. Medio de cultivo Agar YGC.

Caracterización microscópica.	<p>YGC A = CPAØ – 1</p> <p>TIPO DE CELULA: Células Gram positivas. FORMA: Elipsoidal con extremos puntiagudos.</p>	
Caracterización macroscópica.	<p>K = C₁12₂ – 3 YGC 06/06 /2015</p> <p>COLOR: Colonia blanca lechosa. DIAMETRO: 5 mm. FORMA: Formación irregular en los bordes.</p>	
Caracterización microscópica.	<p>YGC K = CPA12 – 2</p> <p>TIPO DE CELULA: Células Gram positivas. FORMA: elipsoidal con extremos lisos, de diferentes tamaños.</p>	
Caracterización macroscópica.	<p>L = C₁12₂ – 3 YGC 06/06 /2015</p> <p>COLOR: Colonia blanca lechosa. DIAMETRO: 5 mm. FORMA: Formación circular.</p>	
Caracterización microscópica.	<p>YGC L = CPA12 – 1</p> <p>TIPO DE CELULA: Células Gram positivas. FORMA: elipsoidal con extremos lisos, algunas con bordes planos con apariencia de rombos y pentágonos.</p>	

Continuación de la Tabla 5: Caracterización morfológica en placa y tinción Gram de las Levaduras. Medio de cultivo Agar YGC.

	<i>D1 = C₁24₂ – 5 YGC 06/06</i> <i>/2015</i>	
Caracterización macroscópica.	COLOR: Colonia blanca lechosa. DIAMETRO: 4 mm. FORMA: Formación con bordes irregulares.	
Caracterización microscópica.	TIPO DE CELULA: Células Gram positivas. FORMA: Forma ovaladas con extremos lisos, otras con bordes rectos formando rombos, de diferentes tamaños.	

6.2.4. Caracterización morfológica en placa de hongos.

Desde la Figura 39 hasta la Figura 64 se muestra la caracterización morfológica macroscópica, correspondiente a hongos en placa encontrados en el café pergamino seco obtenido en el muestreo.

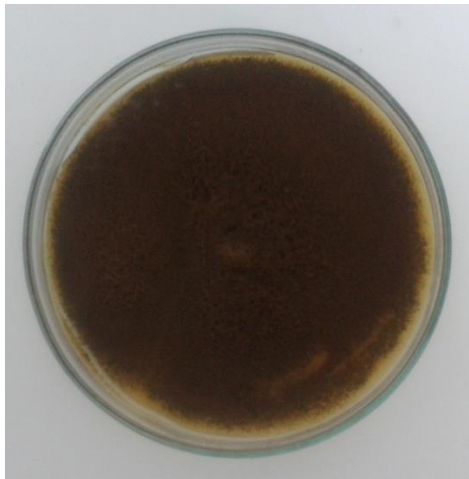


Figura 39: PDA J CPA18-7 Hongo polvoriento de color verde-amarillo en la parte central, degradado a negro hacia los bordes. Coloración en la parte inferior amarillo.

Fuente: Autor

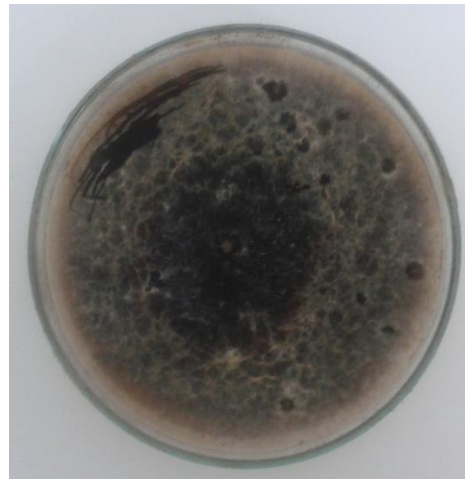


Figura 40: PDA Q CPA24-2 Hongo filamentoso de coloración blanco y negro, filamentos de color blanco. Coloración negro y café con apariencia concéntrica.

Fuente: Autor

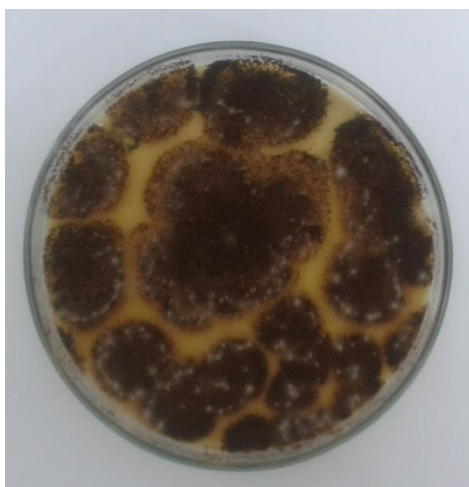


Figura 41: PDA R CPA24-3 Hongo algodonoso-polvoriento de cobertura seccionada, parte polvorienta de coloración café, parte algodonosa blanca con presencia de gotas sobre la cobertura. Coloración en la parte inferior ámbar.

Fuente: Autor



Figura 42: AVM D CPA18-2 Hongo esponjoso y polvoriento de coloración gris y negro. Coloración parte inferior negro y grisáceo.

Fuente: Autor



Figura 43: AVM G CPA18-4 Hongo polvoriento de color verde. Coloración parte inferior grisáceo y blanco- lechoso.
Fuente: Autor

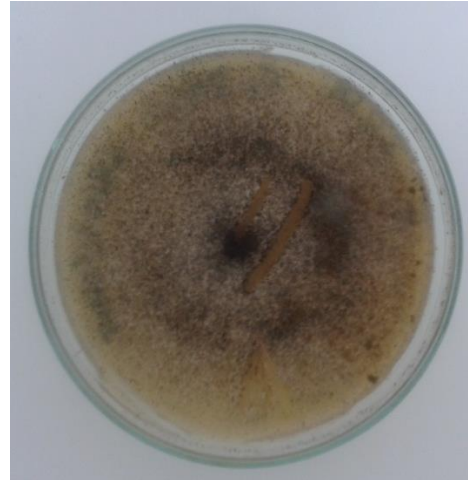


Figura 44: AVM K CPA24-3 Hongo polvoriento de color blanco y negro. Coloración parte inferior lechosa con puntos negros en donde se encuentra la zona polvoriento de la superficie.
Fuente: Autor

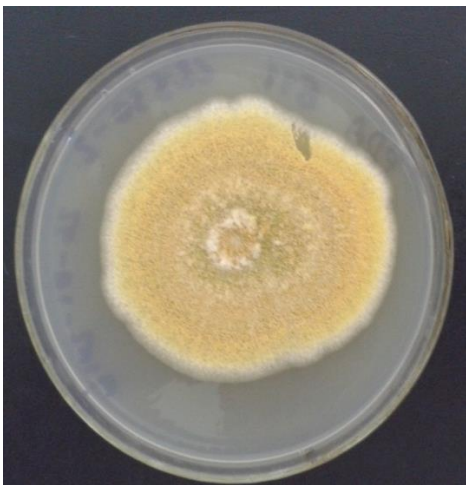


Figura 45: PDA E11 CIJ30-22 Hongo polvoriento de color verde degradado a amarillo lechoso en los bordes. Coloración parte inferior amarillo.
Fuente: Autor

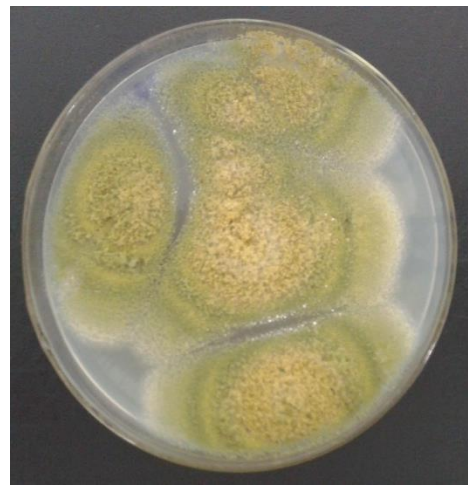


Figura 46: PDA A11 CIJ18-5 Hongo polvoriento-algodonoso de color verde. Coloración parte inferior gris.
Fuente: Autor



Figura 47. PDA C11 CIJ24-2 Hongo polvoriento de color gris degradado a azul-grisáceo en los bordes. Coloración inferior gris-lechoso.
Fuente: Autor



Figura 48: PDA H11 CJ30-5 Hongo polvoriento de color verde degradado a blanco-lechoso en los bordes. Coloración inferior amarillo.
Fuente: Autor



Figura 49: PDA F11 CIJ30-3 Hongo polvoriento de color negro con bordes blancos, apariencia de nervaduras radiales desde la parte central hacia los bordes. Coloración parte inferior blanco-lechoso con apariencia de nervaduras.
Fuente: Autor

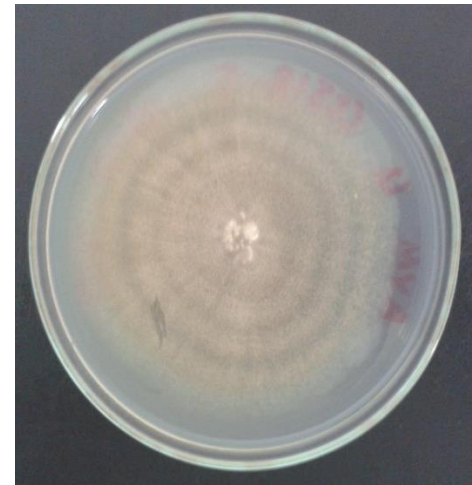


Figura 50: AVM U CIJ18-5 Hongo polvoriento de color gris degradado a azul-grisáceo en los bordes. Coloración inferior gris.
Fuente: Autor

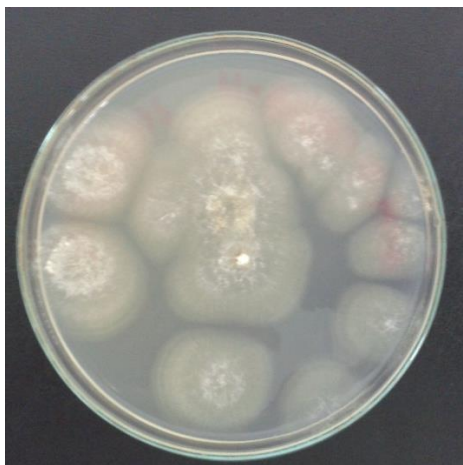


Figura 51: AVM T CIJ18-4 Hongo algodonoso-polvoriento de color verde-amarillo. Coloración inferior blanco-lechoso con dilataciones radiales de color gris.

