



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, Huila

21/07/2021

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Jorge Alexander Cuellar Guzman, con C.C. No. 1.075.312.866,

Jhoan Jeronimo Ordoñez Muñoz, con C.C. No. 1.077.874.479,

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o

titulado

EVALUACIÓN DE LAS LEVADURAS *Pichia farinosa*, *Torulasporea delbrueckii* Y *Kluyveromyces marxianus* EN LA FERMENTACIÓN DEL CAFÉ VARIEDAD COLOMBIA (F5) PARA DETERMINAR SU INFLUENCIA EN LA CALIDAD EN TAZA.

presentado y aprobado en el año 2021 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.

Vigilada Mineducación

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.



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Jorge A. Coellar G.

Firma: _____

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Jhoan Ordóñez Muñoz

Firma: _____



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: EVALUACIÓN DE LAS LEVADURAS *Pichia farinosa*, *Torulaspota delbrueckii* Y *Kluyveromyces marxianus* EN LA FERMENTACIÓN DEL CAFÉ VARIEDAD COLOMBIA (F5) PARA DETERMINAR SU INFLUENCIA EN LA CALIDAD EN TAZA

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Cuellar Guzman	Jorge Alexander
Ordoñez Muñoz	Jhoan Jeronimo

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
----------------------------	--------------------------

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Ingeniero Agrícola

FACULTAD: Ingeniería

PROGRAMA O POSGRADO: Ingeniería Agrícola

CIUDAD: Neiva

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2021

NÚMERO DE PÁGINAS: 51

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):



Diagramas ___ Fotografías x Grabaciones en discos ___ Ilustraciones en general x Grabados ___
Láminas ___ Litografías ___ Mapas ___ Música impresa ___ Planos ___ Retratos ___ Sin ilustraciones ___ Tablas
o Cuadros x

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

MATERIAL ANEXO: Fotografías y fichas técnicas

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. <u>Cinética de crecimiento</u>	<u>growth kinetics</u>	6. <u>Levaduras</u>	<u>Yeast</u>
2. <u>antibiograma</u>	<u>antibiogram</u>	7. <u>Patogenos</u>	<u>Pathogens</u>
3. <u>hongos filamentosos</u>	<u>filamentous fungi</u>	8. <u>Secado</u>	<u>Drying</u>
4. <u>actividad antimicrobiana</u>	<u>antimicrobial activity</u>	9. <u>Café</u>	<u>Coffee</u>
5. <u>análisis sensorial</u>	<u>sensory analysis</u>	10. <u>Fermentación</u>	<u>Fermentation</u>

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar las levaduras *Pichia farinosa*, *Torulasporea delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus* como alternativa para mejorar la calidad en taza del café variedad Colombia F5 a través de la fermentación anaerobia. Para ello, se activaron las levaduras y se realizó la prueba de cinética de crecimiento microbiano. Luego se evaluó el efecto de las levaduras frente a los patógenos *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* por el método de discos y el método de pocillos; además, mediante el estudio de antibiogramas se determinó la reacción de las levaduras frente a los antibióticos Bencilpenicilina. y Cloranfenicol. Se midió el grado de madurez de la cereza, Luego se dejó fermentar el café con la adición de levaduras durante 30 horas registrando los valores (pH) y (°Brix) antes y después de la fermentación. Posteriormente, se llevó a secado natural por 7 días y se realizó el ensayo de hongos filamentosos en granos de café con humedad del 10 al 12% y finalmente, se hizo la prueba de análisis sensorial para cada uno de los tratamientos con levaduras y testigo con sus respectivas repeticiones empleando la normatividad SCAA.



ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

The purpose of this work is to evaluate the yeasts *Pichia farinosa*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces marxianus* as an alternative to improve the quality of the Colombia F5 variety coffee cup through anaerobic fermentation. For this, the yeasts were activated and the microbial growth kinetics test was performed, then the effect of the yeasts against the pathogens *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* was evaluated by the disc method and the well method; in addition, by means of the study of antibiograms, the reaction of the yeasts against the antibiotics Benzylpenicillin was determined. and Chloramphenicol. The degree of maturity of the cherry was measured. The coffee was then left to ferment with the addition of yeasts for 30 hours, recording the values (pH) and (° Brix) before and after fermentation. Subsequently, it was carried out to natural drying for 7 days and the filamentous fungus test was carried out in coffee beans with humidity of 10 to 12% and finally, the sensory analysis test was carried out for each of the treatments with yeasts and control with their respective repetitions using SCAA regulations.

APROBACIÓN DE LA TESIS

Nombre Jurado: Yaneth Liliana Ruiz

Firma:

Nombre Jurado: Wilson Rodrigo Cruz

Firma:

EVALUACIÓN DE LAS LEVADURAS *Pichia farinosa*, *Torulaspota delbrueckii* Y *Kluyveromyces marxianus* EN LA FERMENTACIÓN DEL CAFÉ VARIEDAD COLOMBIA (F5) PARA DETERMINAR SU INFLUENCIA EN LA CALIDAD EN TAZA

Cuellar-Guzman, J. A ¹, Ordoñez-Muñoz, J. J ², Amorocho-Cruz, C. M ³

1 Estudiante Programa Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana, Neiva. E-mail: u20151135478@usco.edu.co

2 Estudiante Programa Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana, Neiva. E-mail: u20151138848@usco.edu.co

3 PhD. Biotecnología. Profesor Asociado, Programa Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana, Neiva. E-mail: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

RESUMEN

El café es uno de los productos más importantes para la economía colombiana y se ha caracterizado por su gran competitividad en calidad alrededor del mundo, siendo considerado el país con mayor producción en café suave en el mundo. Sin embargo, los consumidores son cada vez más exigentes respecto a la calidad y origen del producto y a pesar de que la industria cafetera ha transformado tecnologías y conocimientos, aún se presentan fallas en el proceso de beneficio para obtener un café de calidad. El presente trabajo tiene como finalidad evaluar las levaduras *Pichia farinosa*, *Torulaspota delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus* como alternativa para mejorar la calidad en taza del café variedad Colombia F5 a través de la fermentación anaerobia. Para ello, se activaron las levaduras en medio PDA, se inocularon cada una de ellas en agua de peptona por 24 horas y se realizó la prueba de cinética de crecimiento microbiano por un periodo de 48 horas. Luego se evaluó el efecto de las levaduras frente a los patógenos *Salmonella typhimurium* ATCC 9270, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC 25931 por el método de discos y el método de pocillos; además, mediante el estudio de antibiogramas se determinó la reacción de las levaduras frente a los antibióticos Bencilpenicilina 1'200.000 U.I. y Cloranfenicol 250 mg. Se dejó fermentar el café con la adición de levaduras durante 30 horas registrando los valores del potencial de hidrogeniones (pH) y sólidos solubles (°Brix) antes y después de la fermentación. Posteriormente, se llevó a secado natural por 7 días y se realizó el ensayo de hongos filamentosos en granos de café con humedad del 10 al 12% y finalmente, se hizo la prueba de análisis sensorial para cada uno de los tratamientos con levaduras y testigo con sus respectivas repeticiones empleando la normatividad SCAA (Asociación de Cafés Especiales de América). Como resultados se tiene la identificación morfológica para cada levadura, el ensayo de cinética de crecimiento microbiano donde *Torulaspota Delbrueckii* fue la de mayor desarrollo con 11,42 UFC/ml en las primeras 29 horas y la prueba de actividad antimicrobiana donde ninguna de las tres levaduras inhibió el crecimiento de los patógenos estudiados. Por otro lado, se encontró disminución del pH y sólidos solubles después de la fermentación, registrando valores iniciales de 5,48±0,08 y 15,17±0,29, hasta aproximadamente 3,65±0,0 y 12,83±0,09 respectivamente. En la caracterización morfológica de hongos filamentosos se identificó el género *Penicillium spp* con diferentes patrones de ramificación en todos los tratamientos y finalmente, durante la prueba de análisis sensorial no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de cada una de las levaduras respecto al testigo, considerando que se deben tomar medidas para comprobar la influencia de las levaduras estudiadas como modificar el tiempo de fermentación, las concentraciones de levaduras inoculadas y/o parámetros que influyen en la fermentación.

PALABRAS CLAVE: cinética de crecimiento; antibiograma; hongos filamentosos; actividad antimicrobiana; análisis sensorial.

ABSTRACT

Coffee is one of the most important products for the Colombian economy and has been characterized by its great competitiveness in quality around the world, being considered the country with the highest production of soft coffee in it. However, consumers are increasingly demanding regarding the quality and origin of the product and despite the fact that the coffee industry has transformed technologies and knowledge, there are still flaws in the beneficiation process to obtain quality coffee. The present work aims to evaluate the yeasts *Pichia farinosa*, *Torulasporea delbrueckii* and *Kluyveromyces marxianus* as an alternative to improve the quality of the Colombia F5 variety coffee cup through anaerobic fermentation. For this, the yeasts were activated in PDA medium, each one of them was inoculated in peptone water for 24 hours and the microbial growth kinetics test was carried out for a period of 48 hours. Then the effect of yeasts against the pathogens *Salmonella typhimurium* ATCC 9270, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC 25931 by the method of disks and the method of wells; furthermore, by means of the study of antibiograms, the reaction of the yeasts against the antibiotics Benzylpenicillin 1'200,000 IU was determined. and Chloramphenicol 250 mg. The coffee was left to ferment with the addition of yeasts for 30, recording the values of the potential of hydrogen ions (pH) and soluble solids (° Brix) before and after fermentation. Subsequently, it was carried out to natural drying for 7 days and the test of filamentous fungi was carried out in coffee beans with humidity of 10 to 12% and finally, the sensory analysis test was made for each of the treatments with yeasts and with their respective repetitions using the SCAA (Specialty Coffee Association of America) regulations. The results are the morphological identification for each yeast, the microbial growth kinetics test where *Torulasporea Delbrueckii* was the one with the highest development with 11.42 CFU / ml in the first 29 hours and the antimicrobial activity test where none of the three yeasts it inhibited the growth of the pathogens studied. On the other hand, a decrease in pH and soluble solids was found after fermentation, registering initial values of 5.48 ± 0.08 and 15.17 ± 0.29 , up to approximately 3.65 ± 0.0 and 12.83 ± 0.09 respectively. In the morphological characterization of filamentous fungi, the genus *Penicillium* spp was identified with different branching patterns in all the treatments and finally, during the sensory analysis test, no significant differences were found between the treatments of each of the yeasts with respect to the control, considering that measures should be taken to verify the influence of the yeasts studied, such as modifying the fermentation time, the concentrations of inoculated yeasts and / or parameters that influence fermentation.

KEY WORDS: growth kinetics; antibiogram; filamentous fungi; antimicrobial activity; sensory análisis.

1. INTRODUCCIÓN

El café está clasificado como el segundo producto global más comercializado después del petróleo en términos financieros. Además, el consumo mundial de café también ha aumentado a una tasa anual promedio de 1.9% en los últimos 50 años. Este gusto universal puede atribuirse a su aroma deseable y atractivo (Lee *et al*, 2015). El comercio mundial de café es importante tanto para los países exportadores como los importadores; siendo un producto universal, debido que son consumidas alrededor de 600 millones de tazas de café por todo el mundo (Ocampo y Álvarez, 2017). Por lo tanto, el café se ha convertido en una base fundamental no solo de la economía colombiana, sino de países tropicales de América Latina principalmente por la generación de empleo e ingresos por su exportación (Quintero y rosales, 2014).

El mayor productor de café en el mundo sigue siendo Brasil, con un aproximado de 2'600.000 toneladas anuales representando el 30% de la producción mundial; sin embargo, no es competitivo con la producción en calidad; debido a que solo el 20% son variedades arábicas y 80% restante es robusta, Vietnam ocupa el segundo lugar con la ventaja de que es considerado el país con más bajo costo de producción, obteniendo un total de aproximadamente 1'700.000 toneladas anuales y Colombia se ubica en el tercer país con mayor producción y el primero en café suave en el mundo, con un área cultivada de aproximadamente 970.000 hectáreas para un rendimiento de 810.000 toneladas anuales (Salazar, 2021). Los principales países importadores del café de Colombia son Estados Unidos, Alemania, Japón, Países Bajos y Suecia (F.N.C, 2010). Se ha considerado que el nivel de consumo de café es mayor en los países que lo importan, aunque el consumo interno aumento considerablemente en estas últimas décadas. En la actualidad, alrededor del 15% de la producción es consumida en los países exportadores, mientras que en 1990/91 era tan solo el 7% (OIC, 2020).

El café de Colombia se ha caracterizado por su gran calidad alrededor del mundo, la cual depende de factores como origen geográfico, origen botánico, cultura cafetera del país y los procesos y operaciones realizados para la obtención del producto, donde al combinar estos aspectos lo hacen competitivo en el mercado internacional (Puerta, G. I., 2013). En Colombia, el café es cultivado en zonas que oscilan entre los 1.300 y 2.000 metros de altura sobre el nivel del mar, y “los principales productores de café son Huila, Antioquia, Tolima, Caldas, Valle del Cauca, Cauca, Risaralda, Santander, Cundinamarca, Nariño, Quindío, Norte de Santander, Cesar, La Guajira, Magdalena, Boyacá, Meta, Casanare y Caquetá” (Federación Nacional de Cafeteros., 2013).

En la última década, el departamento del Huila se ha considerado como el primer productor de café colombiano y por sus condiciones climáticas se ha convertido en el departamento con el café de mayor calidad en taza, con el 16% de área dedicadas a la producción de café arábigos. Para el año 2017 el Huila exportaba alrededor del 90% de su producción, aproximadamente 640.000 sacos y en ese año este valor representó el 18% de la producción nacional (F.N.C., 2017).

El café Arábica de Colombia se procesa en las fincas mediante el beneficio húmedo que comprende varias etapas. En la primera, se retira la pulpa del fruto en la operación de despulpado, luego se remueve el mucílago mediante el desmucilagador o por la fermentación natural, después con el lavado se retiran los productos de degradación del mucílago, y finalmente, en el secado se reduce la cantidad de agua del grano pergamino. Para asegurar la buena calidad e inocuidad del café se recomienda la aplicación de buenas prácticas de higiene y agricultura en los procesos del café en la finca (Puerta et al, 2015).