Fuente: Autor

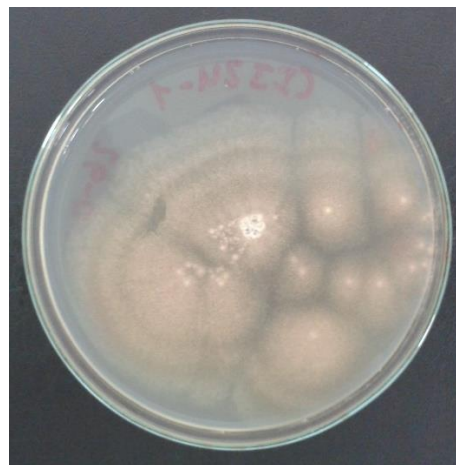


Figura 52: AVM V CIJ24-1 Hongo polvoriento de color gris. Parte inferior coloración gris.

Fuente: Autor

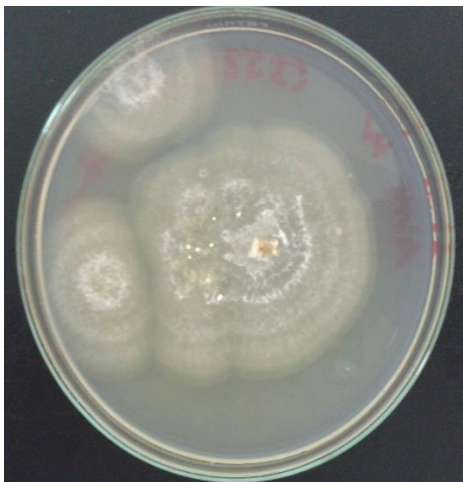


Figura 53: AVM W CIJ24-2. Hongo algodonoso-polvoriento, zona polvorienta de coloración verde y parte algodonosa de coloración blanca. Coloración parte inferior blanco-lechoso.

Fuente: Autor

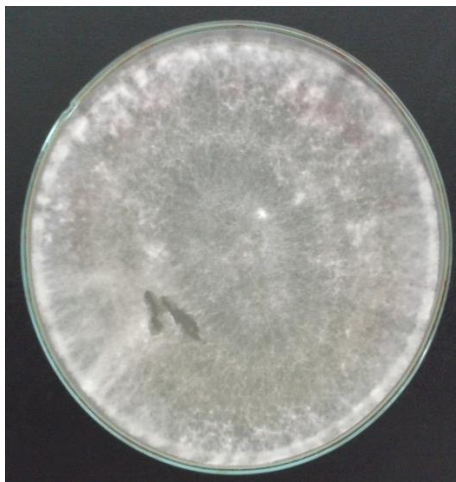


Figura 54: AVM Y CIJ30-2 Hongo algodonoso de color blanco. Coloración parte inferior café.

Fuente: Autor

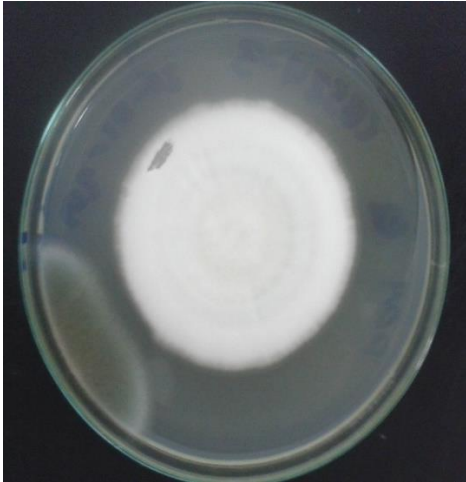


Figura 55: PDA Q CBS24-3 Hongo esponjoso de color blanco. Coloración parte inferior blanca
Fuente: Autor

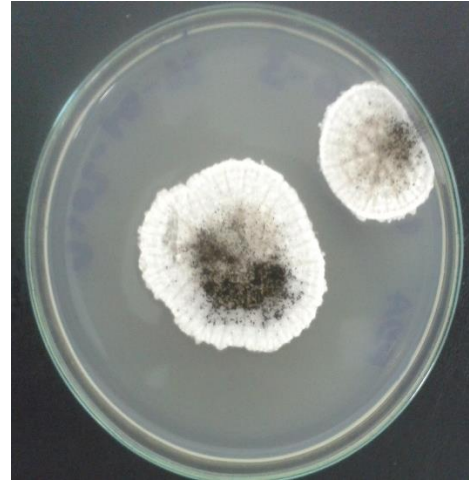


Figura 56: PDA U CBS30-3 Hongo polvoriento-algodonoso de color negro y blanco. Coloración de parte inferior gris-lechoso.
Fuente: Autor

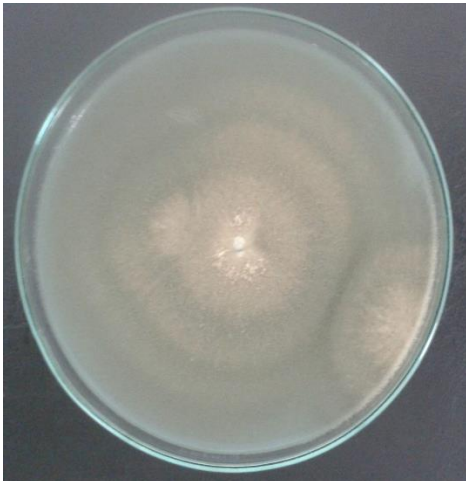


Figura 57: PDA S CBS30-1 Hongo polvoriento de color gris. Coloración parte inferior gris-lechoso.
Fuente: Autor

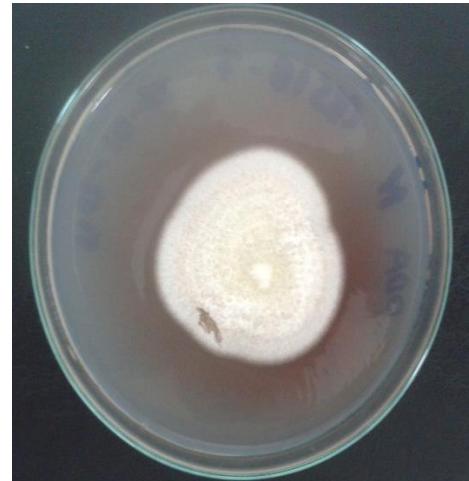


Figura 58: PDA N CBS18-7 Hongo algodónoso de color blanco. Coloración parte inferior amarillo.
Fuente: Autor

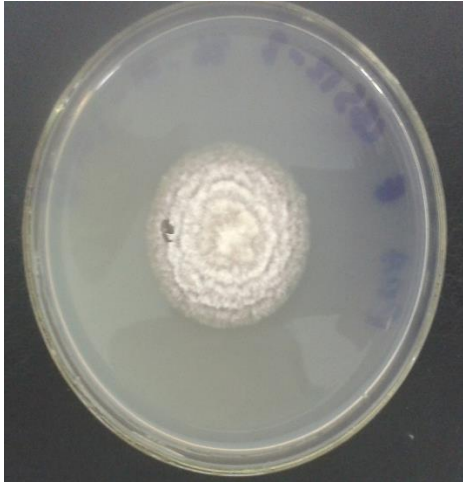


Figura 59: PDA E CBS12-2 Hongo filamentoso de apariencia concéntrica de color café en el centro, degradado a gris en bordes. Parte inferior con apariencia concéntrica de coloración gris-lechoso.

Fuente: Autor

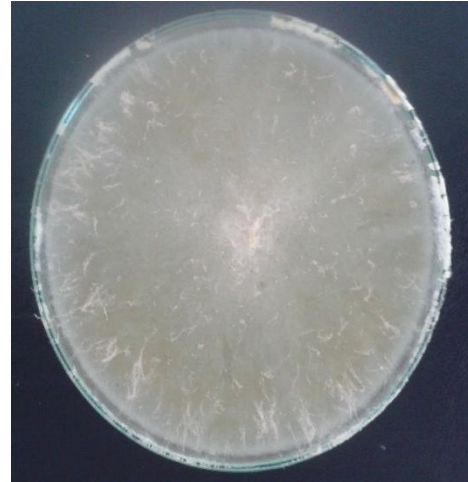


Figura 60: PDA O CBS24-1 Hongo filamentoso de color naranja. Coloración parte inferior naranja-lechoso.

Fuente: Autor



Figura 61: PDA M CBS18-6 Hongo polvoriento de color negro con base de coloración amarilla. Coloración parte inferior amarillo-lechoso con apariencia concéntrica.

Fuente: Autor

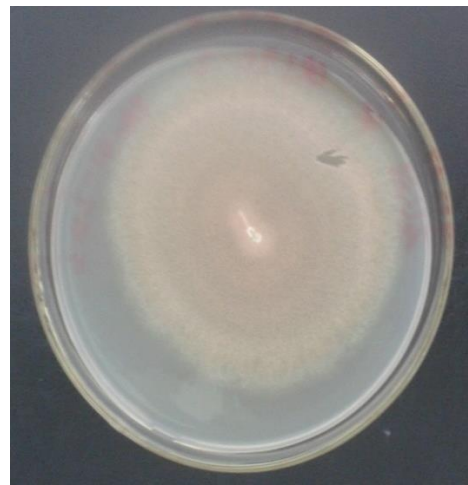


Figura 62: AVM K CBS30-2 Hongo polvoriento de color gris. Coloración parte inferior gris-lechoso.

Fuente: Autor

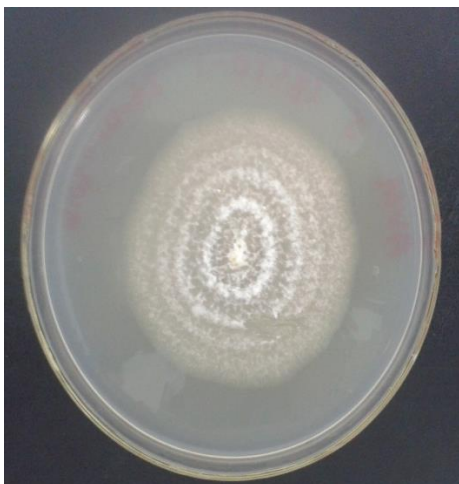


Figura 63: AVM J CBS30-1 Hongo algodonoso-polvoriento de coloración blanco-amarilliso. Coloración de la parte inferior blanco-lechoso.