A través de muchos años, la fermentación se ha considerado un proceso fundamental para las elaboraciones de alimentos, debido a que la microbiota presentada genera cambios de textura y químicos que crean nuevas percepciones sensoriales haciendo el alimento más agradable (Chitupanta y Liseth, 2018). Las fermentaciones son procesos catabólicos de oxidación de sustancias orgánicas, principalmente azúcares que se transforman en energía y en compuestos más simples como etanol, ácido láctico, ácido acético y ácido butírico. Estos procesos son desarrollados por las enzimas naturales que producen las bacterias y levaduras presentes en los sustratos. Los productos de las fermentaciones dependen del tipo de microorganismo, de la composición del sustrato y de las condiciones externas (Puerta *et al*, 2015). Durante el procesamiento en húmedo, los frutos maduros del café experimentan una fermentación de forma automática o natural, realizada por un complejo proceso microbiológico que involucra las acciones de microorganismos como levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Silva *et al.*, 2008). Esta fermentación, además de eliminar el mucílago adherido a la semilla, ayuda a mejorar el sabor de las bebidas al producir metabolitos microbianos, que son precursores de compuestos volátiles formados durante el tostado (Mussatto et al., 2011). Según Puerta y Echeverry (2015) durante la fermentación natural del café ocurren diferentes procesos bioquímicos, en los cuales las enzimas producidas por las levaduras y bacterias presentes en el mismo mucílago fermentan y degradan sus azúcares, lípidos, proteínas y ácidos, y los convierten en alcoholes, ácidos, ésteres y cetonas. Estas sustancias formadas cambian las características de olor, color, pH y composición del sustrato (el mucílago) y también de los granos de café (Puerta, 2010). La velocidad y la clase de productos generados en la fermentación del café dependen de factores que afectan el metabolismo de los microorganismos como la temperatura externa, el tipo de sistema de fermentación, el tiempo de proceso, la calidad del café en baba, la acidez del sustrato, la disponibilidad de oxígeno y la higiene (Puerta, G. I., & Echeverry, J. G. 2015).

En el proceso de fermentación, los factores más influyentes son la presencia de levaduras, el tiempo y temperatura (Sánchez, 2018). Souza y otros afirman en el año 2017 que “las levaduras tienen un papel esencial en el proceso fermentativo debido a su biocontrol de crecimiento de hongos filamentosos, produciendo diferentes enzimas y compuestos aromáticos volátiles”. En las últimas décadas se han destinado investigaciones para el café con el fin de desarrollar nuevos conocimientos y optimizar cada vez más la calidad del mismo, estudiando los principales microorganismos que interactúan en la descomposición del mucílago de café donde se encuentran *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula*; las bacterias *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*; y algunos hongos que dependen de la manipulación de los frutos de café en la recolección y las condiciones en que permanecen los granos durante el beneficio del café (Sanchez, 2018; Piraval y Cruz, 2018). Masoud y otros (2004) estudiaron las levaduras presentes en el fruto de café, granos despulpados, granos en fermentación, lavados y secos encontrando los siguientes géneros: *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudointermedia*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia ohmeri* y *Torulasporea delbruecki*. Por otro lado, Nasanit y Satayawut en el año 2015 identificaron 108 aislamientos

de levaduras presentes en café arábica pertenecientes a los siguientes géneros, *Pichia* spp. (28 aislamientos), *Candida* spp. (25 aislamientos), *Kluyveromyces* spp. (23 aislamientos) *Saccharomyces* spp. (19 aislados), *Debaryomyces* spp. (10 aislamientos), *Hanseniaspora* spp. (2 aislamientos) y *Schizosaccharomyces* sp. (1 aislado).

La levadura *Torulasporea delbrueckii* (conocida como *Sccharomyces rosei*, *Saccharomyces roseus*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces delbrueckii* y *Candida colliculosa*) se considera como un ascomiceto, de forma ovalada y rugosa, que genera colonias de color blanco o crema suave, sin presencia de hifas (Ferreira, 2019). *Torulasporea delbrueckii* es una de las levaduras que tiene gran importancia en la fermentación con alto contenido de azúcar, debido a que producen menor cantidad de ácidos y otros compuestos volátiles indeseables, como el sulfuro de hidrógeno y los fenoles volátiles (Azzolin *et. al.*, 2012). Además, Da Mota y otros (2020) afirman que la inoculación de este tipo de levadura mejora la calidad de la bebida, y se ha obtenido como resultado atributos como caramelo, chocolate, materiales herbáceos, frutos amarillos y almendras.

Pichia farinosa es una cepa resistente y puede desarrollarse en condiciones hasta de 46 °C, pH alrededor de 3 y generalmente presenta su pico máximo de crecimiento a las 60 horas después del inicio de la fermentación, esto indica que presenta un excelente crecimiento a altas temperaturas y tolerancia a presión ácida y osmótica, haciéndola favorable para el proceso de producción de etanol siendo encontrada en este tipo de bebidas (Kwon, Yoon y Kim, 2018; Mallet *et. al.*, 2012). Actualmente, se está teniendo en cuenta esta especie para la producción de compuestos aromáticos en bebidas alcohólicas (Ogunremi, Agrawal y Sanni, 2020); sin embargo, existe poca literatura acerca de esta levadura en el proceso oxidativo (Giron, 2012).

Kluyveromyces Marxianus ha sido utilizada desde la antigüedad para la elaboración de leches fermentadas. Aunque, existen investigaciones recientes que evidencian la utilización de la levadura en diferentes líquidos azucarados donde además de producir ácido láctico se considera una fuente iniciadora de la fermentación provocando etanol y dióxido de carbono. Por ejemplo, Lopez en el año 2017 afirma que se obtuvo una especie de bebida carbonatada con aromas únicos y característicos mediante la fermentación controlada del Kéfir (*Kluyveromyces Marxianus*) con agua de piña y tibicos. De esta forma se establece la implementación de algunos tipos de levaduras como *Saccharomyces*, *Candida*, y *Kluyveromyces* en industrias como la cervecería, producción de vino, destilería, panadería y en productos donde se emplee fermentación de forma controlada (Chitupanta y Liseth, 2018).

Debido a que el proceso de beneficio del café se lleva a cabo bajo una serie de condiciones de humedad y temperatura, lo hace susceptible a la aparición de diferentes microorganismos dentro de ellos, los hongos filamentosos. Se han encontrado con mayor frecuencia en muestras de café especies como *Aspergillus*, incluyendo *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* y *Penicillium* produciendo micotoxinas perjudiciales al consumo (Alvarenga, 2014). La almendra de café se encuentra conformada por fibras, proteínas y grasas, siendo un sustrato idóneo para el desarrollo de hongos saprófitos. Alvarenga y otros (2014) en su estudio “Incidencia y distribución de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café” identificaron diferentes tipos de hongos durante el proceso de beneficio húmedo, a mitad de proceso de secado y café seco al 12%, encontrando los siguientes géneros: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.* en PDA y *Aspergillus flavus*, *Aspergillus*

niger, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.* en MSA60%.

Entre las variables fisicoquímicas presentes en el café como el pH, Actividad de agua (Aw) y el porcentaje o contenido de humedad, Cajiao (2017) afirma que las dos últimas mencionadas son las que influyen directamente en la cantidad y el tipo de especies fúngicas resultantes. Las micotoxinas son compuestos tóxicos secundarios producidos por hongos filamentosos (Young, Rodríguez y Piedra, 2019). Entre las micotoxinas, se encuentran las ocratoxinas que son producidas por algunas especies de *Aspergillus* como *A. ochraceus* y algunas especies de *Penicillium*, especialmente *P. Verrucosum* (Heussner et. al., 2015) y a pesar de que el café es tostado a altas temperaturas, y deba pasar un procesamiento para quedar listo para beber, la Ocratoxina A no es completamente eliminada (Gopinandhan et. al., 2013), siendo la cepa *Penicillium spp.* la de mayor incidencia en los granos de café tostado (Arrúa et. al., s.f.). Las especies de hongo *Penicillium* se presentan con aspecto superficial de color blanco en ocasiones es amarillo, anaranjado o púrpura con textura aterciopelada o ligeramente algodonoso (Pérez & Zárate, 2013) y tienen gran importancia en la producción de quesos y embutidos fermentados, debido a que modifican el sabor y el aroma del alimento (Camiletti, 2018).

Para evaluar el antagonismo de algunos microorganismos, plantas o extractos de las mismas frente a organismos patógenos es necesario recurrir a pruebas *in vitro* que al poner en contacto estos dos grupos en un mismo medio, permitan conocer las reacciones de susceptibilidad por parte del patógeno, a esto se le conoce como antibiograma. Esta prueba es de gran importancia debido que establece si un agente antimicrobiano tiene la capacidad de inhibir o controlar la proliferación de un agente dañino o perjudicial para los seres vivos. Los principales métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana son los métodos de difusión en disco y difusión en pozo o pocillo sobre el agar, donde se determina de forma cualitativa el efecto antimicrobiano de un extracto de planta, microorganismo o sobrenadante del mismo sobre el patógenos de interés, dichos resultados se interpretan midiendo el diámetro de los halos de inhibición efectuado por el agente antimicrobiano (Sánchez, Castillo, y García, 2016). Se ha demostrado que el uso de algunas levaduras presenta antagonismo frente a patógenos bacterianos como es el caso de *Saccharomyces boulardii* donde muestra actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas como *E. coli* enterohemorrágica y enteropatógena, *Vibrio cholera*, *Salmonella typhimurium* y *S. flexneri* (Ranjbar y Farahani, 2019).

La alta calidad de la taza de café se ha transformado de gran importancia para el consumidor, dado que este produce sensaciones equilibradas de cuerpo, sabor, acidez y demás atributos que se puedan percibir. Por lo tanto, se ha establecido la caracterización de diferentes tipos de perfiles sensoriales de café empleando como mecanismo la prueba de catación desarrollada por la Speciality Coffee Association of America (SCAA 2015). Los consumidores son cada vez más exigentes en cuanto a la calidad y origen de los distintos productos que adquieren. A su vez, tal exigencia va haciendo conciencia entre los productores sobre la necesidad de proteger sus productos contra las imitaciones. A pesar de que la industria del café en Colombia tiene más de 76 años generando tecnologías y conocimientos, todavía hay fallas en el control de los procesos del café en la finca, en particular en la fermentación, lavado y secado, lo cual ocasiona defectos y falta de consistencia en la calidad del producto, pérdidas económicas para los caficultores y desaprovechamiento de mercados (Puerta, G. I., 2013). Dado que la calidad es el aspecto más importante que afecta la comercialización del café; un proceso de fermentación controlada de café con una microbiota controlada

puede garantizar una calidad estandarizada y reducir las pérdidas económicas para el productor (Huch & Franz, 2015)

Pereira A. et al, (2020) y De Melo, G. et al, (2014) demostraron que el uso de levaduras (como la *Torulaspota delbrueckii*) en el proceso de fermentación del café, pueden ser una alternativa para la obtención de diferentes perfiles sensoriales de café (contribuye a la formación de compuestos aromáticos volátiles) que pueden aumentar el valor final del producto. Teniendo en cuenta lo mencionado, el presente trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto de las levaduras *Pichia farinosa*, *Torulaspota delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus* en la fermentación de café variedad Colombia F5 con el fin de determinar su influencia en la calidad en taza, destacando por medio de un análisis sensorial el perfil que cada de una de ellas confiere.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar las levaduras *Pichia farinosa*, *Torulaspota delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus* en la fermentación de café variedad Colombia F5 para determinar su influencia en la calidad en taza.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar la curva de crecimiento microbiano para las levaduras *Pichia farinosa*, *Torulaspota delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus*.
- Establecer el efecto de los antibióticos Bencilpenicilina 1'200.000 U.I. y Cloranfenicol 250 mg en las levaduras *Pichia farinosa*, *Torulaspota delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus*.
- Determinar el impacto de la actividad antimicrobiana de las levaduras estudiadas respecto a cinco patógenos (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*)
- Determinar la inocuidad en el café pergamino seco.
- Evaluar la calidad sensorial del café fermentado con *Pichia farinosa*, *Torulaspota delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus* mediante la normatividad SCAA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Activación de levaduras

Se activaron las levaduras *Pichia farinosa*, *Torulasporea delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus*, conservadas a - 20 °C en el laboratorio de Microbiología de alimentos de la facultad de ingeniería de la Universidad Surcolombiana, extrayendo líquido junto a una crioperla de los crioviales para inocular con un asa de platino en medio agar de papa y dextrosa (Potato Dextrose Agar-PDA) mediante el método de superficie; la placa se incubó (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 30°C durante 24 h. Pasadas las 24 h se inoculó en nuevas placas de PDA mediante el método triple estría para aislar las colonias de las levaduras, de nuevo se incubó a 30°C durante 24h, al día siguiente se aisló una colonia y de nuevo se inoculó en placas de PDA mediante el método de superficie.

3.2 Ensayo cinética de crecimiento.

Se tomó muestra de la levadura del medio sólido y se pasó al erlenmeyer de los 300 ml de agua de peptona (Buffered Peptone Water), y se colocó en agitación durante todo el proceso, considerando cada una de las levaduras y el control, cada tratamiento por duplicado.

Se tomó muestras de cada erlenmeyer en las celdas de cuarzo, para medir la absorbancia a 600nm en el espectrofotómetro (Ultrospec 2000 uv/visible spectrophotometer, Pharma Biotech), en la hora 0, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 29, 31, 48, esta medida permite estimar el número de células totales a partir de la turbidez del medio, debido al crecimiento de las levaduras (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Durante cada toma se hicieron diluciones seriadas en tubos de ensayo que contenían 9 ml agua de peptona, hasta la -8 y se sembró 100ul en agar de papa y dextrosa (Potato Dextrose Agar-PDA) mediante el método de superficie, y se incubó a 30°C (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania), a las 24 horas siguientes se realizó el conteo de colonias.

3.3 Activación de cepas bacterianas.

Se activaron los patógenos de las cepas de referencia *Salmonella typhimurium* ATCC 9270, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC 25931, extrayendo el líquido hidratante de esta cepa para inocularlo con un asa de platino en medio de agar para métodos estándar (Plate Count Agar-PCA) mediante el método de superficie, la placa se incubó (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h.

3.4 Ensayo de actividad antimicrobiana.

Se evaluó el efecto de las levaduras frente a los patógenos *Salmonella typhimurium* ATCC 9270, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC 25931.

3.4.1 Método de discos.

Se utilizó la técnica de difusión de discos, para evaluar la inhibición de los patógenos en presencia de las levaduras, de cada cepa *Pichia Farinosa*, *Torulaspora Delbrueckii* y *Kluyveromices Marxianus*, se cortó un disco de 7mm de diámetro usando un sacabocados estéril para cada levadura, a partir de un cultivo en masa de 24 horas en agar PDA. Los discos se depositaron en el medio de agar PCA donde estaba inoculados en superficie los cultivos de *Salmonella typhimurium* ATCC 9270, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC 25931. Adicionalmente, se realizaron dos pocillos para el control positivo en los que se depositaron antibióticos como Bencilpenicilina 1'200.000 UI y Cloranfenicol 250 mg. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 h. La franja de inhibición por las levaduras evaluadas se midió con un pie de rey. En todos los casos se realizó por duplicado.

3.4.2 Método de pocillos.

Se utilizó la técnica de sobrenadante de pocillos, para evaluar la inhibición de los patógenos en ausencia de las células de las levaduras, inicialmente se realizó un filtrado de células, donde en cada caso se depositaron una porción de ellas (provenientes de un cultivo en masa de 24 horas en agar PDA), en tubos que contenían agua de peptona tamponada (Buffered Peptone Water) , llevándolas a incubar a 37°C (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania), se llevó a la centrífuga (Hettich-EBA 200, Alemania) a 6000 rpm durante 5 minutos respectivamente. Finalmente pasó por filtros de jeringa de membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm (Sartorius stedim-Minisart, España) se separó el sobrenadante libre de células.

Se seccionó 3 y 2 pocillos de 7 mm de diámetro usando un sacabocados estéril en agar PCA donde estaba inoculado en superficie los cultivos de *Salmonella typhimurium* ATCC 9770, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC 25931 ajustado a escala McFarland 0.5% en su respectiva placa, se adicione en la placa de 3 pocillos 50 µl de cada sobrenadante de las levaduras, y en la placa de 2 pocillos se adicione 50 µl de Bencilpenicilina 1'200.000 Ui y Cloranfenicol 250 mg como control positivo. Las placas se dispusieron en incubación a 37°C durante 16 h. La franja de inhibición por las levaduras aisladas se midió con un pie de rey. En todos los casos se realizó por duplicado.

3.4.3 Antibiogramas.

Se evaluaron las levaduras mediante la técnica de difusión de pocillos con los antibióticos Bencilpenicilina 1'200.000 U.I. y Cloranfenicol 250 mg en medio de agar PDA, donde se cortaron 2 pocillos de 7 mm de diámetro usando un sacabocados estéril, en cada pocillo se adicionó 50 µl del respectivo antibiótico. Finalmente se incubaron a 37°C durante 16h. La zona de inhibición generada por los antibióticos se midió con un pie de rey. En todos los casos se hizo por duplicado.

3.5 Fermentación del café con levaduras

Después de la activación de las levaduras, se tomó diferentes proporciones de levadura de la resiembra y se inocularon en seis tubos de ensayo con 9 ml agua de peptona (Buffered Peptone Water) cada uno para obtener muestras a diferentes concentraciones. Las muestras inoculadas en tubos de ensayo fueron

incubadas durante 24 horas a 30° C, se realizó diluciones seriadas y siembra en placa en agar PDA, posteriormente los cultivos en agua de peptona fueron centrifugados (Hettich-EBA 200, Alemania) a 5500 rpm durante 2,28 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó con agua destilada tres veces con el fin de eliminar los restos de agua de peptona. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 ml de agua destilada llegando a contenido celular a la escala 4% de MacFarland. Las muestras resuspendidas en agua destilada fueron centrifugadas y adicionadas al café despulpado para una fermentación de 30 horas, para los siguientes tratamientos T1 (*Pichia Farinosa*), T2 (*Torulaspora Delbrueckii*), T3 (*Kluyveromyces marxianus*) y TC (Tratamiento control), por triplicado.

Los cuatro tratamientos por triplicado tratamientos fueron rotulados como T1R1; T1R2; T1R3; T2R1; T2R2; T2R3; T3R1; T3R2; T3R3; Testigo 1; Testigo 2; Testigo 3, cada tanque con 7 kg de café despulpado, se le adicionó 2 ml de agua destilada con levaduras a diferentes concentraciones como se observa en la Tabla 4, Finalmente se fermentó de forma anaerobia durante 30 horas encontrado un aumento en las concentraciones de las levaduras inoculadas inicialmente.

3.5.1 Grado de madurez en la cereza de café

El color se obtuvo por medio de la espectroscopia óptica, llenando una placa de Petri con granos de café cereza, luego se situó encima de los granos el colorímetro (Konica Minolta CR-410, Japón) se realizó por triplicado, basados en las metodologías de McGuire, Juárez y colaboradores expuestas en los años 1992, y 2018. Se obtuvo las coordenadas L* (luminosidad o claridad y representa si un color es oscuro, gris o claro, variando desde cero para un negro hasta 100 para un blanco), a* (corresponde a rojo si a* > 0, o a verde si a* < 0) y b* (corresponde al amarillo si b* > 0, y al azul si b* < 0)(Carvajal, J.et al., 2011), para calcular el ángulo de tonalidad (h*) e índice de saturación (C*) con las ecuaciones 1 y 2. Adicionalmente las variables L*, a* y b* fueron evaluadas en el software Nix Color Sensor para determinar el color.

$$C^* = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{1/2} \quad (1)$$

$$h^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (2)$$

Juárez, A. et al., 2018; McGuire, 1992

3.5.2 Potencial de Hidrogeniones (pH) y Sólidos solubles (°Brix)

Se registraron los valores del potencial de hidrogeniones y sólidos solubles antes y después de la fermentación. El pH se midió con el potenciómetro (Ohaus Starter 5000, Alemania), se tomaron vasos de precipitado de 100 ml (Boeco, Alemania) y se agregó 10 gramos de café cereza y café despulpado (baba), debidamente pesados en balanza (Mettler Toledo Newclassic, Switzerland) Las mediciones se realizaron por triplicado.

Los sólidos solubles se determinaron por el método refractométrico. En café cereza se tomaron gotas de los jugos de la cereza de café, para la determinación de sólidos solubles en café despulpado se determinó por

medio del mucílago (baba del café) del café despulpado en refractómetro óptico (Brixco 3010). Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.6 Secado y almacenamiento del café.

Luego de la fermentación y lavado del café, se dispuso a secar el café en los secadores solares de la Universidad Surcolombiana, que pertenecen al grupo de investigación CESURCAFÉ, hasta alcanzar una humedad del 10 al 12 %, removiendo constantemente la capa de café garantizando un secado uniforme.

3.7 Identificación de hongos filamentosos en café pergamino seco.

Para identificar la presencia de hongos filamentosos en los granos de café y comprobar su inocuidad, se tomaron cinco granos de café pergamino seco de cada uno de los tratamientos y repeticiones trabajadas, se lavó los granos con hipoclorito de sodio al 15%, luego se enjuago dos veces con agua destilada, luego con la pinza estéril se depositaron los granos de café sobre las placas con agar de papa y dextrosa (Potato Dextrose Agar-PDA) de forma equidistante, se forró cada placa con cinta parafina, se incubó (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 30°C durante una semana. Para el aislamiento se identificaron los hongos con crecimiento en el perímetro o sobre el grano, tomando muestra de ellos y se hizo un cultivo monospórico de cada uno en agar PDA durante una semana a 30°C.

Para identificar las estructuras de los hongos, se depositó una gota de azul de lactofenol (Albor Quimico, Colombia) en un portaobjeto y se tomó una muestra del hongo en estudio con el asa recta, y se homogeneizó con el azul de lactofenol, se colocó encima de la emulsión un cubreobjeto para luego observar las estructuras en el microscopio.

3.8 Análisis sensorial.

Se recolectó muestras de cada uno de los 12 tratamientos y posteriormente se realizó el proceso respectivo de catación basado en la metodología de la Asociación de cafés Especiales – SCA (SCA, 2015). Se prepararon las muestras en café verde, luego fueron sometidas a selección, tueste y dosificación con relación peso/volumen, de 8,25 gr (+/- 0,25 gr) de café para 150 ml de agua por taza; se evaluaron diez atributos: fragancia/aroma, sabor, sabor residual, acidez, cuerpo, uniformidad balance, limpieza de taza, dulzor y valoración final de catador para cada muestra, registradas en el formato de evaluación de la SCA.

3.8 Análisis estadístico.

Se realizó una comparación de muestras independientes, con nivel de confianza del 95%, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS® Centurión XVI, donde se comparó el Log UFC ml -1 inicial con respecto al Log UFC ml -1 final de cada levadura, el Log UFC ml -1 final de las levaduras con respecto al Log UFC ml -1 final de los testigos en la fermentación del café, luego se comparó el °Brix promedio inicial con respecto al °Brix promedio final y el pH promedio inicial con respecto al pH promedio final.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez llegado el café en cereza a la zona de beneficio, se sumergió en un tanque con agua para eliminar los granos vanos o flotantes, se tomó el peso total en cereza, registrando un valor de 172 kg; posteriormente, se despulpó empleando una despulpadora Gaviota 300 con un peso final de 86.5 kg de café despulpado, distribuido de 7 kg para cada tratamiento para un total de 4 tratamientos por triplicado. Se comprobó que la pérdida de peso en el despulpado se encuentre en el rango del 40 al 60 % según Ramírez (2018); con un valor de 50,29 % de pérdida de peso en la presente investigación.

4.1 Identificación morfológica

Existen diversas técnicas para la identificación de las levaduras las cuales se pueden agrupar en: estudio morfológico, estudio fisiológico y bioquímico; métodos automatizados; medios diferenciales o de identificación directa; métodos inmunológicos; biología molecular, y otros como son estudios quimiotaxonómicos (Mendoza, 2005). En el presente trabajo se hizo la identificación de las levaduras mediante un estudio morfológico teniendo en cuenta que según la especie de levadura tiene sus particularidades; sin embargo, comúnmente son relativamente grandes y presenta forma de ovoide, alargadas, esféricas, forma de pera, limón, o triangular (García, 2004).

4.1.1 *Pichia Farinosa*

Esta especie se caracteriza como levadura halotolerante, se encuentra principalmente en el jugo de caña de azúcar y en la flora nativa de la uva, son osmotolerantes, crece en temperaturas de hasta 40°C, se desarrollan en un pH ligeramente ácido con un promedio de 4,5 a 6,5 y predominan las células de forma elipsoidales de 4 -6 μm de largo como se ilustra en la figura 1 (Martin, 2016; Guerrero, 2018).

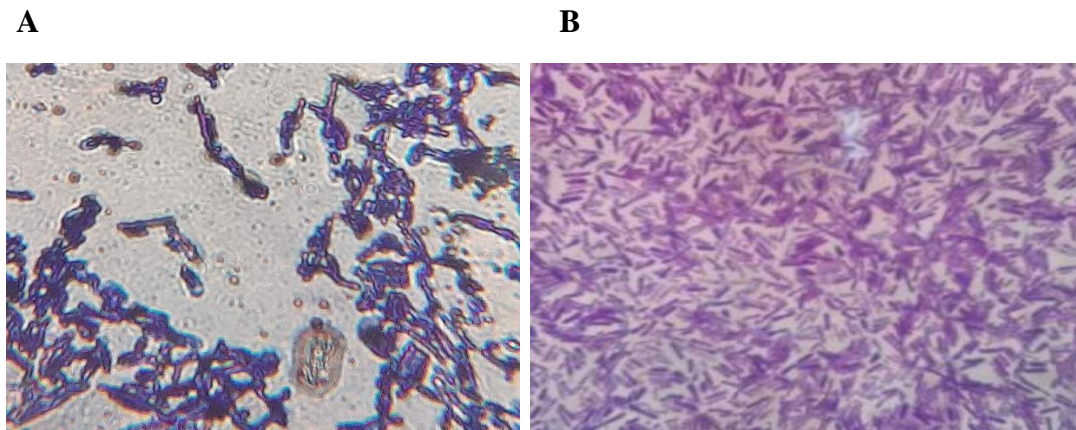


Figura 1. Observación microscópica de células de *Pichia Farinosa* (figura A obtenida por los autores en el laboratorio de la Universidad Surcolombiana, figura B obtenida por Guerrero, 2018).

4.1.2 *Torulaspota Delbrueckii*

Las especies de *Torulaspota* presenta células esféricas a elipsoidales con dimensiones aproximadamente 2-4 \times 3-5 μm como se observa en la figura 2, este género se reproduce de manera asexual por división celular, y puede producir Pseudo hifas, pero no hifas reales y su reproducción sexual es mediante la

producción de hasta 4 ascosporas esféricas. Esta levadura fermenta la glucosa y otros azúcares, pero no asimila nitratos (Benito, 2018).

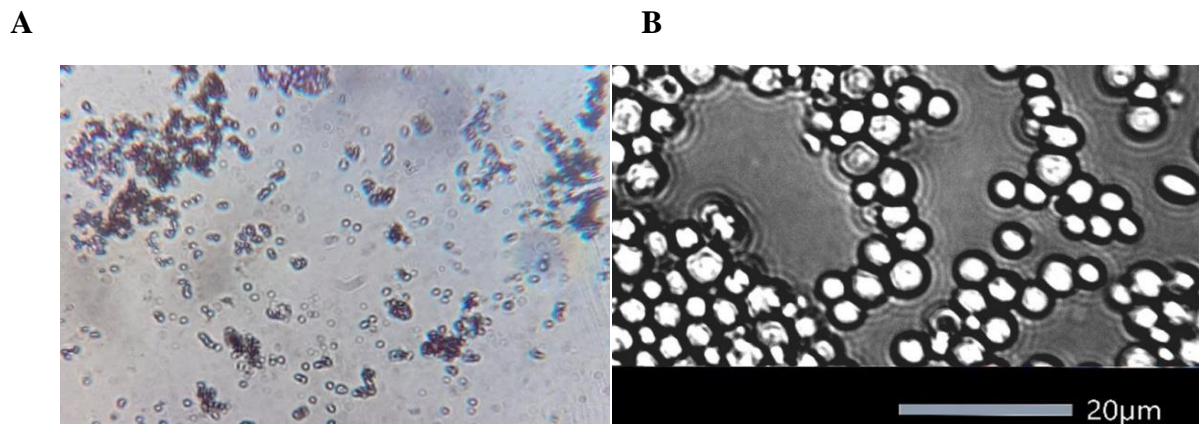


Figura 2. Observación microscópica de células de *Torulaspora delbrueckii* (figura A obtenida por los autores en el laboratorio de la Universidad Surcolombiana, figura B a 20 µm; obtenida por Benito, 2018).