Fuente: Autor

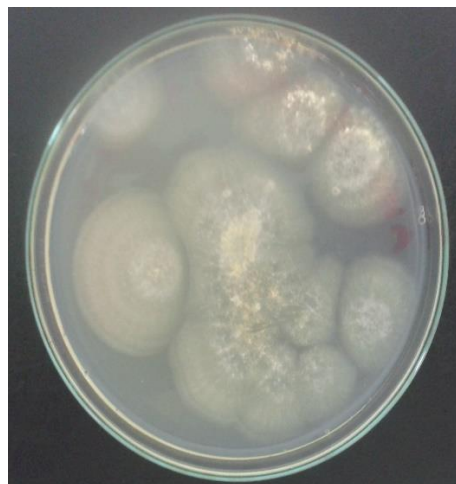


Figura 64: AVM A CBS0-1 Hongo algodonoso de color amarillo en la parte central, degradado a blanco en los bordes. Coloración parte inferior blanco-lechoso.

Fuente: Autor

6.3. Colección de microorganismos en conservación para posteriores investigaciones.

En la Tabla 5 se muestran microorganismos (BAL, Levaduras y Hongos) viables para conservación, almacenados en congelación a -20°C en criovial con crioperlas para la conservación (PROTECTM), en refrigeración a 4°C en tubos con agar y aceite mineral en pico de flauta y agua destilada en tubos Eppendorf.

Tabla 5: Colección de microorganismos para conservación.

Colonia aislada	Medio de Cultivo	Microorganismo	Técnica de conservación	Temperatura de conservación ($^{\circ}\text{C}$)	Fecha de conservación
A CPA0-1	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
B CPA0-2	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
C CPA0-3	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
D CPA0-4	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
E CPA0-5	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
A CPA0-1	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
K CPA12-2	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
L CPA12-1	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
R CPA18-1	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
S CPA18-2	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
U CPA18-3	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
D1 CPA24-1	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
A CPA18-1	AVM	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
B CPA12-1	AVM	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
A CPA0-1	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
B CPA12-1	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
C CPA18-1	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
D CPA18-2	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
E CPA18-3	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
H CPA18-6	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
F CPA18-4	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
G CPA18-5	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
A CIJ0-1	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
E CIJ18-1	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
L CIJ30-1	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
A CIJ0-1	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016

Continuación de la Tabla 6. Colección de microorganismos para conservación.

R CIJ0-6	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
I CIJ12-5	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
N CIJ 18-1	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
W CIJ18-7	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
Z CIJ24-3	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
P CIJ30-2	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
U CIJ18-5	AVM	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
J CIJ30-1	AVM	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
Y CIJ30-2	AVM	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
E11 CIJ30-2	AVM	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
B CBS 12-1	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
E CBS18-1	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
F CBS18-2	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
G CBS18-3	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
H CBS18-4	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
J CBS24-1	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
K CBS24-2	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
L CBS24-3	MRS	BAL	Criovial	-20	24-06-2016
D CBS0-3	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
F CBS12-2	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
I CBS18-3	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
K CBS18-5	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
J CBS18-4	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
M CBS24-2	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
Ñ CBS24-4	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
P CBS30-2	YGC	LEVADURAS	Criovial	-20	24-06-2016
B CBS0-2	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
H CBS18-1	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
N CBS18-7	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
Ñ CBS18-8	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
O CBS24-1	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
Q CBS24-3	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
R CBS24-4	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
S CBS30-1	PDA	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
C CBS12-2	AVM	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
K CBS30-2	AVM	HONGOS	Criovial	-20	24-06-2016
A CPA0-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
B CPA12-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
C CPA18-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
D CPA18-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
E CPA18-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
F CPA18.4	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
H CPA18-6	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
I CPA12-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
K CPA0-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
L CPA12-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
M CPA30-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
N CPA30-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
P CPA24-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
Q CPA24-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
R CPA24-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
S CPA18-8	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
T CPA24-4	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
U CPA12-4	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
V CPA24-5	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
W CPA12-5	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
A CPA18-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
B CPA12-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
C CPA24-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
D CPA18-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
E CPA18-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
G CPA18-4	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
H CPA12-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
I CPA24-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
J CPA18-5	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
K CPA24-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
L CPA12-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016

Continuación de la Tabla 6: Colección de microorganismos para conservación.

M CPA24-4	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
N CPA0-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
O CPA0-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
P CPA12-4	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
R CPA0-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
A1 CIJ0-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
A2 CIJ0-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
F1 CIJ0-6	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
F2 CIJ0-6	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
F3 CIJ0-6	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
H1 CIJ 0-8	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
H2 CIJ0-8	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
H3 CIJ0-8	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
I1 CIJ0-9	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
I1 CIJ0-10	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
I2 CIJ0-9	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
J2 CIJ0-10	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
L1 CIJ12-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
L2 CIJ12-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
L3 CIJ12-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
L4 CIJ12-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
M1 CIJ12-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
M2 CIJ12-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
M3 CIJ12-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
Ñ1 CIJ12-4	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
Ñ2 CIJ12-4	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
O2 CIJ12-5	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
O3 CIJ12-5	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
P1 CIJ12-6	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
P2 CIJ12-6	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
Q1 CIJ12-7	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
Q2 CIJ12-7	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
Q3 CIJ12-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
R1 CIJ12-8	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
R2 CIJ12-8	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
R3 CIJ12-8	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
T1 CIJ12-30	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
T2 CIJ12-10	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
T3 CIJ12-10	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
U2 CIJ12-11	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
U1 CIJ12-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
V1 CIJ18-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
V2 CIJ18-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
V3 CIJ18-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
W1 CIJ18-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
W2 CIJ18-8	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
Y1 CIJ18-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
Y2 CIJ18-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
A11 CIJ18-5	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
B11 CIJ24-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
C11 CIJ24-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
D11 CIJ30-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
E11 CIJ30-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
F11 CIJ30-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
G11 CIJ30-4	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
H11 CIJ30-8	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
I11 CIJ30-6	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
I1 CIJ12-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
I2 CIJ12-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
J1 CIJ12-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
J2 CIJ12-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
J3 CIJ12-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
K2 CIJ12-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
M1 CIJ12-5	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
M3 CIJ12-5	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
N3 CIJ12-6	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
Ñ2 CIJ12-7	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016

Continuación de la Tabla 6: Colección de microorganismos para conservación.

O1 CIJ12-8	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
O2 CIJ12-8	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
O3 CIJ12-8	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
P1 CIJ12-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
P2 CIJ12-9	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
P3 CIJ12-9	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
R1 CIJ18-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
S1 CIJ18-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
S2 CIJ18-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	21-01-2016
A CBS0-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
B CBS0-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
C CBS0-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
D CBS12-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
E CBS12-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
F CBS12-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
G CBS12-4	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
H CBS18-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
J CBS18-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
K CBS18-4	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
L CBS18-5	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
M CBS18-6	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
N CBS18-7	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
Ñ CBS18-8	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
O CBS24-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
P CBS24-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
Q CBS24-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
R CBS24-4	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
S CBS30-1	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
T CBS30-2	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
U CBS30-3	PDA	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
A CBS0-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
B CBS12-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
C CBS12-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
D CBS12-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
E CBS18-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
F CBS18-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
G CBS18-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
H CBS24-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
I CBS24-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
J CBS30-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
K CBS30-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
L CBS30-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
M CBS30-4	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
T CBS18-4	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
U CBS18-8	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
V CBS24-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
W CBS24-2	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
X CBS30-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
Y CBS24-1	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
Z CBS30-3	AVM	HONGOS	EPPENDORF	4	11-02-2016
A CPA0-1	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
B CPA12-1	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
C CPA 18-1	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
D CPA18-2	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
E CPA18-3	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
F CPA18-4	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
G CP18-5	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
H CPA18-6	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
I CPA12-2	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
J CPA18-7	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
K CPA0-2	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
L CPA12-3	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
M CPA30-1	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
N CPA30-2	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
P CPA24-1	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
Q CPA24-2	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
R CPA24-3	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015

Continuación de la Tabla 6: Colección de microorganismos para conservación.

S CPA18-8	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
T CPA24-4	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
U CPA12-4	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
V CPA4-5	PDA	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
A CPA18-1	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
B CPA 12-1	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
C CPA24-1	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
D CPA18-2	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
E CPA18-3	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
G CPA18-4	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
K CPA24-3	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
M CPA24-4	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
N CPA0-1	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
O CPA0-2	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
P CPA12-4	AVM	HONGOS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
B CPA12-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
C CPA12-2	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
E CPA12-5	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
F CPA12-3	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
I CPA0-2	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
J CPA0-3	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
L CPA30-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
M CPA12-4	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
N CPA12-7	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
O CPA12-6	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
Y CPA18-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
B1 CPA24-5	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
C1 CPA24-4	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
G1CPA24-3	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
H1 CPA24-2	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
II CPA24-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
G CPA0-2	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
L CPA30-1	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
K CPA24-1	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
Q CPA12-4	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	24-07-2015
A CIJ0-1	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
E CIJ18-1	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
L CIJ30-1	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
B CBS12-1	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
E CBS18-1	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
F CBS18-2	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
G CBS18-3	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
H CBS18-4	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
J CBS24-1	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
K CBS24-2	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
L CBS24-3	MRS	BAL	ACEITE MINERAL	4	14-12-2015
B CBS0-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
D CBS0-3	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
E CBS12-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
G CBS18-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
H CBS18-2	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
I CBS18-3	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
K CBS18-5	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
N CBS24-3	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
R CBS24-4	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
O CBS30-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
P CBS30-2	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
A CIJ0-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
E CIJ12-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
N CIJ18-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
I CIJ12-5	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
C CIJ0-3	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
W CIJ18-7	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
Z CIJ24-3	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
P CIJ0-2	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
U CIJ18-5	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
O CIJ30-1	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015

Continuación de la Tabla 6: Colección de microorganismos para conservación.

G CIJ12-3	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
S CIJ18-3	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
A1 CIJ24-4	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
R CIJ0-6	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
F CIJ12-2	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
C1 CIJ30-4	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
D1 CIJ30-5	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
V CIJ18-6	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
T CIJ18-4	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
J CIJ12-6	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
Q CIJ0-5	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
H CIJ12-4	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
Y CIJ24-2	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015
L CIJ12-8	YGC	LEVADURAS	ACEITE MINERAL	4	10-12-2015

6.4. Análisis sensorial.

En la Figura 65 se observan los resultados finales en taza en función de la variedad y el tiempo de fermentación; puede verse que en las variedades Castillo y F6 el puntaje en taza se mantuvo con valores entre 80.00 y 84.99 puntos, en el rango asignado para cafés especiales con categoría “muy buenos” según la SCAA, (2015); estos resultados se presentan en los intervalos de 0 a 30 h de fermentación, dichos resultados coinciden con lo reportado por Peña et al., (2013) y Evangelista et al., (2015). Por otra parte la variedad Caturra presenta esta misma calificación para los tiempos de fermentación de 0, 12 y 18 h, con un descenso en el puntaje de la taza después de las 24 h bajando la calificación por debajo de los 80.00 puntos, en el rango de los cafés de tipo “no especial”.