4.1.3 *Kluyveromyces Marxianus*

Se reproducen por gemación; esferoidal, ovoide, elipsoidal, ocasionalmente cilíndrica; tamaño más grande, ~ 4-8 µm apreciado en la figura 3; ocurren individualmente, en pares o en pequeños grupos o cadenas; se pueden producir pseudohifas, esta levadura puede crecer hasta en una temperatura de 48°C (UCDAVIS, 2018).

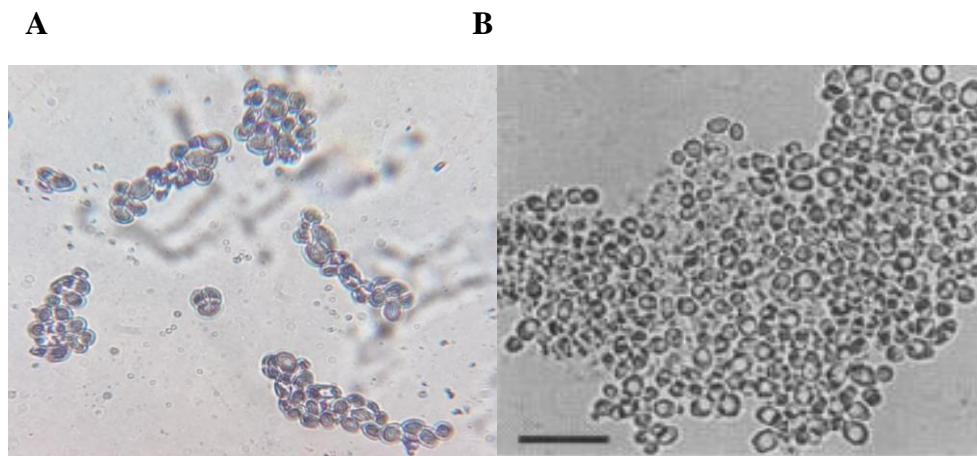


Figura 3. Observación microscópica de células de *Kluyveromyces Marxianus* (figura A obtenida por los autores en el laboratorio de la Universidad Surcolombiana, figura B a 15µm; obtenida por Moreira et al., 1998).

4.2 Ensayo cinética de crecimiento.

Para el crecimiento y desarrollo de las levaduras es indispensable proporcionar condiciones idóneas como el control de temperatura que puede oscilar entre los 25 y 30 °C, teniendo en cuenta que ésta debe permanecer constante durante su incubación, un medio con suficiente humedad, protegerlos de la radiación

e iluminación solar y las condiciones de pH pueden oscilar entre 4,5 y 5,5, debido que contribuyen a la inhibición de bacterias (García, 2004).

Durante la prueba de cinética de crecimiento de las levaduras se pudo observar como las levaduras presentaron un crecimiento exponencial a través del tiempo. Cuando las levaduras se inoculan en un medio nutritivo sólido adecuado, las células viables son capaces de desarrollar y formar un grupo microscópico, visible a simple vista, llamado colonia. (Ribéreau-Gayon et al., 2006). A continuación, se muestra las gráficas de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en el transcurso del tiempo. Además, se tomaron datos de absorbancia para determinar la cantidad de células presente en el medio de cada una de las levaduras (Figura 4, 6 y 8).

4.2.1 Curva de crecimiento *Pichia Farinosa*

La curva de crecimiento microbiano de la levadura *Pichia Farinosa* (figura 4) presenta un comportamiento creciente dividido en 3 fases. La primera es la fase de latencia, que, a diferencia de las demás levaduras estudiadas, ésta presenta actividad o multiplicación celular en menor lapso de tiempo, dado a las 2 horas de la prueba de cinética de crecimiento. La fase de crecimiento exponencial inicia a partir de las 2 horas hasta aproximadamente las 28 horas con un valor de densidad óptica igual a 1,1 nm, una vez pasada las 28 horas, la proliferación celular disminuye considerablemente; por lo tanto, se considera que se encuentra en la fase estacionaria; sin embargo, el valor de densidad óptica oscila entre 1,1 a 1,14 nm hasta la hora 48.

En la figura 5 se presenta la curva de crecimiento para la levadura *Pichia Pastoris*, con un periodo de evaluación de aproximadamente 50 horas con absorbancia a 600nm, es válido realizar la comparación dado que ambas pertenecen al mismo género y pueden presentar el mismo comportamiento alcanzando una absorbancia de 18 nm a las primeras 20 horas aproximadamente. Se logra identificar que la fase de adaptación es nula para este género de levadura coincidiendo en ambas curvas (figura 4 y 5), es decir, logra un crecimiento o desarrollo celular a partir de las primeras horas de la prueba de cinética de crecimiento hasta la hora 20 – 25; sin embargo, en la curva realizada por Amador (2005) cambia de fase de crecimiento exponencial a fase estacionaria a la hora 18 aproximadamente, a diferencia de la curva obtenida en la presente investigación, la levadura mantiene su fase estacionaria después de la hora 28 hasta terminar la prueba.

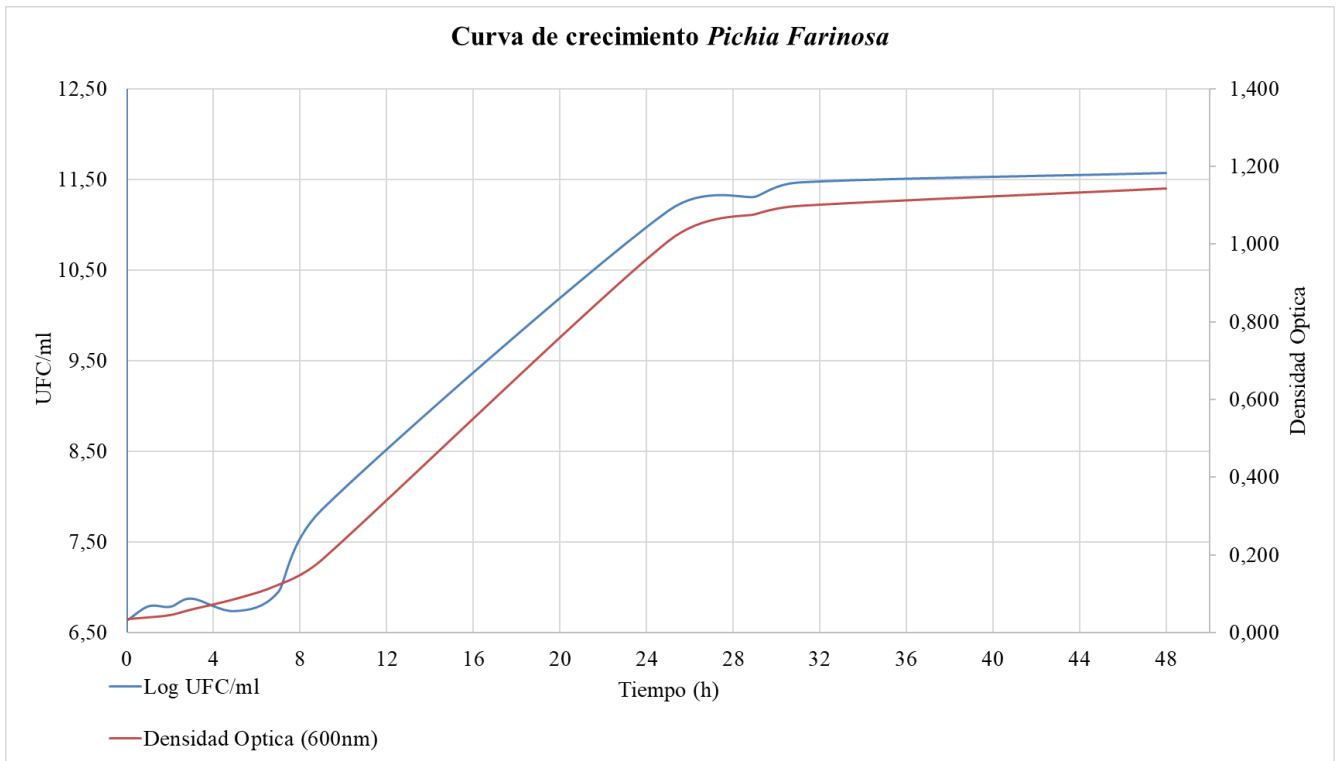


Figura 4. Curva de crecimiento de la levadura *Pichia Farinosa*.

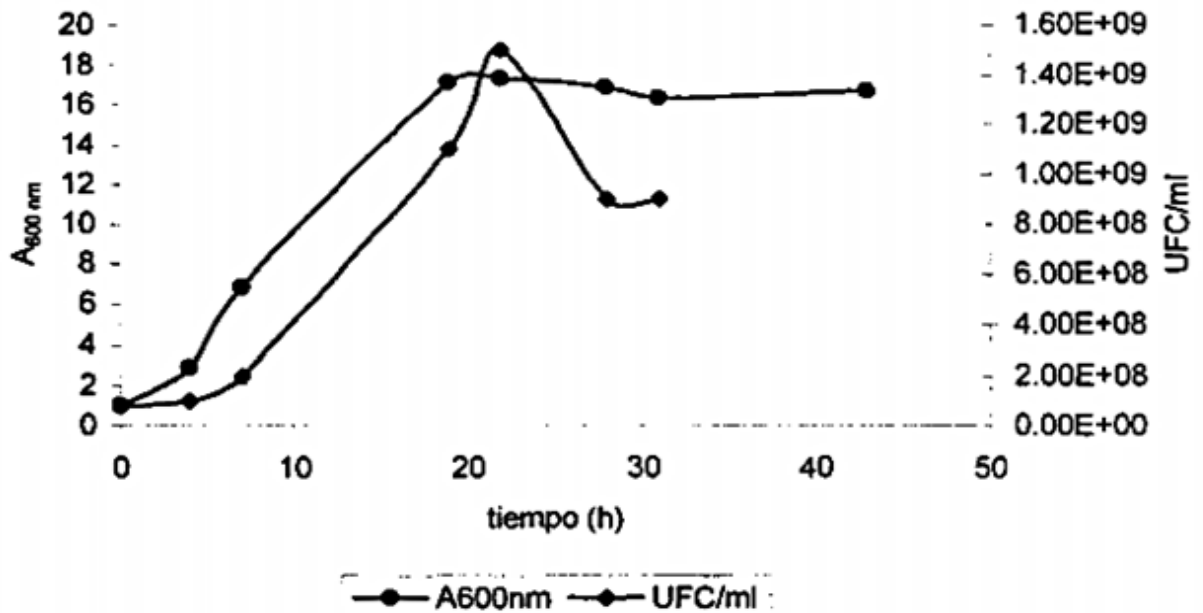


Figura 5. Curva de crecimiento de *Pichia Pastoris*. Se muestran los datos obtenidos para la cuantificación de biomasa mediante absorbancia a 600nm (A_{600nm}) y unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) (Amador, 2005).

4.2.2 Curva de crecimiento *Torulaspora Delbrueckii*

De acuerdo con los resultados de densidad óptica a 600 nm para la levadura *Torulaspora delbrueckii* se realizó la curva de crecimiento microbiano como se muestra en la figura 6 y comparando el comportamiento de la levadura con los obtenidos por Randez Gil (figura 7) y otros en su investigación denominada “Utilización de cepas de *Torulaspora delbrueckii* en la producción de masas dulces” en el año 2004, se tiene que presentan el mismo patrón con tres fases definidas encontrándose en ambos casos la fase de latencia o adaptación, fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria en las primeras 40 horas, a pesar de que los valores de densidad óptica son diferentes, se puede tomar como referencia debido a que esta variación puede ser causada por el origen de la levadura o la cantidad de levadura inoculada, a continuación se describe el comportamiento en cada una de las fases. Durante las primeras 8 horas de la prueba cinética de crecimiento microbiano la levadura se encuentra en un periodo de adaptación o latencia, es decir, el microorganismo se está adaptando al medio para iniciar su crecimiento celular en esta fase se alcanza un valor de densidad óptica igual a 0,031 nm. Después de 8 hasta aproximadamente las 27 horas, la población se duplicó a medida que avanzó el tiempo, aumentando de manera proporcional la densidad óptica, con un valor final de 0,7 nm obteniendo como resultado 19 horas de crecimiento microbiano. Posteriormente, llega a la fase estacionaria; debido al gran consumo de nutrientes por la población microbiológica se detiene el crecimiento exponencial hasta completar las 48 horas de la prueba de cinética de crecimiento manteniendo valores de densidad óptica en un rango de 0,7 a 0,743 nm.