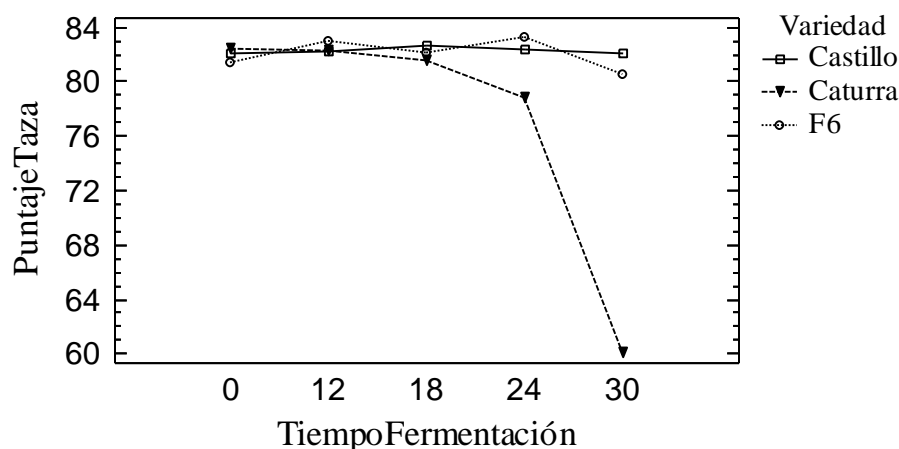


Figura 65: Interacción entre el puntaje de taza con respecto al tiempo de fermentación y la variedad.

Fuente: Autor

Además se encontró que las tres variedades sin tiempo de fermentación (0 h), alcanzaron calificaciones en taza en el rango de los denominados cafés especiales; cabe anotar que las muestras de grano pasan a la etapa de secado llevando adherido mucilago y por tanto, se da un proceso combinado de fermentación-secado; la fermentación se mantiene mientras el contenido de humedad, nutrientes y azúcares presentes están en las condiciones requeridas

por la microbiota existente permitiendo la generación de metabolitos que confieren al grano algunas características (Evangelista et al., 2015).

La Figura 66 presenta los resultados de la prueba de perfilación en taza para las tres variedades fermentadas hasta 30 horas, se observan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para todos los atributos evaluados en la fermentación con duración de 30 h, entre la variedad Caturra respecto a F6 y Castillo, coincidiendo con lo encontrado en la Figura 65.

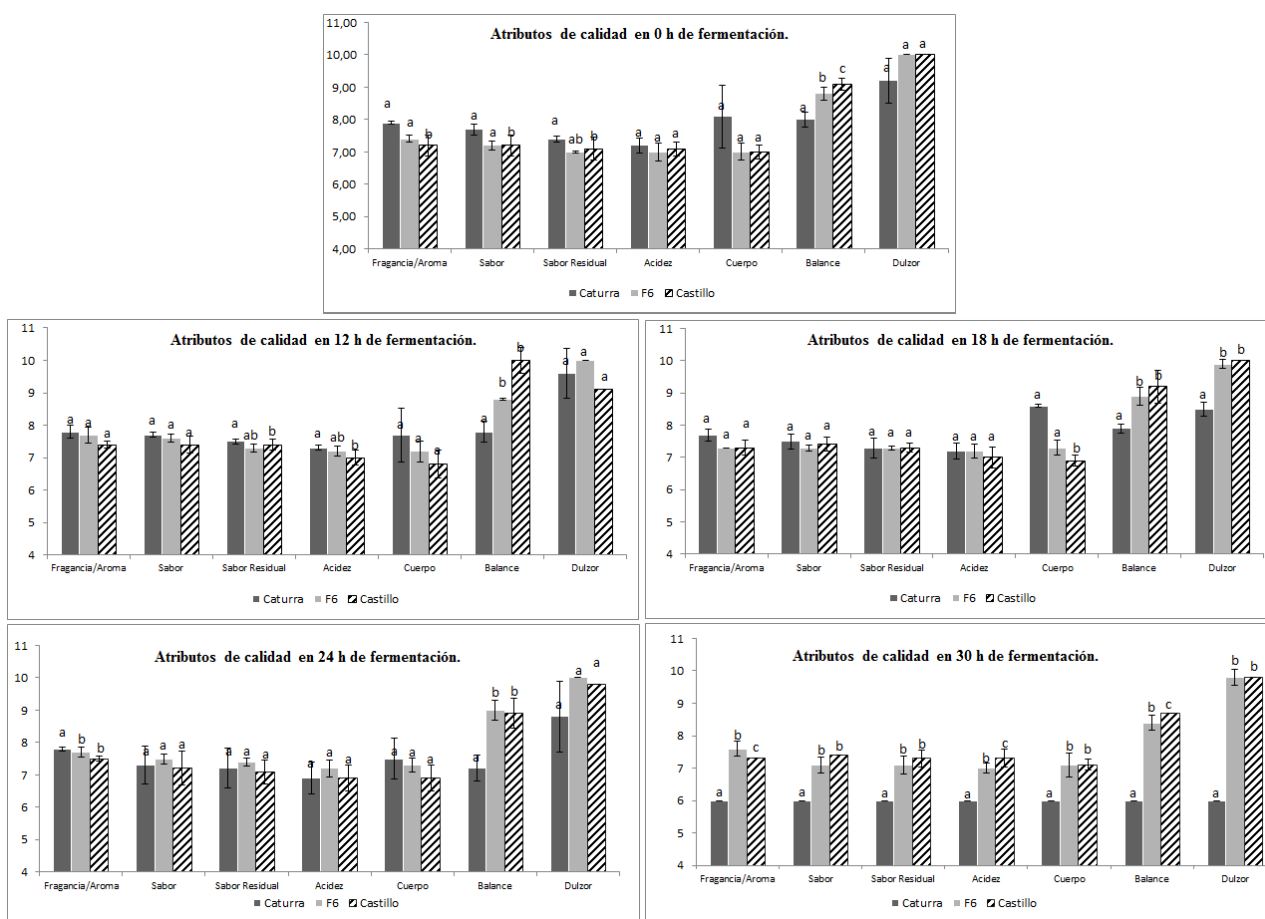


Figura 66: Diferencias sensoriales de bebidas de café de cada variedad. Barras con letras diferentes por atributos tienen diferencias estadísticamente significativas. Método HSD de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fuente: Autor

En la Tabla 6 se observa la descripción sensorial representativa de cada muestra estudiada en los diferentes tiempos de fermentación, L.W. Lee *et al*, 2015 afirma que la fermentación que se da en el beneficio por vía seca y húmeda proporciona perfiles sensoriales de café más aromáticos, con sabor a fruta, atributos ácidos, menos amargo y quemado y con notas amaderadas, lo cual coincide con la descripción de las muestras de estudio.

Tabla 6: Descripción sensorial en los diferentes tiempos de fermentación de las tres variedades de café estudiadas

Tiempo de Fermentación (horas)	Variedad	Descripción Sensorial
0	Caturra	Dulce, dulce fresco, herbal, chocolate, pimienta, avellana, arveja, mango maduro, mantequilla, floral, flor de cafeto, frutos secos, rosas, miel de abeja, panela, vinoso dulce perfumado, caramelo, frutos rojos, cereal, aroma a miel, cítrico, acidez media, cuerpo de medio a bajo.
	F6	Dulces, vinosas, panela, herbal, cítricas, floral, frutal, arveja, picante, caramelo, melón, cereal, maíz tostado maní, nuez, avellana, astringente, acidez media, cuerpo medio
	Castillo	Notas dulces, cítrica, herbal, limoncillo, notas melosas, frutal, nuez, maní, madera, panela, vainilla, frutos secos, dulce láctico (ácido láctico), pulposa cacota de café, vinagre, acidez media, cuerpo medio.
12	Caturra	Dulce, cítrico, chocolate, mantequilla, frutos rojos, floral, cerezas, piña, durazno, miel, frutos secos, maní, malta, pan tostado caramelo, acidez media, cuerpo medio.
	F6	Notas dulces, chocolate, caramelo, panela, picante, herbal, caña fresca, horneado, durazno verde, frutas cítricas, maní, astringente, residual ligero, acidez media, cuerpo medio.
	Castillo	Dulce, limón, cítrica, floral, jazmín, caramelo, herbal, panela, sedoso agradable, caña, avellana, cereal, maderoso, acidez media, cuerpo medio.
18	Caturra	Dulce, caramelo, chocolate, chocolate blanco, manzana roja, banano, piña, miel, panela, caña, dulzón vinoso agradable, cereal, maní, almendra, malta, pan tostado, cítrico, herbal, rosas, anís, madera, especias, floral, frutos rojos, frutal, acidez media, cuerpo medio.
	F6	Cítrico, chocolate, dulce, herbal, frutal, caramelo, vainilla, frutos rojos, notas melosas, cereza, vinagre, panela, notas terrosas, dulce persistente agradable y prolongado equilibrado, acidez media, cuerpo medio.
	Castillo	Notas dulces, chocolate, herbal, limoncillo, manzanilla fresca, manzana verde, arveja, ciruelas, panela, floral, perfumado, frutos rojos, frutos secos, maní tostado, cítrico, vinoso, nuez, avellana, notas lácticas, acidez media, cuerpo medio.

Continuación de la Tabla 7: Descripción sensorial en los diferentes tiempos de fermentación de las tres variedades de café estudiadas.

24	Caturra	Dulce, cítrico, chocolate, caramelo, panela, frutos rojos, frutos verdes, frutos maduros, floral de cafeto, herbal té verde, cereal, malta, maní, vinagre, paja, almendra de café verde, residual manchado, residual pesado, fermento, amargo, acidez media baja, cuerpo medio medio, amargo, taza pesada, dulzón vinoso, sucio, áspero, inconsistencia.
	F6	Dulce, chocolate, caramelo, cítrico, limoncillo, durazno, frutal, manzana, frutos amarillos, notas madera, herbal, mentolado, notas melosas, nuez, pimienta, picante, notas a malta agradable, nota vinosas, acidez media, cuerpo medio.
	Castillo	Dulce, herbal, cítrico, frutal, durazno, chocolate blanco, vinoso, caña, panela nuez, cremoso, frutos secos, acidez media, cuerpo medio, cuerpo medio medio prolongado.
30	Caturra	Fermento.
	F6	Dulce, cítrico, chocolate, frutos rojos, panela, frutos secos, nuez, manzana, floral, jazmín, notas picantes, avellana, pulposo, notas dulzonas, acidez cítrica, acidez media, cuerpo medio alto, residual persistente, notas pulpa.
	Castillo	Dulce, herbal, chocolate, sabor panela, frutal, caramelo, vinosas, dulzón, maní, cereal, vino de ciruela, acidez media, cuerpo medio, cuerpo prolongado, agradable sedoso, buen buquet residual perdura.