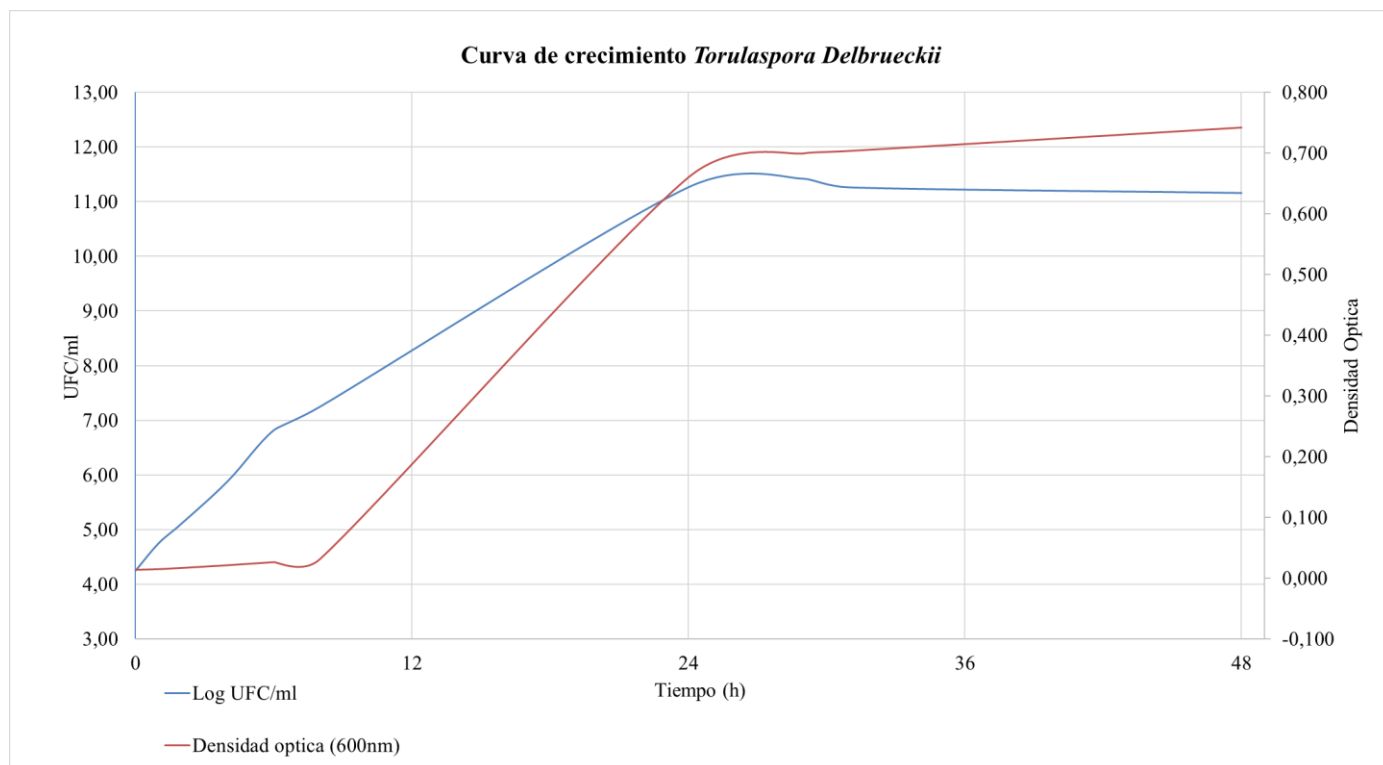


Figura 6. Curva de crecimiento de la *Torulaspora Delbrueckii*.

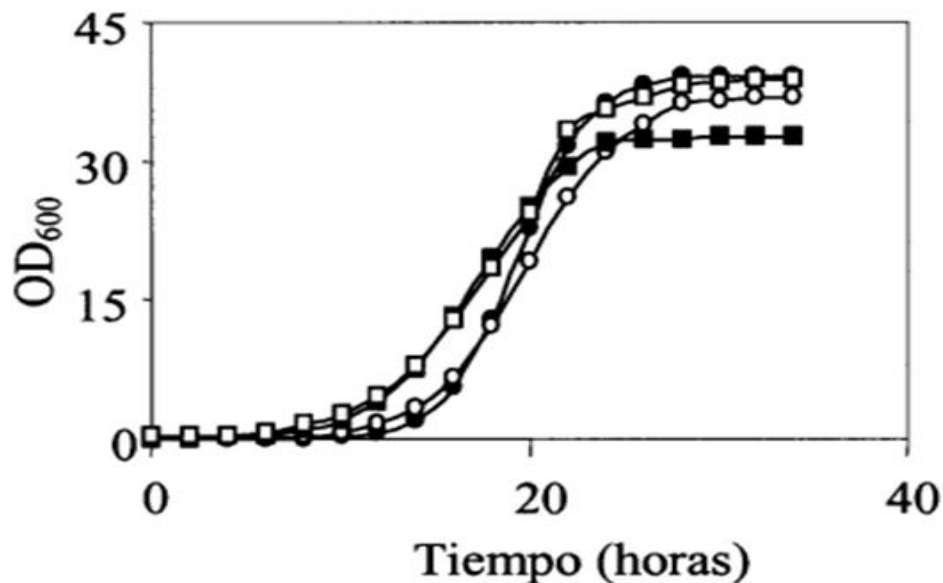


Figura 7. Curva de crecimiento a 30°C en medios industriales de melaza de las cepas *Torulaspora delbrueckii*, IGC5321 (●) e IGC5323 (○) y de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Cinta Roja (■) y Plus Vital (□) (Randez Gil et al., 2004).

4.2.3 Curva de crecimiento *Kluyveromyces Marxianus*

De acuerdo con los datos obtenidos en la *Kluyveromyces Marxianus* estudiada en el presente proyecto se pueden comparar con los datos encontrados por Zumbado y colaboradores (figura 9) curvas de crecimiento microbiano de las levaduras *S. cerevisiae*, *K.marxianus*, *C.Kefyr* aislada de suero de queso y evaluadas a 620 nm.

Se observa que la levadura *Kluyveromyces Marxianus* finaliza su fase de adaptabilidad cerca de las 7 horas con un rango menor a 1,0 nm presentando el mismo comportamiento en las figuras 8 y 9, el tiempo en la fase exponencial dura alrededor de 8 horas para la levadura *K. marxianus* estudiada por (Zumbado et al., 2006) alcanzando un rango mayor a 5,0 nm a diferencia de la levadura *Kluyveromyces Marxianus* que tiene un tiempo de crecimiento exponencial de 13 horas alcanzando un rango aproximado de 1,0 nm.

Para el tiempo de la fase estacionaria se observa que la levadura *K. marxianus* estudiada por (Zumbado et al., 2006) se mantiene entre 6,0 y 5,0 nm por un periodo de 29 horas aproximadamente, para la levadura *Kluyveromyces Marxianus* se observa que en la fase estacionaria se mantiene entre 1,20 y 1,00 nm por un periodo de 30 horas.

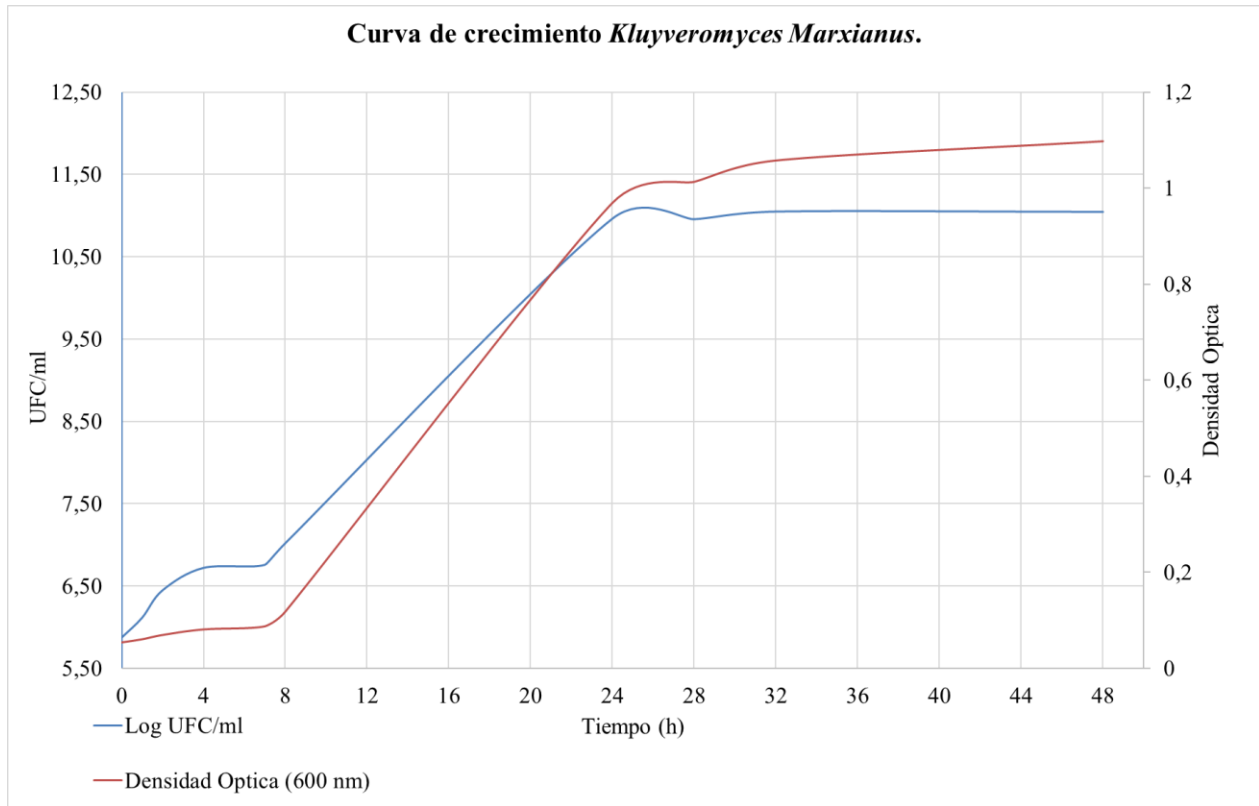


Figura 8. Curva de crecimiento de la levadura *Kluyveromyces Marxianus*.

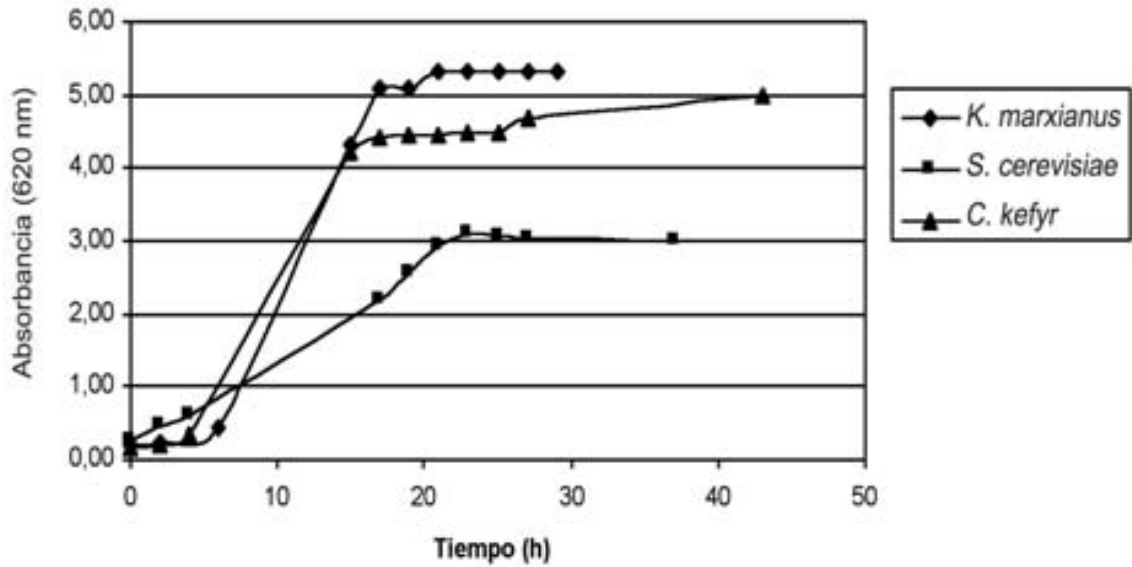


Figura 9. Levaduras en suero de queso. (Zumbado *et al.*, 2006).

Es de resaltar la importancia de obtener la cinética de crecimiento por cada cepa microbiana dado que por su origen presentan comportamientos diferentes a las encontradas en las fuentes consultadas. Además, al relacionar los valores de Densidad Óptica y UFC/ml facilitan trabajos posteriores ya que la medida de Densidad Óptica es más inmediata que la cuantificación de viabilidad en placa.

4.3 Ensayo actividad antimicrobiana.

La actividad inhibidora de las levaduras fue descubierta por Hayduck en el año 1909. Rima Steve e Ismail (2012) afirman que además de contribuir a la nueva percepción de sabor y aromas en alimentos fermentados poseen actividades antagonistas hacia bacterias y hongos indeseables, actuando gracias a la competitividad por los nutrientes, acidificación de su medio de crecimiento, tolerancia a altas concentraciones de etanol y liberación de compuestos antibacterianos; sin embargo, se han realizado pocos estudios para identificar los mecanismos de inhibición por las levaduras.

4.3.1 Método de discos.

Las células de las levaduras *Pichia Farinosa*, *Torulaspora Delbrueckii* y *Kluyveromyces Marxianus* no inhiben *Salmonella typhimurium* ATCC 9270, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC 25931, mientras que los antibióticos Bencilpenicilina 1'200.000 Ui y Cloranfenicol 250 mg afectaron el crecimiento de los patógenos siendo más efectivo el Cloranfenicol como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Inhibición del crecimiento del patógeno con el método de difusión de discos.

Patógenos	Inhibición (mm)				
	Actividad antimicrobiana (mm)			Antibiogramas (mm)	
	<i>Pichia Farinosa</i>	<i>Torulaspora Delbrueckii</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Bencilpenicilina 1'200.000 Ui (A)	Cloranfenicol 250 mg (B)
<i>Salmonella</i>	0	0	0	29,5 ± 0,84	39,6 ± 0,7
<i>K.Pneumoniae</i>	0	0	0	0	13,47 ± 0,37
<i>S.aureus</i>	0	0	0	25,3 ± 1,13	32,81 ± 0,8
<i>E.coli</i>	0	0	0	13,7 ± 0,72	34,33 ± 1,52
<i>S. Sonnei</i>	0	0	0	0	28,53 ± 1,65

4.3.2 Método de pocillos.

Las células de las levaduras *Pichia Farinosa*, *Torulaspora Delbrueckii* y *Kluyveromyces Marxianus* no inhiben *Salmonella typhimurium* ATCC 9270, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella sonnei* ATCC 25931, mientras que los antibióticos Bencilpenicilina 1'200.000 Ui y Cloranfenicol 250 mg afectaron el crecimiento de los patógenos siendo más efectivo el Cloranfenicol como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Inhibición del crecimiento del patógeno con el método de difusión de pocillos

Patógenos	Inhibición (mm)				
	Actividad antimicrobiana (mm)			Antibiogramas (mm)	
	<i>Pichia Farinosa</i>	<i>Torulaspora Delbrueckii</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Bencilpenicilina 1'200.000 Ui (A)	Cloranfenicol 250 mg (B)
<i>Salmonella</i>	0	0	0	31,36 ± 0,57	48,35 ± 1,07
<i>K.Pneumoniae</i>	0	0	0	0	19,98 ± 0,23
<i>S.aureus</i>	0	0	0	23,45 ± 1,48	42,18 ± 0,64
<i>E.coli</i>	0	0	0	17,41 ± 0,33	44,56 ± 1,44
<i>S. Sonnei</i>	0	0	0	0	31,75 ± 1,8

Los antibióticos Bencilpenicilina 1'200.000 Ui y Cloranfenicol 250 mg si inhibieron las levaduras *Pichia Farinosa*, *Torulaspora Delbrueckii* y *Kluyveromices Marxianus*, siendo más efectivo el cloranfenicol. Las cepas de levadura al presentar sensibilidad a los antibióticos evidencian no ser de riesgo en la transferencia de genes de resistencia a antibióticos.

Tabla 3. Inhibición del crecimiento de las levaduras con el método de difusión de pocillos

Levaduras	Antibiogramas (mm)	
	Bencilpenicilina 1'200.000 Ui (A)	Cloranfenicol 250 mg (B)
<i>Pichia Farinosa</i>	31,36 ± 0,57	48,35 ± 1,07
<i>Torulaspora Delbrueckii</i>	0	19,98 ± 0,23
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	23,45 ± 1,48	42,18 ± 0,64

4.4 Fermentación del café con levaduras

Para cada uno de los tratamientos se inocularon las siguientes cantidades de levadura, midiendo las UFC/ml al inicio y final de la fermentación.

Tabla 4. UFC/ml de las levaduras agregadas al inicio y final de la fermentación.

Levadura	Tratamiento	Inicio		Final	
		UFC/ml	Log UFC ml ⁻¹	UFC/ml	Log UFC ml ⁻¹
<i>Pichia Farinosa</i>	T1R1	6,98E+08	8,12	2,70E+10	10,43
	T1R2	5,16E+09	9,54	2,83E+11	10,56
	T1R3	1,05E+09	8,27	2,46E+11	10,52
	T2R1	8,71E+09	9,68	3,33E+11	11,30

<i>Torulaspora Delbrueckii</i>	T2R2	1,12E+08	7,72	5,80E+10	10,60
	T2R3	2,83E+09	8,61	3,24E+09	9,23
<i>Kluyveromyces Marxianus</i>	T3R1	3,12E+09	8,53	3,48E+10	9,69
	T3R2	8,59E+07	7,64	7,18E+10	10,05
	T3R3	8,56E+09	9,63	6,94E+10	9,91
Testigo	Testigo 1			1,45E+11	10,42
	Testigo 2			1,07E+11	10,31
	Testigo 3			2,18E+11	10,55

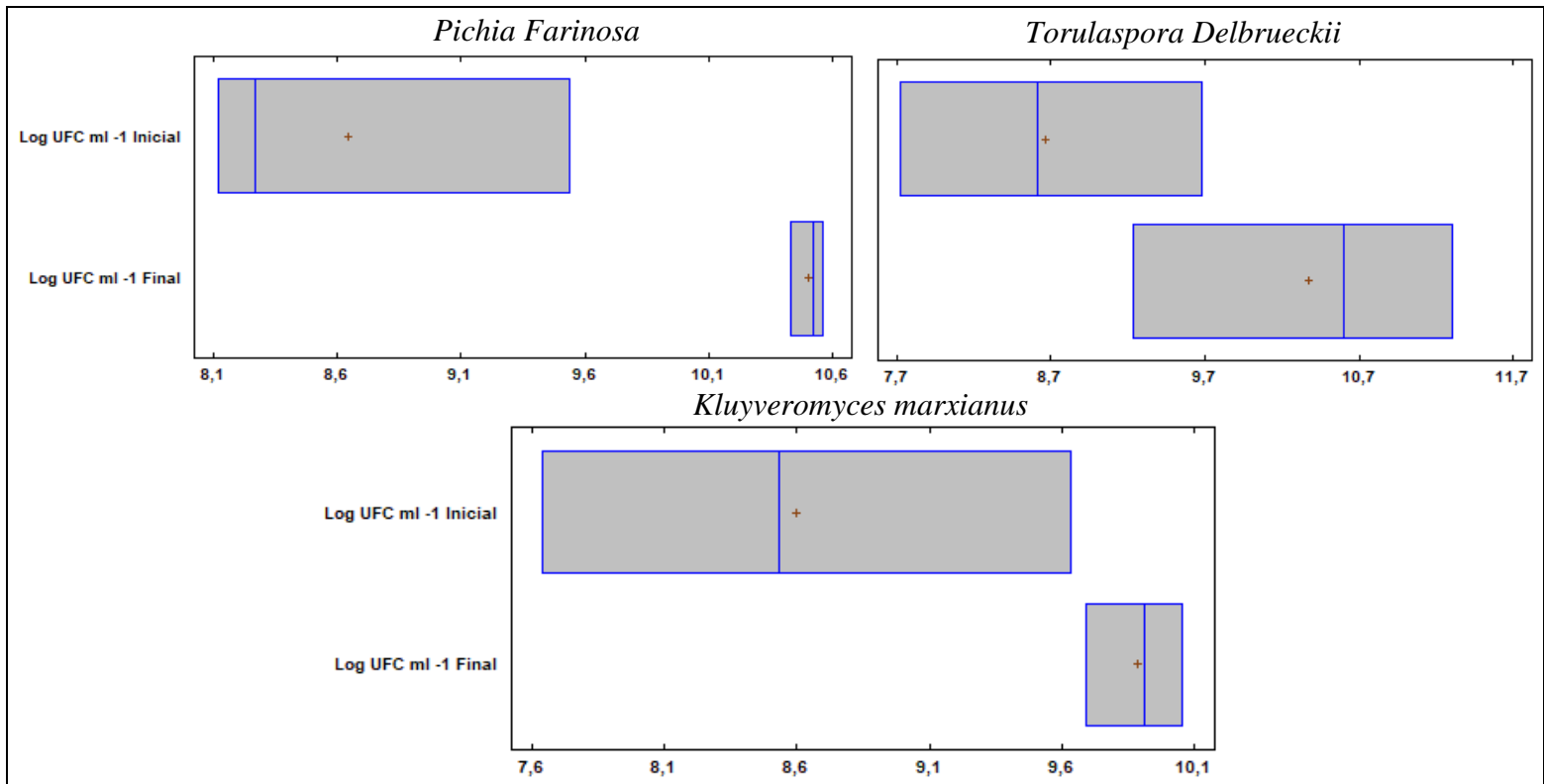


Figura 10. Caja y bigotes comparando las medias de Log UFC ml -1 al inicio y final de la fermentación de las levaduras

Tabla 5. Prueba de hipótesis de las medias de Log UFC ml -1 al inicio y final de la fermentación de las levaduras

	<i>Pichia Farinosa</i>	<i>Torulaspota Delbrueckii</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	Prueba t		
Hipótesis Nula	Media iguales	Media iguales	Media iguales
Hip. Alternativa	Media diferentes	Media diferentes	Media diferentes
Estadístico t	-4,11453	-2,05373	-2,19378
Valor-P	0,0146777	0,109226	0,0932968
	Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05	No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05	No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05

El crecimiento de levaduras en Log UFC ml -1 al inicio y final de la fermentación presentó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para la *Pichia Farinosa* (Tabla 5; Figura 10) con un nivel de confianza del 95%

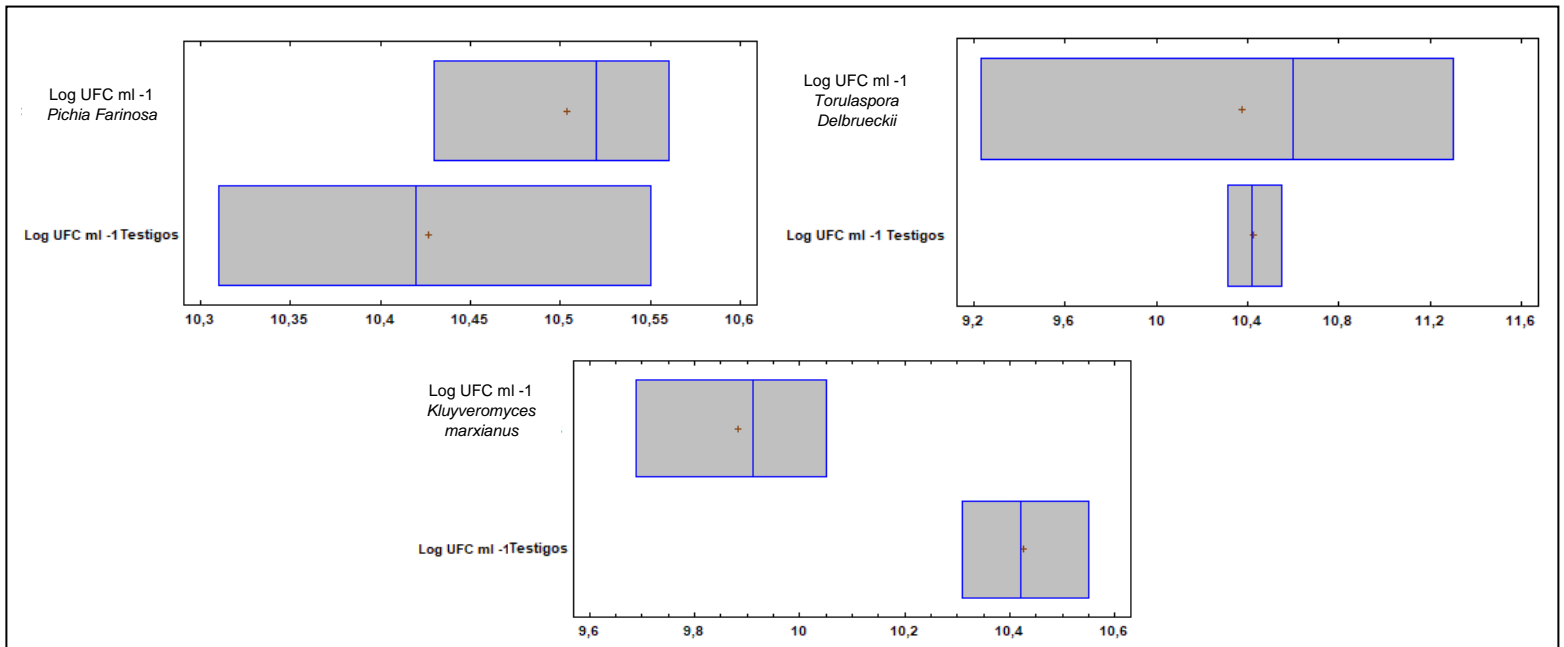


Figura 11. Caja y bigotes comparando las medias de Log UFC ml -1 de las levaduras con los testigos

Tabla 6. Prueba de hipótesis de las medias de Log UFC ml⁻¹ Log UFC ml⁻¹ de las levaduras con los testigos

	<i>Pichia Farinosa</i> – Testigos	<i>Torulaspora Delbrueckii</i> - Testigos	<i>Kluyveromyces marxianus</i> - Testigos
	Prueba t		
Hipótesis Nula	Media iguales	Media iguales	Media iguales
Hip. Alternativa	Media diferentes	Media diferentes	Media diferentes
Estadístico t	0,966762	-0,0817199	-4,32405
Valor-P	0,388409	0,938795	0,0124076
	No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05	No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05	Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05

Como se observa en los gráficos de caja de bigotes en la Figura 11, existe diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los *Kluyveromyces marxianus* y los testigos donde los datos obtenidos no se cruzan entre ellos, y en la prueba de hipótesis de medias (Tabla 6) se rechaza la hipótesis nula con un valor de $P < 0,05$ con un nivel de confianza del 95%.

4.4.1 Grado de madurez en la cereza de café

Antes de la fermentación se obtuvieron tres mediciones de las coordenadas L^* , a^* y b^* las cuales fueron analizadas por el software Nix Color Sensor para obtener el color del grano como se observa en Tabla 7 y se comparó con la Tabla 8 para determinar el grado de madurez por color, adicional se determinó el ángulo de tonalidad (h^*) e índice de saturación (C^*) como se puede observar en la tabla 9.

Tabla 7. Coordenadas LAB e interpretación del color





Muestras tomadas	Coordenadas LAB		Color
	L*		
1	L*	34,8	
	a*	29,23	
	b*	16,02	
2	L*	37,2	
	a*	15,4	
	b*	12,84	
3	L*	32,69	
	a*	25,84	
	b*	9,51	
Promedio	L*	34,9	
	a*	23,5	
	b*	12,8	

Tabla 8. Caracterización de los estados de desarrollo y color medio de los frutos de café var. Colombia (Carvajal, J. et al., 2011)



Tabla 9. Determinación del grado de madurez por luminosidad, ángulo de tonalidad, índice de saturación.

Fuente	Juárez, A. et al., 2018			Carvajal, J. et al., 2011			Promedio Investigación		
	L*	h*	C*	L*	h*	C*	L*	h*	C*
Maduros	31,47	31,15	24,18	35,94	32,86	21,77	34,9 ± 2,25	29,55 ± 9,84	27,1 ± 6,7
Sobremaduros	-	-	-	30,50	15,74	10,12			

Para Juárez y colaboradores en el 2018 los granos maduros presentan coloración rojiza con luminosidad (L*) de 31,47 valor de tono (h*) igual a 31,15 e índice de saturación (C*) de 24,18. pero para Carvajal y

colaboradores en el 2011 los frutos maduros presentan coloración rojiza con luminosidad (L*) de 35,94 con valor de tono (h*) igual a 32,86 e índice de saturación (C*) de 21,40 y 21,77; y, los frutos sobremaduros presentan una coloración rojiza-marrón con luminosidad de 30,5 con valor de tono (h*) igual a 15,74 e índice de saturación (C*) de 10,12.

Comparando los datos obtenidos en luminosidad, ángulo de tonalidad, índice de saturación (Tabla 7) y gama de colores expuestas por Juárez, Carvajal y colaboradores se determina que el grano estaba en el grado de madurez de maduro y sobremaduro Tabla 7.

4.4.2 Potencial de Hidrogeniones (pH) y Sólidos solubles (°Brix)

Se registraron los valores de potencial de hidrogeniones (pH) y sólidos solubles (°Brix) antes y después de la fermentación encontrando los siguientes resultados.

Tabla 10. Valores promedio de las condiciones de pH y solidos solubles antes de la fermentación

Parámetro	pH	°Brix
cereza de café	5,50 ± 0,19	12,00 ± 1,00
café despulpado(baba)	5,48 ± 0,08	15,17 ± 0,29

Tabla 11. Valores promedio de las condiciones de pH y solidos solubles después de la fermentación.