7. CONCLUSIONES.

Se aislaron 31 BAL, 73 levaduras, 203 hongos, conformando la colección que se encuentra conservadas en tres métodos diferentes: En criovial con crioperlas para la conservación a -20 °C, en aceite mineral y agua destilada a 4 °C.

El contenido de BAL inicial es similar entre las tres variedades cercano a 8,00 Log UFC/g; sin embargo, a través de las 30 horas de fermentación el contenido de esta población tiene un comportamiento diferente, ya que para F6 se aprecia una tendencia constante, en Castillo se obtiene el máximo a las 12 horas (8,75 Log UFC/g) y en Caturra a las 24 horas (10,00 Log UFC/g), el cual es superior en comparación con las otras variedades. Lo anterior muestra que el café cereza y el mucilago contiene BAL y dicha población puede variar en función de la variedad y de las condiciones edáficas y climáticas de la zona de producción.

Las levaduras presentes inicialmente difieren con valores de 8,25, 6,40 y 5,75 Log UFC/g de Caturra, Castillo, F6 respectivamente alcanzando los máximos en diferentes tiempos; evidenciando la presencia de esta población en el proceso de beneficio, en las 30 horas de estudio. Se destaca que para la variedad Caturra la cantidad de microorganismos BAL y levaduras están del mismo orden, mientras que para la variedad Castillo y F6 predomina la población BAL respecto a las levaduras, lo cual podría depender del origen o de la variedad.

Las muestras de café analizadas (Caturra, F6 y Castillo) presentan microorganismos Gram-positivos con características correspondientes a bacilos, cocos, diplococos para las BAL y ovaladas, elipsoidales y elipsoidales fusiforme en levaduras.

El café de las tres variedades cuando fue evaluado en taza presentó un puntaje de 80,00 a 84,99 correspondiente a cafés especiales, según SCAA, 2015 (Exceptuando la variedad caturra en las 24 y 30 horas de fermentación). Es de resaltar que en estos tiempos de fermentación las BAL y las levaduras transformaron los azúcares presentes en el mucilago, generando metabolitos que podrían ser ácido láctico, ácido acético y etanol modificando los contenidos iniciales de °Brix y pH, lo cual se relaciona con los atributos dados por los catadores quienes mencionaron la presencia de notas ácidas, vinosas con bouquet constante, perdurable muy agradable. Aunque, en la variedad Caturra hay un detrimento en la calidad en taza después de las 18 horas de fermentación, cuando las levaduras y BAL supera los 8,2 y 9,2 Log UFC/g, respectivamente; donde probablemente cierta cantidad de metabolitos producidos representan defectos en la taza.

La evaluación de la taza de café procesada mediante fermentación semi-seca en los diferentes tiempos propuestos muestra que puede estar determinada por la variedad de café y su origen; para el caso de las variedades Castillo y F6 la valoración final de la calidad no fue dependiente del tiempo de fermentación estudiado; mientras que para la variedad Caturra, la percepción de calidad se mantuvo hasta las 18 horas de fermentación, teniendo un descenso en la calificación en tiempos de 24 y 30 horas de fermentación.

Los resultados sugieren que es posible eliminar la fase de lavado en el beneficio tradicional del café, que constituye la mayor fuente de contaminación biológica en las fuentes hídricas aledañas a las fincas cafeteras, debido a que se elimina la carga orgánica y no se produce ningún tipo de agua residual en el proceso.

8. RECOMENDACIONES.

El procedimiento realizado en este trabajo de investigación es de gran importancia para aquellos caficultores y empresarios que se preocupen por innovar y dar valor agregado a su producto al abordar toda la cadena productiva de café con denominación de cafés especiales, donde pueden optar por la implementación de un beneficio semi-seco, sin afectar la calidad en taza del café.

Se propone continuar la identificación genotípica de los aislados de BAL, levaduras y hongos para posteriores trabajos de investigación, en los que se inoculen de manera independiente para evaluar su incidencia en taza.

Se sugiere identificar los metabolitos generados en la fermentación de café a través del tiempo mediante técnicas avanzadas como lo es Cromatografía líquida de alta eficacia (siglas en inglés HPLC), Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (siglas en inglés FTIR), Cromatografía de gases, Cromatografía iónica y relacionarlas con la calidad final en taza.

Se recomienda monitorear la humedad relativa (HR), temperatura ambiental y brillo solar del lugar donde se lleve a cabo la fermentación de café; ya que son factores climáticos de gran influencia en la descomposición del mucilago durante este proceso.

Es de gran importancia llevar a cabo otros estudios con las mismas características de los ensayos realizados para la confirmación de los resultados obtenidos a lo largo de la presente investigación, considerando las mismas variedades con diferentes orígenes para la verificación de diferencia en función de estos parámetros.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.

- (ANACAFÉ), A. N. (2016). *Especies y Variedades del Cafeto*. Guatemala: Asociacion Nacional del Café (ANACAFÉ).
- (FINAGRO), F. p. (2014). *Perspectivas del sector agropecuario Colombiano*. Bogota: Fondo para el financiamiento del sector agropecuario (FINAGRO).
- (ICONTEC), I. C. (1985). *Norma Tecnica Colombiana 2090 (NTC 2090). Maquinaria Agricola. Despulpadoras de Café*. Bogota D.C.: ICONTEC.
- (ICONTEC), I. C. (1987). *Norma Tecnica Colombiana 2323 (NTC 2323). Cafe Verde. Examen olfativo y y visual y determinacion de materia extraña y defectos*. Bogota D.C.: ICONTEC.
- (ICONTEC), I. C. (2002). *Norma tecnica Colombiana 2758 (NC 2758). Cafe. Analisis Sensorial. Vocabulario*. Bogota D.C.: ICONTEC.
- (ICONTEC), I. C. (2011). *Norma Tecnica Colombiana 3566 (NTC 3566). Café Verde. Preparacion de muestras en uso para anlisis sensorial*. Bogota D.C.: ICONTEC.
- (ICONTEC), I. C. (2012). *Norma Tecnica Colombiana 2323 (NTC 2323). Café pergamino, Verde y Semitostado en Sacos. Muestreo*. Bogota D.C.: ICONTEC.
- (USAID), U. S. (2005). *Normas y estandares catacion para la region de Centro America*. USAID.
- A. Camacho, M. G. (2009). *Analisis de Microbiologia de Alimentos Edicion. Cuenta en placa de Bacterias*. Mexico D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- A. Camacho, M. G. (2009). *Analisis Microbiologico de Alimentos 2 Edicion. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. Mexico D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Amores, M. C. (2004). *Caracterizacion de las cepas del género Bifidobacterium con carácter probiótico*. Valencia: Universidad Politecnica de Valencia.
- Ana R. García, M. I. (2002). Actividad endopoligalacturonasa de un preparado de la levadura *Kluyveromices marxianus* aislada de la pulpa del café. *Cultivos Tropicales*, 67-72.
- Ashok Pandey, C. R. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 153–162.
- Barrera, B., & Mauricio, O. (2014). *Selección y entrenamiento de un panel en análisis sensorial de café*. Neiva: Universidad Surcolombiana.
- Beelaerts, C. (Marzo de 2011). Coffee trade: a basic lesson on the economics of the price of coffee. *Global Coffee Report*.

- Betiko Kafea, 2013. El café. Consultado el 03 de octubre del 2016. <http://www.betikokafea.com/el-cafe/>
- Bruno Pot, E. T. (2009). *Lactobacillus. Molecular biology. From Genomics to Probiotics*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- C.E. Oliveros-Tascón, J. S.-U.-R.-G. (2011). Equipo para el lavado ecológico del café con mucílago degradado con fermentación natural. *Revista de ingeniería*, 61-67.
- Cálix, E. O. (2001). *Evaluación de los sistemas tradicional y ecológico de beneficio húmedo de café*. Zamorano, Honduras.
- Calle, H. V. (1977). *Subproductos del café. Boletín Técnico No 6*. Chinchiná: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.
- Cardenas, S. I. (2007). *Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café (Coffea arabica L.) del CAIIT*. Turrialba, Costa Rica: Centro agronomico tropical de investigación y enseñanza (CATIE).
- Carmona, P. A. (2003). *Mejoramiento del rendimiento en el proceso de extracción de café de la empresa DECAFE S.A*. Manizales, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales.
- Carrillo, L. (2003). Hongos. En L. Carrillo, *Microbiología Agrícola* (págs. 1 - 14). Salta - Argentina: Universidad Nacional de Salta.
- Centro Nacional de Investigación de Café (CENICAFÉ). 2016. Cultivemos café / Beneficio. Consultado el 20 de julio del 2016. http://www.cenicafe.org/es/index.php/cultivemos_cafe/beneficio
- Cindy Katherine Bernal Lopéz, D. M. (2014). *obtención de bebidas fermentadas a partir de maracuyá (Passiflora edulis flavicarpa) y cholupa (Passiflora maliformis L.)*. Neiva: Universidad Surcolombiana.
- Cobián, S. A. (2012). *Reporte de inteligencia de mercados. Café peruano: Aroma y sabor para nosotros y el mundo*. Peru: Red Libre.
- Colombia., F. N. (2010). El árbol y el entorno. *Café de Colombia*.
- CONtexto ganadero. (1 de 9 de 2014). Caficultura colombiana ahorra cada vez más agua. *CONtexto ganadero. Una lectura rural de la realidad Colombiana*, pág. 1.
- Cristina F. Silva, R. F. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 251–260.
- Cruz, C. M. (2011). *Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

Danielle Wedral, R. S. (2010). The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Science and Technology*, 1474–1479.

Paul Vos, George Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer, William Whitman. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Consultado 20 de Noviembre de 2016. <https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=0-VqgLiCPFcC&oi=fnd&pg=PR1&dq=bergey%20%80%99s+manual+of+determinative+bacteriology+2th+edition&ots=kGD8vUFv6C&sig=hAj-zHH6n7LbArGG9obMzt6dVVg#v=onepage&q=bergey%20%80%99s%20manual%20of%20determinative%20bacteriology%202th%20edition&f=false>

Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE). 2014. Sistemas de información de precios y abastecimiento del sector agropecuario (SIPSA). Boletín semanal, precios mayoristas 8 al 14 de febrero de 2014. Consultado el 20 de julio del 2016. https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Semana_8feb_14feb_2014.pdf

Duicela, G. L., Corral, C. R., & Fernández A, F. (2010). *Influencia de métodos de beneficio sobre la calidad organoléptica del café arábico*. Portoviejo, Ecuador.

Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. (2010). *Post-Cosecha*. Chinchiná: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. (2011). *Construyendo el modelo para la gestión integrada del recurso hídrico en la caficultura colombiana*. Chinchiná: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

Federacion Nacional de Cafeteros. (5 de 10 de 2016). Caficultura colombiana ahorra cada vez más agua. *Federacion Nacional de Cafeteros (Prensa FNA)*, pág. 1.

Federacion Nacional de Cafeteros. (2015). Perfil de la caficultura Huilense. Consultado el 20 de Noviembre del 2016. https://huila.federaciondecarteros.org/fnc/nuestros_cafeteros/category/118

Flavia Andino Rugama, Y. C. (2010). *Curso Microbiología de alimentos. Un enfoque practico para la onocuidad alimentaria*. Estelí - Nicaragua: Universida Nacional de Ingenieria - (UNI - Norte).

Fox, A. (22 de Agosto de 2016). Bactriologia. Streptococcus. *Microbiologia e Inmonologia*.

Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Ghaitersburg, Maryland. An Aspen Publication. Consultado 20 de Noviembre de 2016. https://books.google.com.co/books?id=-oRp5VCVTQQC&pg=PP1&lpg=PP1&dq=Fundamentals+of+cheese+science&source=bl&ots=P0vVwCe2jx&sig=DOLNLV2XRy8XDpSWX6EwPO7_LxY&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjL0au3_KXOAhVCaz4KHaPMDVAQ6AEILDAC#v=onepage&q=Fundamentals%20of%20cheese%20science&f=false

- Francisco Kuhar, V. C. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. *Revista boletín biológica*, 11 - 18.
- G. Varela, G. G. (2008). Fisiología y metabolismo bacteriano. En I. d. Republica, *Unidad Informática de Apoyo a la Docencia* (págs. 43 - 57). Montevideo, Uruguay: Universida de la Republica.
- G.D. Casey, A. D. (2003). Molecular detection of *Candida krusei* contamination in fruit juice using the citrate synthase genes *land* and a potential role for this gene in the adaptive response to acetic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 13–22.
- Gallego, M. L. (2009). Los Hongos. *Revista Digital Innovacion y Experiencia Educativas*, 1 - 8.
- Gamogal, L. E. (2014). *evaluacion fisica y sensorial de cuatro variedades de café (Coffea arabica L.) tolerantes a roya (Hemileia vastatrix), en relacion a dos pisos ecologicos de las provincias de Lajas y Rioja*. Tarapoto, Peru: Universidad Nacional de San Martin - Tarapoto.
- Garai-Ibabe, G. A. (2010). Screening and selection of 2-Branched (1,3)-d-D-Glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization. *Agricultural and Food Chemistry*, 6149–6156.
- Garay, D. A. (2014). *Estandarizacion de la tostion de café tipo pasilla de maquinas a traves de cromatografia liquida de alta eficiencia en la procesadora de café cafetal del rio*. Ibagué, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia, UNAD.
- Germán Bou, A. F. (2010). *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- Gilberto Vinícius de Melo Pereira, E. N. (2015). Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research International*, 348–356.
- Gomes, M. J. (2013). *Gênero Streptococcus spp*. Porto Alegre: FAVET-UFRGS.
- Gómez, N. P. (2013). *Caracterización de cafés especiales utilizando estadística multivariable*. Neiva: Universidad Surcolombiana.
- Gutiérrez, L. A. (2007). *Caracterizacion fisiologica de levaduras aisladas de la filósfera de mora*. Bogota, D.C.: Pontificia Universidad Javeriana.
- Heredia, R. M. (2013). *Influencia de cuatro métodos de beneficio sobre la calidad física y organoléptica del café arábigo (Coffea arabica L.) en dos pisos altitudinales del noroccidente de Pichincha*. Quito, Ecuador: Universidad Central de Ecuador.

- Hernández, J. G. (2010). *Técnicas moleculares aplicadas a la caracterización y estudio de la supervivencia de bacterias lácticas de yogurt*. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Herrera, J. R. (2002). El asombroso reino de los hongos. En C. d. I.P.N., *Avance y perspectiva*. Vol. 20 (págs. 275 - 281). Texas: Universidad de Texas.
- International Coffee Organization. (ICO), 2016a. Procesamiento de campo. Consultado el 03 de octubre del 2016. http://www.ico.org/ES/field_processingc.asp
- International Coffee Organization. (ICO), 2016b. Historia del Café. Consultado el 03 de octubre del 2016. http://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp
- International Coffee Organization. (ICO), 2016c. Estadísticas comerciales – Septiembre 2016. Consultado el 01 de agosto del 2016. <http://www.ico.org/>
- International Coffee Organization. (ICO), 2016d. Informe del mercado del café. Agosto 2016. Consultado el 01 de septiembre del 2016. <http://www.ico.org/documents/cy2015-16/cmr-0816-c.pdf>
- Jaimes, E. M. (2013). Evaluación sensorial de marcas comerciales de café en Colombia. *Sexto Coloquio Interdisciplinario de Doctorado*. Estado de Puebla, Mexico: Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla.
- Jay, J. M. (1994). *Microbiología moderna de los alimentos - Cuarta Edición*. Zaragoza: Acriba.
- Jenny Paola Pabón Usaquén, J. R. (2009). Manejo del café desmucilaginado mecánicamente. *Cenicafé*.
- Joaquín Azcón Bieto, M. T. (2000). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Madrid: Mc Graw-Hill.
- Jose António Couto, F. N. (2005). Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts Dekkera/Brettanomyces. *International Journal of Food Microbiology*, 337 – 344.
- José D. Martínez Pajaresa, O. D. (2012). Sepsis por Leuconostoc spp. en un lactante sano. *Arch Argent Pediatr* , e32 - e34.
- José Jaime, C. H., Iván Darío, A. T., Carlos Eugenio, O. T., & Jhon Wilson, M. M. (2011). Colorimetría del fruto de café (*Coffea arabica* L.) durante su desarrollo y maduración. *Facultad Nacional Agraria Medellin* , 6229-6240.
- Juan Rodrigo Sanz Uribe, C. E. (2011). Controle los flujos de café y agua e el modulo BECOLSUB . *Cenicafé*.
- Leonor Jofré M., A. S. (2006). Infección por Leuconostoc en pacientes con síndrome de intestino corto, nutrición parenteral y alimentación enteral continua. *Revista Chlena de infectologia*, 340-345.

- Liang Wei Lee, M. W. (2015). Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. *Food Chemistry*, 182–191.
- Lina Ximena Alonso Nore, J. A. (2008). *Estudio comparativo en tecnicas de recuentom rapido en el mercado y placas Petrifilm TM 3M TM para el analisis de alimentos*. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana.
- Liu G., G. M. (2010). Applicability of bacteriocinogenic *Lactobacillus pentosus* 31-1 as a novel functional starter culture or coculture for fermented sausage manufacture. *Food Protection*, 292–298.
- Lopez, S. M., Pulgarín, J. A., Restrepo, E. C., & Tascón, C. E. (2003). Relacion entre el estado de madurez del fruto de café y las carcteristica del beneficio, rendimineto y calidad de la bebida. *Cenicafé*, 297-315.
- Luis Roberto Batista, S. M. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 293–300.
- Martina Starovičová, R. H. (2016). *Streptococcus spp. S. pyogenes*. Paises Bajos: Wageningen University.
- Martínez, J. I. (2005). *Potencial biotecnologico de bacterias lacticas silvestres en productos lacteos fermentados: Actividad metabolica y produccion de exopolisacárido*. Villaviciosa: Universidad de Oviedo.
- Michael T. Madigan, . M. (2004). *Brock. Biologia de los Microorganismos*. Editorial Pearson Prentice Hall.
- Miguel A. Rodríguez-Carvajal, J. I.-S. (2008). Structure of the high-molecular weight exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Carbohydrate Research*, 3066–3070.
- Miguel Felipe, M. I. (2015). *Servicio de extencion agricola - A recoger café maduro - Ecos del café*. Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico.
- Milagrosa Montes, J. M.-A. (2007). Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 14-20.
- Mindani I. Watawana, N. J. (2015). Enhancement of the functional properties of coffee through fermentation by “tea fungus” (Kombucha). *Journal of Food Processing and Preservation*, 2596–2603.
- Miren Zumárraga, F. B. (2009). *Pediococcus* con bacteria alterante del vino . En M. Códax, *Vinivultura - Enologia* (págs. 23 -27). España.
- Mirian Pereira Rodarte, D. R. (2011). Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 457-464.

- Montoya F., Alejandra, 2013. La Nación. Huila sigue liderando producción cafetera. Consultado el 4 de febrero del 2016. <http://www.lanacion.com.co/index.php/economica/item/219986-huila-sigue-liderando-produccion-cafetera>
- Mountain, B. B. (2008). *Varietades de café*. Altos del Colorado, Panama: Baru Black Mountain.
- Nancy Mora Peñaflor, A. G. (2007). *Susceptibilidad de bacteria Acido lacticas (BAL) frente a diversos antibioticos*. Pachuca de Soto, Mexico: Universidad Autnoma del Estado de Hidalgo.
- Neu, A.-K., Pleissner, D., Mehlmann, K., Schneider, R., Puerta-Quintero, G., & Venus, J. (2016). Fermentative utilization of coffee mucilage using *Bacillus coagulans* and investigation of -down-stream processing of fermentation broth for optically pure L(+)- lactic acid production. *Bioresource Technology*, 211, 398-405.
- Paul Vos, G. G.-H. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second edition, Volume 3*. Springer Dordrecht Heidelberg: New York.
- Paula Jimena Ramos Giraldo, J. R. (2010). Identificación y clasificación de frutos de café en tiempo real, a través de la medición de color. *Cenicafe*, 315-326.
- Pérez, A. T., Vigil, A. L., & Morales., M. S. (2011). Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas selectos de ingeniería de Alimentos.*, 54 - 74.
- Petrenko, O. (2004). *Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo*. Buenos Aires: Universidad de Belgrano.
- Pita, M. S. (2002). Tendencia actual del *Streptococo* como indicador de contaminación fecal. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 38-43.
- Prescott Lansing M., H. J. (2004). *Microbiología. 5 Edición*. Madrid: Mc Graw Hill. Interamericana.
- Quintero, G. I. (1998). Calidad en taza de la Varietades de *Coffea arabica* L. cultivadas en Colombia. *Cenicafe*, 265-278.
- Quintero, G. I. (2009). *Los catadores de Café*. Chinchina, Caldas: Cenicafe.
- Quintero, G. I. (2012). *Factores, procesos y controles en la fermentación del café. Gerencia técnica, Programa de Investigación Científica Fondo Nacional del café*. Manizales: Cenicafé.
- Quintero, G. I. (2012). *Factores, procesos y controles en la fermentación en café*. Manizales: Cenicafé.