Tratamiento	pH	Sólidos solubles (°Brix)
T1R1	3,99 ± 0,05	15,03 ± 0,25
T1R2	3,74 ± 0,08	14,3 ± 0,28
T1R3	3,65 ± 0,00	14,57 ± 0,21
T2R1	3,95 ± 0,17	14,23 ± 0,05
T2R2	3,75 ± 0,01	14,60 ± 0,08
T2R3	3,99 ± 0,04	15 ± 0,08
T3R1	3,70 ± 0,01	14,30 ± 0,5
T3R2	3,77 ± 0,06	14,40 ± 0,08
T3R3	3,89 ± 0,10	14,67 ± 0,26
Testigo 1	3,96 ± 0,11	14,03 ± 0,05
Testigo 2	4,02 ± 0,09	12,83 ± 0,09
Testigo 3	4,07 ± 0,14	13,70 ± 0,16

López et. al. (2015) realizó el registro de los valores de pH y solidos solubles durante 80 horas continuas en el proceso de fermentación de café y encontró que estos presentan una disminución en función del tiempo afectando de manera positiva la calidad de la bebida, en un tiempo aproximado de 50 a 60 horas. Puerta (2013), cuantificó concentraciones de azúcares, acidez y etanol del mucílago de café durante 74 h de fermentación a temperatura ambiente y evidenció cambios en la concentración de azúcares presentes en el mucílago y etanol producido en la reacción. Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con lo publicado por López et. al. (2015) y Puerta (2013) donde inicialmente se obtuvieron valores de 5,48 ± 0,08 y 15,17 ± 0,29 de pH y solidos solubles respectivamente en café despulpado y luego de 30 horas de

fermentación con la adición de las levaduras se determinaron pH y sólidos solubles inferiores; sin embargo, hubo variación en los resultados para algunos de los tratamientos como se muestra en la tabla 11.

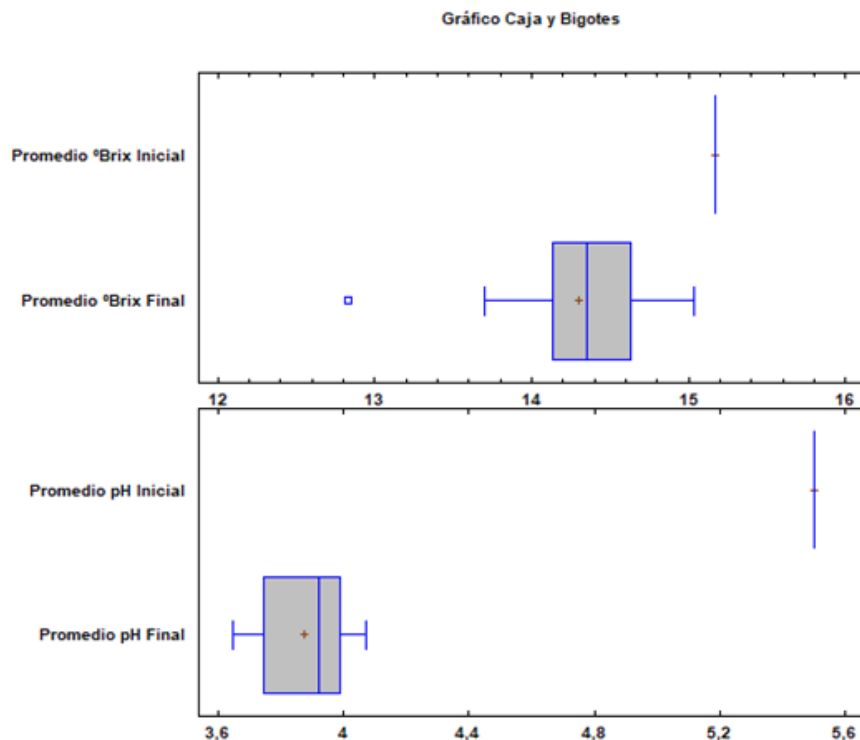


Figura 12. Caja y bigotes comparando las medias de sólidos solubles pH y al inicio y final de la fermentación

Tabla 12. Prueba de hipótesis de las medias de pH y sólidos solubles al inicio y final de la fermentación.

	pH	Sólidos Solubles
	Prueba t	
Hipótesis Nula	Media iguales	Media iguales
Hip. Alternativa	Media diferentes	Media diferentes
Estadístico t	39,429	5,0124
Valor-P	0	0,0000511256
Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.		

Como observamos en el gráfico de caja de bigotes en la figura 12, existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en pH y sólidos solubles entre la condición inicial y final de la fermentación, donde

los datos obtenidos no se cruzan entre ellos, y en la prueba de hipótesis de medias (Tabla 12) se rechaza la hipótesis nula con un valor de $P < 0,05$ con un nivel de confianza del 95%.

4.6 Identificación de hongos filamentosos en café pergamino seco.

Todas las placas presentaron crecimiento de hongos, del género *Penicillium spp* (subgénero) identificando las especies *P. divaricate* (*Furcatum*), *P. biverticillate* (*Bivercitillium*), *P. quaterverticillate* (*Penicillium*), *P. monoverticillate* (*Aspergilloides*). Se clasificaron según los patrones de ramificación de conidióforos observados en *Penicillium* por (Viasagie *et al.*, 2014). Este tipo de hongos representan un riesgo para la inocuidad del producto final, ya que puede producir micotoxinas por la multiplicación de estos, principalmente durante la precosecha y almacenamiento de los granos (Rojas, L. C. *et al.*, 2015).

Tabla 13. Principales micotoxinas producidas por *Penicillium spp* (Martínez, B. E., 2004)

Micotoxina	Subgénero	Principales especies productoras
Ácido ciclopiazónico	<i>Penicillium</i>	<i>P. camemberti</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. griseofulvum</i>
Ácido penicílico (AP)	<i>Penicillium</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. viridicatum</i>
	<i>Furcatum</i>	<i>P. simplicissimum</i> ^a
Citrinina (CIT)	<i>Penicillium</i>	<i>P. expansum</i> , <i>P. verrucosum</i>
	<i>Furcatum</i>	<i>P. citrinum</i>
Ocratoxina A (OA)	<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i> ^b
Patulina	<i>Penicillium</i>	<i>P. expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i>
Penitrems	<i>Penicillium</i>	<i>P. crustosum</i> , <i>P. glandicola</i> ^c
	<i>Furcatum</i>	<i>P. canescens</i> ^a , <i>P. janczewskii</i> ^{ac}
Roquefortina C	<i>Penicillium</i>	<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. expansum</i>
		<i>P. griseofulvum</i> , <i>P. hirsutum</i> , <i>P. hordei</i>
		<i>P. roqueforti</i>
Toxina PR	<i>Penicillium</i>	<i>P. roqueforti</i>

El ácido ciclopiazónico, podría estar presente en alimentos de origen animal (carne, leche) y en alimentos fermentados (quesos, embutidos) que contribuirían a incrementar la ingesta y el riesgo de exposición a esta micotoxina (Vaamonde, 2008). Aunque no existe evidencia de toxicidad en humanos, su presencia en alimentos debería ser evitada. El ácido penicílico (AP) la presencia de esta micotoxina de forma natural en distintos cereales y leguminosas. La citrinina (CIT) se aísla de diversos tipos de cereales y otros sustratos vegetales como semillas de plantas oleaginosas, utilizadas frecuentemente como materias primas en la elaboración de piensos. La ocratoxina A (OA) en cereales, principalmente trigo y cebada. La patulina no parece tener efectos crónicos en el hombre, pero su importancia radica en la elevada frecuencia y cantidad con qué se detecta en zumos y otros productos derivados de manzana. Los penitrems, no se conocen casos de este tipo de toxicidad por ingestión de alimentos donde se aísla *P. crustosum*, esto puede ser debido a que la micotoxina sólo se produce a altos niveles de humedad (la a_w mínima requerida para su producción es de 0,92 y la óptima alrededor de 0,995), el *P. glandicola*, también productora no es de aparición frecuente

en alimentos, aunque sí se aísla con relativa frecuencia de muestras de cereales. La toxicidad de la roquefortina C es baja, de hecho, esta toxina se encuentra en estos productos, en los que además presenta una importante estabilidad, la búsqueda de cepas de *P. roqueforti* que no produzcan esta toxina ha resultado, por el momento, infructuosa; sin embargo, no han sido descritos efectos adversos del consumo de quesos azules, la aparición de roquefortina C de forma natural se ha observado en otros productos, como granos de cereal. La producción de la toxina PR se ha observado en cantidades considerables en cultivo puro. En la fabricación de quesos, en los que la molécula parece ser muy inestable, se ha encontrado únicamente en cantidades muy bajas (Martínez, B. E., 2004).

Según Rojas, L. C. y colaboradores, el desarrollo de los hongos en el beneficio del café está condicionado por diferentes variables fisicoquímicas (pH, porcentaje de humedad y Aw). La Aw a partir de la cual se presenta mayor desarrollo de los hongos es $>0,43$, y un amplio valor de pH entre 3 y 8.

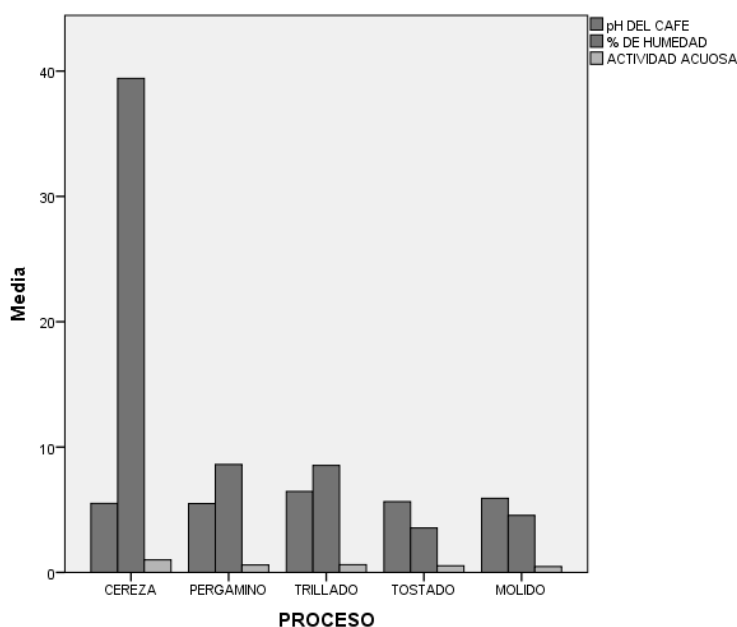


Figura 13. Media de las variables fisicoquímicas según proceso. (Rojas, L. C. *et al.*, 2015)

En las imágenes a color de las figuras 14 a 26 se muestra los hongos identificados en la presente investigación.