- R. Suárez, J. S.-L. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, 10–21.
- Raffaella Di Cagno, G. C. (2010). Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology*, 381- 389.
- Ramírez, C. A., Oliveros, E. O., & Sanz, J. R. (2015). Manejo de lixiviados y aguas de lavado en el proceso de beneficio húmedo del café. *Cenicafe*, 46 - 60.
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 47-56.
- Roa M., G., Oliveros T., C. E., Álvarez G., J., Ramírez G., C. A., Sanz U., J. R., Álvarez H., J. R., . . . N., R. V. (1999). *Beneficio ecologico de café*. Chinchiná: Cenicafé.
- Robert A. Whitley, J. M. (2009). Genus I. *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22AL. En W. B. Whitman, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (págs. 655 - 710). USA: Springer.
- Rodríguez N. V., S. J. (2015). *Beneficio del café en Colombia, Prácticas y estrategias para el ahorro, uso eficiente del agua y el control de la contaminación hídrica en el proceso de beneficio húmedo del café*. Chinchina, Caldas: Cenicafe.
- Rodríguez, N. (2009). *Estudio de un biosistema integrado para el postratamiento de las aguas residuales del café utilizando macrófitas acuáticas*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Royo Jimenez, E. (2014). Café I. (G. *Coffea*). *Reduca (Biología). Sección Botánica.*, 113 - 132.
- Romero, K. Y. (2009). *Identificación de las fuentes de variación que tienen efecto sobre la calidad de café (Coffea arabica) en los municipios de El Paraíso y Alauca, Honduras*. Turrialba, Costa Rica: Centro agronomico tropical de investigación y enseñanza (CATIE).
- Santos, W. L. (1993). *Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por Pediococcus sp. 347, de origen carnico*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- SCAN, S. C. (2015). *Evaluación sensorial del café*. Guatemala: Creative Commons Atribución-CompartirIgua.
- Silva, C.F., 2014. Microbial activity during coffee fermentation. In: Schwan, R.F., Fleet, G.H. (Editores), *Cocoa and Coffee Fermentation*. CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, FL, pp. 398–423. Consultado el 03 de octubre del 2016. <http://es.slideshare.net/rmarmel/cocoa-and-coffee-fermentations>

- Specialty Coffee Association of America (SCAA). (2016). *A blueprint for water security in the coffeelands*. Estados Unidos de America: Specialty Coffee Association of America (SCAA).
- Specialty Coffee Association of America (SCAA). (2015). *SCAA Protocols, Cupping Specialty Coffee*. Estados Unidos de America: Specialty Coffee Association of America (SCAA).
- Specialty Green Coffe Xorxios. (2017). Geisha. Consultado 20 de Noviembre de 2016. <http://www.xorxios.com/index.php/es/actualidad/17-articulos-y-colaboraciones/26-geisha>
- Stephen R. Hughes, J. C.-L.-H.-V. (2014). Sustainable conversion of coffee and other crop wastes to biofuels and bioproducts using coupled biochemical and thermochemical processes in a multi-stage biorefinery concept. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 8413 – 8431.
- Sule Senses-Ergul, R. Á. (2005). Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology*, 120 – 124.
- Suzana Reis Evangelista, M. G. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wetmethod of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 102–112.
- tecnico, I. d. (2010). *Luis Alberto Duicela, Rubén Corral Castillo, Diana Farfán Talledo, Fabián Fernández, Darío Shiguango, Jorge Guamán, Jorge Guamán*. Portoviejo: Consejo Cafetalero Nacional (COFENAC).
- Temis-Pérez A. L., L.-M. V.-M. (2011). Produccion de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas selectos de ingenieria de alimentos*, 54-74.
- Toro, J. A. (2013). *Economia cafetera y desarrollo economico en Colombia*. Bogota: Universidad de Bogota Jorge Tadeo Lozano.
- Universidad Navarra. (2011). *Microbiologia de alimentos. Metodos generales de analisis. Microbiologia de alimento II. Analisis de microorngnismos totales*. Universidad Navarra.
- Urtis G., Marco A. 2011. Tinción de Gram. Consultado 20 de Julio de 2016. http://www.geocities.ws/urtis_micro/sesiones/Gram.htm
- v. (2015). Efecto de las condiciones de cultivo, las características químicas del suelo y el manejo de grano en los atributos sensoriales de café (*Coffea arabica* L.) en taza. *Ecofisiología, Metabolismo de Cultivos, Tecnología, Producción y Fisiología de Semillas*, v.
- Villanueva, G. L. (2007). *Aislamiento e identificacion de bacterias acido lacticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belen (Boyaca)*. Bogota: Universidad de la Salle.

Waller, J., Bigger, M., & Hillocks, R. (2007). *Coffee pests, diseases and their management*. Washington, D.C.: CABI.

Washington C. Winn, S. D. (2006). *Koneman Diagnóstico microbiológico*. Madrid: Editoril Medics Panamericana.

ANEXOS

Anexo A. Preparación de medios de cultivo.

a). Medio de cultivo líquido para diluciones seriadas.

- **Caldo De Man, Rogosa y Sharpe para *Lactobacillus* (MRS).**

Las diluciones seriadas para el recuento en placa de colonias viables de BAL, se empleó caldo MRS para *Lactobacillus* según De Man, Rogosa y Sharpe para microbiología de laboratorios MERCK (Anexo A). Se pesó en la balanza analítica (OHAUS Pionner 0.0001 gr) la cantidad de medio requerido para la dosificación a utilizar, se depositó en un vaso de precipitado para adicionar la cantidad de agua destilada necesaria y homogenizado mediante agitador electromagnético (MICROSTIRRER Magnetic Stirrer VELP® SCIENTIFICA). Finalmente con ayuda de una bureta calibrada de 50 ml (ABC Laboratorios) se adicionó a cada tubo de ensayo una cantidad de 9 ml, se colocó el tapón y se llevaron a esterilización en autoclave (SCI FINETECH AUTOCLAVE) a 121 °C durante un lapso de tiempo de 15 minutos, finalizado este proceso de dejo atemperar para realizar las diluciones correspondientes a la siembras.

- **Agua de Peptona.**

Las diluciones seriadas para el recuento en placa de colonias viables de levaduras, se empleó Agua de Peptona (tamponada) con parámetros establecidos según la ISO 6579 para microbiología de laboratorios MERCK (Anexo A). Se pesó en la balanza analítica (OHAUS Pionner 0.0001 gr) la cantidad de medio requerido para la dosificación a utilizar, se depositó en un vaso de precipitado para adicionar la cantidad de agua destilada necesaria y homogenizado mediante agitador electromagnético (MICROSTIRRER Magnetic Stirrer VELP® SCIENTIFICA). Finalmente con ayuda de una bureta calibrada de 50 ml (ABC Laboratorios) se adicionó a cada tubo de ensayo una cantidad de 9 ml, se colocó el tapón y se llevaron a esterilización en autoclave (SCI FINETECH AUTOCLAVE) a 121 °C durante un lapso de tiempo de 15 minutos, finalizado este proceso de dejo atemperar para realizar las diluciones correspondientes a la siembras.

b). Medio de cultivo sólido para recuento de microorganismos viables.

- **Agar de Man, Rogosa y Sharpe para *Lactobacillus* (MRS).**

Para el recuento en placa de colonias viables de BAL se empleó agar MRS para *Lactobacillus* según De Man, Rogosa y Sharpe para microbiología de laboratorios MERCK (Anexo A). Se pesó en la balanza analítica (OHAUS Pionner 0.0001 gr) la cantidad de medio requerido para la dosificación a utilizar, se depositó en un erlenmeyer para adicionar la cantidad de agua destilada necesaria y se homogenizo manualmente, se llevó a esterilización en autoclave (SCI FINETECH AUTOCLAVE) a 121 °C durante un lapso de tiempo de 15 minutos, finalizado este proceso de dejo atemperar a 50 °C para realizar el vertido.

- **Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol FIL-IDF (YGC).**
Para el recuento en placa de colonias viables de levaduras se empleó el medio selectivo para levaduras Agar YGC (Anexo A) para microbiología de laboratorio MERCK en la siembra en placa. Se pesó en la balanza analítica (OHAUS Pionner 0.0001 gr) la cantidad de medio requerido para la dosificación a utilizar, se depositó en un erlenmeyer para adicionar la cantidad de agua destilada necesaria y se homogenizo manualmente, se llevó a esterilización en autoclave (SCI FINETECH AUTOCLAVE) a 121 °C durante un lapso de tiempo de 15 minutos, finalizado este proceso de deajo atemperar a 50 °C para realizar el vertido.
- **Agar Papa Dextrosa (PDA).**
Para el aislamiento de hongos en placa se empleó el medio solido Agar PDA (Anexo A) de laboratorio OXOID. Se pesó en la balanza analítica (OHAUS Pionner 0.0001 gr) la cantidad de medio requerido para la dosificación a utilizar, se depositó en un erlenmeyer para adicionar la cantidad de agua destilada necesaria y se homogenizo manualmente hasta dilución completa, se llevó a esterilización en autoclave (SCI FINETECH AUTOCLAVE) a 121 °C durante un lapso de tiempo de 15 minutos, finalizado este proceso de deajo atemperar a 50 °C para realizar el vertido.
- **Agar Verde de Malaquita (VM).**
Para el aislamiento de hongos en placa se empleó el medio solido Agar Verde de Malaquita (Anexo A). Se pesó en la balanza analítica (OHAUS Pionner 0.0001 gr) la cantidad de medio requerido para la dosificación a utilizar, se depositó en un erlenmeyer para adicionar la cantidad de agua destilada necesaria y se homogenizo manualmente hasta dilución completa, se llevó a esterilización en autoclave (SCI FINETECH AUTOCLAVE) a 121 °C durante un lapso de tiempo de 15 minutos, finalizado este proceso de deajo atemperar a 50 °C para realizar el vertido.

Anexo B. Medios de cultivos utilizados.

Medios de cultivo líquido

Los medios líquidos fueron distribuidos en tubos de ensayo (9 ml c/u), esterilizados a 121°C por un tiempo de 15 minutos, en autoclave (SCI FINETECH AUTOCLAVE) y atemperados a temperatura ambiente para ser usados o almacenados en el refrigerador a 4°C.

Caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) (MERCK KGaA)

Descripción y uso: Medio de enriquecimiento selectivo que proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano del BAL.

Preparación: Se disolvieron 52,2 g en 1 litro de agua desmineralizada, se depositó en tubos de ensayo y se esterilizo a 121°C durante 15 minutos en autoclave (SCI FINETECH AUTOCLAVE) y atempero a 30°C para realizar la diluciones.

Composición (g/l):

Peptona de Caseína 10.0.

Extracto de carne	8.0.
Extracto de levadura	4.0.
D(+) – glucosa	20.0.
Dihidrogenofosfato dipotásico	2.0.
Tween® 80	1.0.
Hidrogenocitrato diamónico	2.0.
Acetato sódico	5.0.
Sulfato Magnesico	0.2.
Sulfato de Manganeso	0.04.

pH:5,7 ± 0,2 a 25 °C

Agua de Peptona (MERCK KGaA)

Descripción y uso: Medio de enriquecimiento no selectivo que proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano.

Preparación: Suspender 15 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien y distribuir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Composición (g/l):

Peptona de caseína	10.0.
Cloruro sódico	5.0.
Dihidrogenofosfato potásico	1.5.
Hidrogenofosfato disódico dodecahidrato	9.0

pH 7.2 ± 0.2.

Medios de cultivo sólido

Los medios solidos fueron distribuidos en Erlenmeyer, esterilizados a 121°C por un tiempo de 15 minutos, en autoclave (SCI FINETECH AUTOCLAVE) y distribuidos en las placas de Petri con las alícuotas sembradas.

Agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) (MERCK KGaA)

Descripción y uso: Medio de enriquecimiento selectivo que proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano del BAL.

Preparación: Se disolvieron 68,2 g en 1 litro de agua desmineralizada se esterilizo a 121°C durante 15 minutos en autoclave (SCI FINETECH AUTOCLAVE) y atempero a 50°C y posteriormente, se vertió en placas estériles.

Composición (g/l):

Peptona de Caseína	10.0.
Extracto de carne	8.0.
Extracto de levadura	4.0.
D(+) – glucosa	20.0.
Dihidrogenofosfato dipotásico	2.0.
Tween® 80	1.0.
Hidrogenocitrato diamónico	2.0.
Acetato sódico	5.0.
Sulfato Magnesico	0.2.
Sulfato de Manganeso	0.04.
Agar-agar	14.0.
pH:5,7 ± 0,2 a 25 °C	

Agar YGC (Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol) (MERCK KGaA)

Descripción y uso: Medio de cultivo selectivo y enriquecido para el crecimiento de levaduras, con este medio se realizó una siembra a profundidad.

Preparación: Disolver 40 gr en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien y distribuir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos (SCI FINETECH AUTOCLAVE).

Composición (g/l):

Extracto de levadura	5.0.
D (+); glucosa	20.0.
Cloranfenicol	0.1.
Agar-agar	14.9.
pH 6.6±2 a 25°C.	

Agar Patata Dextrosa (PDA) (OXOID)

Descripción y uso: Medio de cultivo selectivo y enriquecido para el crecimiento de HONGOS, con este medio se realizó una siembra en la superficie de granos de café en estado pergamino.

Preparación: Disolver 39 g en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien hasta diluir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos (SCI FINETECH AUTOCLAVE). Mezclar bien antes de verter.

Composición (g/l):

Extracto de patata	4.0*
Dextrosa	20.0.
Gentamicina (GENFAR 160 MG)	2.0 ml.
Agar	15.0.

pH 5.6± 0.2 a 25°C.

*4,0 g de extracto de papa es equivalente a 200 g de infusión de patatas

Agar Verde de Malaquita (AVM)

Descripción y uso: Medio de cultivo selectivo y enriquecido para el crecimiento de HONGOS, con este medio se realizó una siembra en la superficie de granos de café en estado pergamino.

Preparación: Disolver los componentes para 1 litro de agua destilada. Mezclar bien hasta diluir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos (SCI FINETECH AUTOCLAVE). Mezclar bien antes de verter.

Composición (g/l):

Peptona Bacteriológica (OXOID)	15.0.
Potasio Dihidrogenofosfato (MERCK KGaA)	1.0.
Sulfato de magnesio heptahidratado (MERCK KGaA)	0.5.
Disolución de verde malaquita 2.5 ppm (AppliChen Panreac ITW Comparies)	1 ml.
Agar Bacteriológico (OXOID)	20.0.
Gentamicina (GENFAR 160 MG)	2.0 ml.

pH 5.6± 0.2 a 25°C.

Anexo C: Procedimiento análisis Físico del café.

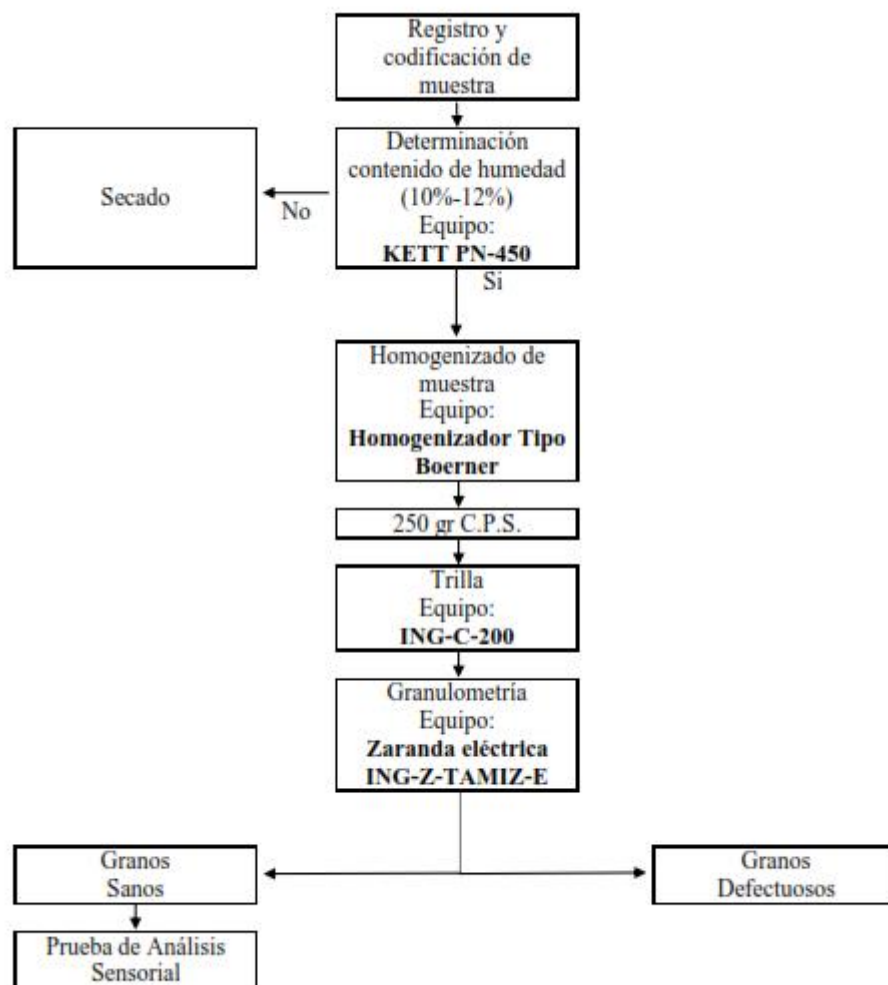


Figura 67: Procedimiento análisis Físico del café.

Fuente: Autor.

Anexo D. Tinción de Gram.

Guía utilizada para realizar la tinción de las levaduras (Amarocho, 2013)

Materiales:

Asa de platino
Mechero
Portaobjeto
Cristalizador
Pinzas
Violeta de genciana
Fuchsina básica

Azul de metileno

Reactivo lugol

Microscopio

Alcohol 96°

Procedimiento:

1. Se toma la muestra de la unidad formadora de colonia superficial de la placa que se va a teñir así como se observa en la Figura 68.

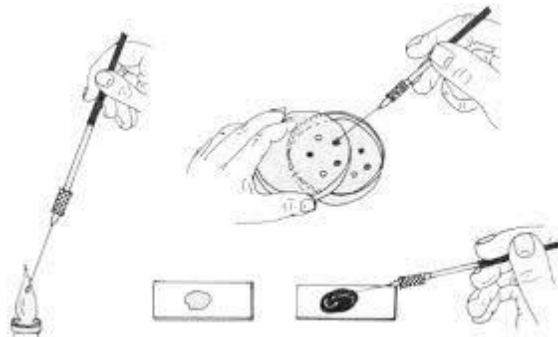


Figura 68: Toma y extensión de muestra.

Fuente: Urtis, 2016.

2. La muestra a observar se extiende, deseca y se fija.
3. Se tiñe con violeta de genciana durante 30 segundos.
4. Sin lavar, se reemplaza el colorante por el reactivo del lugol, dejando que arrastre el primero y dejándolo actuar durante 1 minuto.
5. Se lava con alcohol
6. Se lava con agua.
7. Luego, se tiñe con fuchsina básica durante 3 minutos.
8. Lavar, secar y observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

CONGRESOS Y PUBLICACIONES

AUTORES: Wilmer Ladino-Garzon , Erika T. Cortés-Macías, Nelson Gutiérrez-Guzmán y Claudia M. Amorocho-Cruz.

TITULO: Calidad de taza de café (*Coffea arabica L.*) procesado en fermentación semi-seca.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Ponencia Oral y Artículo.

CONGRESO:

III CONGRESO INTERNACIONAL EN INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS - IICTA 2016

II SEMINARIO INTERNACIONAL DE EMPAQUES BIODEGRADABLES

PUBLICACIÓN: Revista Agronomía Colombiana Suplemento Vol. 1, 2016.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Bogotá D.C., Colombia.

AÑO: 2016

AUTORES: Wilmer Licerio Ladino-Garzon, Erika Tatiana Cortes-Macías, Javier Eduardo Sánchez-Ramírez, Nelson Gutiérrez-Guzmán y Claudia Milena Amorocho-Cruz.

TITULO: Uso racional de agua en el beneficio semi-seco de café (*Coffea arabica L.*): influencia en la calidad en taza de tres variedades.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Ponencia Oral y Artículo.

CONGRESO:

USRA VII SEMINARIO INERNACIONAL USO RACIONAL DEL AGUA.

PUBLICACIÓN: Revista Ingeniería y Región Vol. 16, 2016.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Neiva, Colombia.

AÑO: 2016