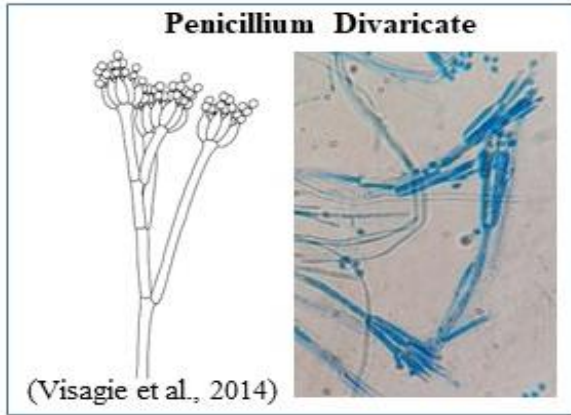


Figura 14. Hongo encontrado en el tratamiento T1R1

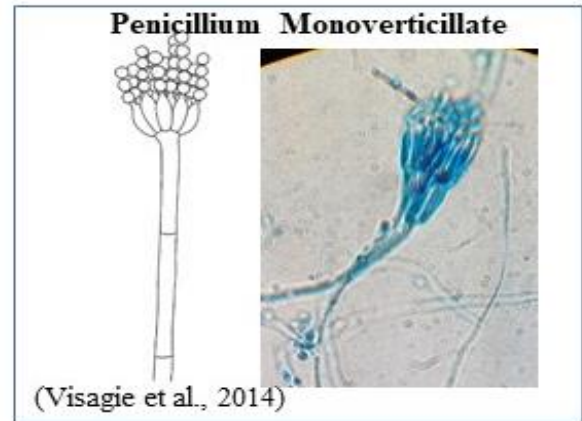


Figura 17. Hongo encontrado en el tratamiento T2R1

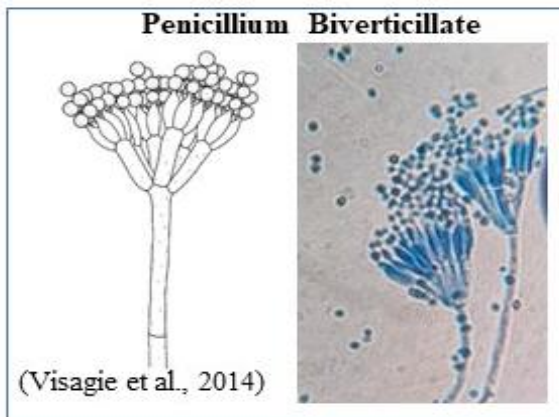


Figura 15. Hongo encontrado en el tratamiento T1R2

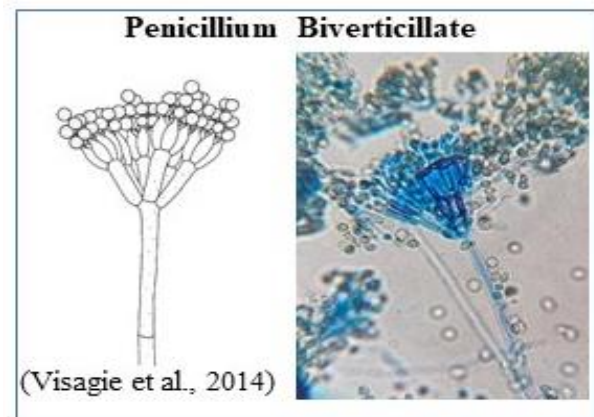


Figura 18. Hongo encontrado en el tratamiento T2R2

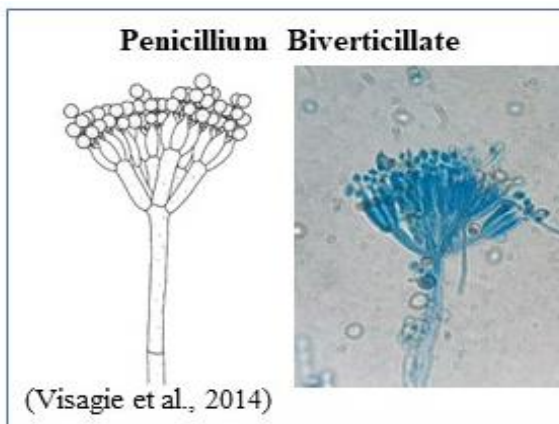


Figura 16. Hongo encontrado en el tratamiento T1R3

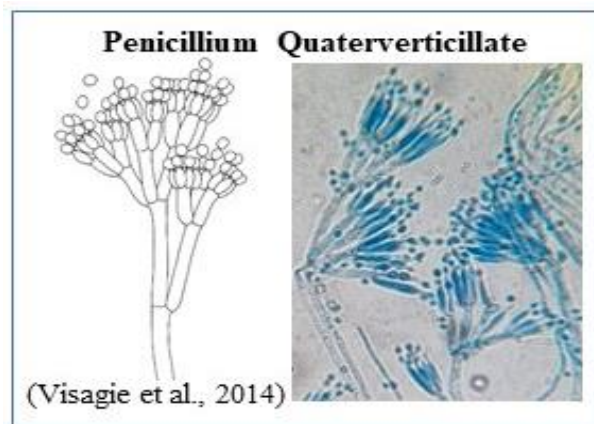


Figura 19. Hongo encontrado en el tratamiento T2R3

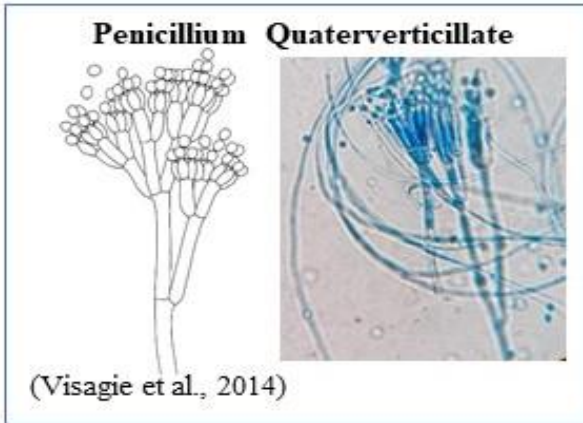


Figura 20. Hongo encontrado en el tratamiento T3R1

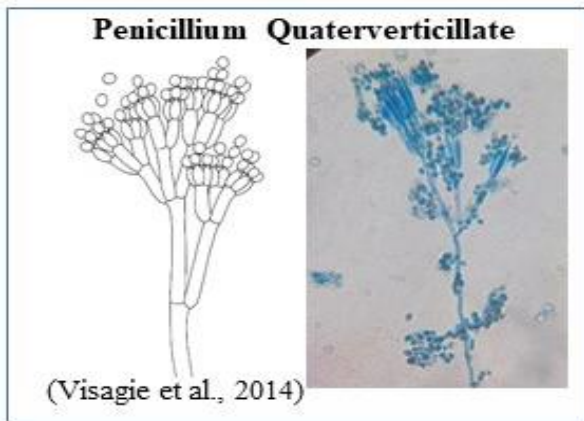


Figura 21. Hongo encontrado en el tratamiento T3R2

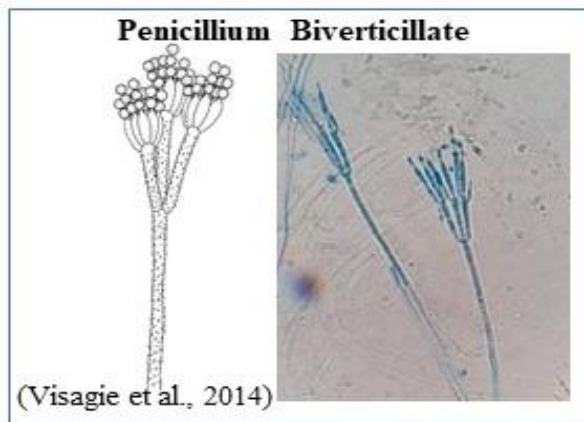


Figura 22. Hongo encontrado en el tratamiento T3R3

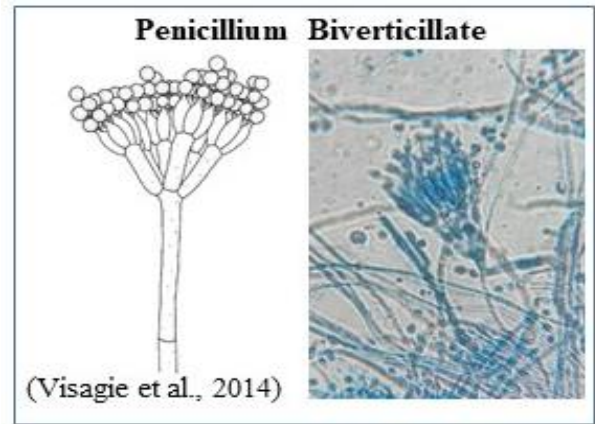


Figura 23. Hongo encontrado en el testigo 1

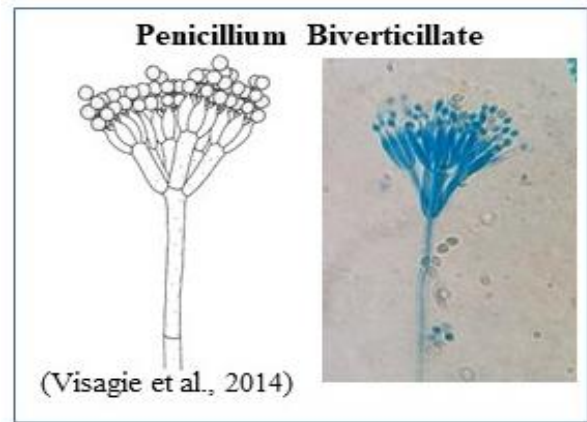


Figura 24. Hongo encontrado en el testigo 2

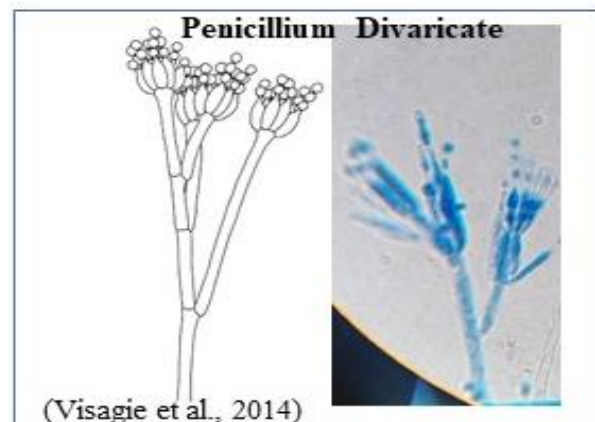


Figura 25. Hongo encontrado en el testigo 3

4.5 Análisis sensorial

En el análisis sensorial según la metodología Asociación de cafés Especiales (SCA) se logró identificar que todos los cafés presentaron puntuaciones mayores a 80 puntos excepto el Testigo 1 con 77,38 puntos (Tabla 14)

Tabla 14. Relación UFC/ml, puntaje en taza y análisis sensorial

Tratamiento	Puntaje en taza	Fragancia/aroma	Sabor	Acidez	Cuerpo
T1R1 (<i>Pichia Farinosa</i>)	83.13	Frutos rojos, dulce, chocolate, panela, cítrica, limoncillo , mentolada, caramelo	Herbal, dulce, chocolate	Media-media	Medio, medio, dulce, persistente, un poco pesado y frío
T1R2 (<i>Pichia Farinosa</i>)	81.00	Panela, cítrico, herbal fresco pronunciado	Herbal residual astringente	Media - media	Medio, medio, dulzón, un poco astringente, en frío se torna caído, biche y cerealoso
T1R3 (<i>Pichia Farinosa</i>)	83.13	Cítrico, herbal fresco, dulce, panela	Herbal cítrico	Media - media	Medio, alto, dulce persistente, en frío se torna corto e insípido
T2R1 (<i>Torulaspora Delbrueckii</i>)	82.13	Dulce, chocolate, amargo, herbal seco, cítrico, frutos secos	Notas secas, residual dulce	Media - media astringente	Medio, medio, dulzón, pulposo, en frío se torna un poco aguado
T2R2 (<i>Torulaspora Delbrueckii</i>)	84.25	Dulce, chocolate, herbal fresca, notas secas, frutos rojos pronunciada	Herbal, dulce	Media - media	Medio, medio, dulce suave, en frío se torna áspero y picante
T2R3 (<i>Torulaspora Delbrueckii</i>)	83.00	Dulce, panela, chocolate, dulce cítrico, herbal fresca	Dulce, cítrico, herbal	Media - media un poco astringente	Medio, medio, dulzón, pulposo, un tanto astringente
T3R1 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	84.38	Cítrica, dulce, hierba buena , limón, vainilla, herbal fresca, chocolate	Dulce, herbal, panela	Media - media astringente	Medio, medio, dulce pronunciado persistente, en frío se torna un poco manchoso
T3R2	80.50	Dulce, caramelo, panela, cítrico,	Dulce, residual	Media - media	Medio, medio, dulce, suave, delicado, en frío se torna un poco fugaz

<i>(Kluyveromyces marxianus)</i>		herbal fresco, vegetalosa	astringente, una taza con sabor a plástico biche		
T3R3 <i>(Kluyveromyces marxianus)</i>	82.75	Dulce, chocolate, notas herbales frescas	Herbal residual manchoso astringente	Media - media	Medio, medio, dulce, cremoso, persistente, en frío se torna un poco áspero pesado
Testigo 1	77.38	Dulce, ciruela, chocolate, cítrico, herbal, vegetaloso	Herbal, residual astringente, una taza con sabor a plástico biche	Media - media astringente	Medio, medio dulzón, en frío se torna aguado, biche cerealoso
Testigo 2	84.38	Herbal, dulce, cítrico, chocolate, caña-guarapo	Cítrico, herbal, residual, dulce	Media - media	Medio, alto, dulce, cremoso, persistente, balanceado, agradable
Testigo 3	83.75	Dulce, cítrica, herbal fresca mandarina, chocolate	Dulce, residual pronunciado	Media - media astringente	Medio, medio, dulce, un poco astringente, en frío se torna picante y astringente

5. CONCLUSIONES

En el estudio de cinética de crecimiento la levadura que obtuvo mayor crecimiento microbiano en el menor tiempo fue *Pichia farinosa* con un valor de densidad óptica igual a 1,1 nm alcanzando una población de 11,30 UFC/ml a las 28 horas. Ninguna de las levaduras estudiadas presentaron efecto antimicrobiano frente a los patógenos *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Shigella sonnei*; sin embargo, si hubo inhibición por parte de los antibióticos Bencilpenicilina 1'200.000 U.I. y Cloranfenicol 250 mg. La inoculación de *Pichia farinosa*, *Torulasporea delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus* mantiene el puntaje del café como especial al presentar calificación por encima de 80 puntos según SCA. Para el tratamiento 1 en fragancia la levadura genera atributos de frutos rojos y limonocillo, en el tratamiento 2 a frutos rojos y en el tratamiento 3 a hierbabuena. En la acidez la astringencia viene del café sin adicionar levaduras, lo cual no aparece para el tratamiento 1. Sobre el cuerpo la característica de picante, astringente, en frío se torna aguado se encuentra en el control y la adición de las levaduras no mejora dicha condición. Durante el secado, se encontró hongos del género *Penicilium spp.* identificando especies como *P. divaricate (Furcatum)*, *P. biverticillate (Bivercitillium)*, *P. quaterverticillate (Penicillium)*, *P. monoverticillate (Aspergilloides)*.

RECOMENDACIONES

Inocular las levaduras en menores cantidades al inicio de la fermentación, aumentar los tiempos de fermentación de 50 a 60 horas y trabajar con café de otras fincas cafeteras.

El café no presentó inocuidad, para ello Puerta (2006) nos presenta un sistema de aseguramiento de la calidad y la inocuidad del café en las diferentes actividades en las fincas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarenga, A. A. A., Viay, M. Y. Q., Ríos, D. F., Martínez, E. M., & Olivas, A. F., (2014). La incidencia y distribución de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café.
- Amador Lemus, M. G. (2005). Estudio de la cinética de crecimiento celular y producción de proteína extracelular de *Pichia Pastoris* (productora de hormona recombinante de crecimiento caprino) en bio-reactores.
- Amador Lemus, M. G. Estudio de la cinética de crecimiento celular y producción de proteína extracelular de *Pichia Pastoris* (productora de hormona recombinante de crecimiento caprino) en bio-reactores.
- Arrúa Alvarenga, Flores Olivas, Quezada Viay, M.Y., Cuautitlán Izcalli, Fernández Ríos, (s.f). Microbiota asociada a cafés comerciales en Veracruz, MÉXICO. CAFÉS, M. A. A. comerciales en Veracruz, México
- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., & Zapparoli, G. (2012). Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *European Food Research and Technology*, 235(2), 303-313; DOI: doi.org/10.1007/s00217-012-1762-3
- Benito, S. (2018). El impacto de la levadura *Torulaspora delbrueckii* en la vinificación. *Microbiología y biotecnología aplicadas*, 102 (7), 3081-3094; DOI: doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0
- Cafeteros, F. N. (2010). Café de Colombia. Obtenido de http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/clasificaciones_de_calidad.
- Cajiao, A. P. (2017). Aislamiento de hongos asociados al grano de café provenientes de zonas productoras en Norte de Santander-Colombia. @ *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 14(1), 49-57; DOI: doi.org/10.24054/16927125.v1.n1.2016.2125
- Camiletti, B. X. (2018). Estrategias de manejo de *aspergillus* y *penicillium* spp. Para la reducción de los niveles de micotoxinas en maíz [Universidad Nacional de La Plata].
- Carvajal, J., Aristizábal, I., Oliveros, E., & Mejía, W. (2011). Colorimetría del Fruto de Café (*Coffea arabica* L.) Durante su Desarrollo y Maduración. *Revista Facultad Nacional Agronomía- Medellín*, 64(2), 6229–6240.
- Chitupanta, C., & Liseth, E. (2018). *Obtención de bebida fermentada a base de manzana deliciosa dorada (Malus Domestica) con la utilización del cultivo kefir (Kluyveromyces Marxianus)* (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).

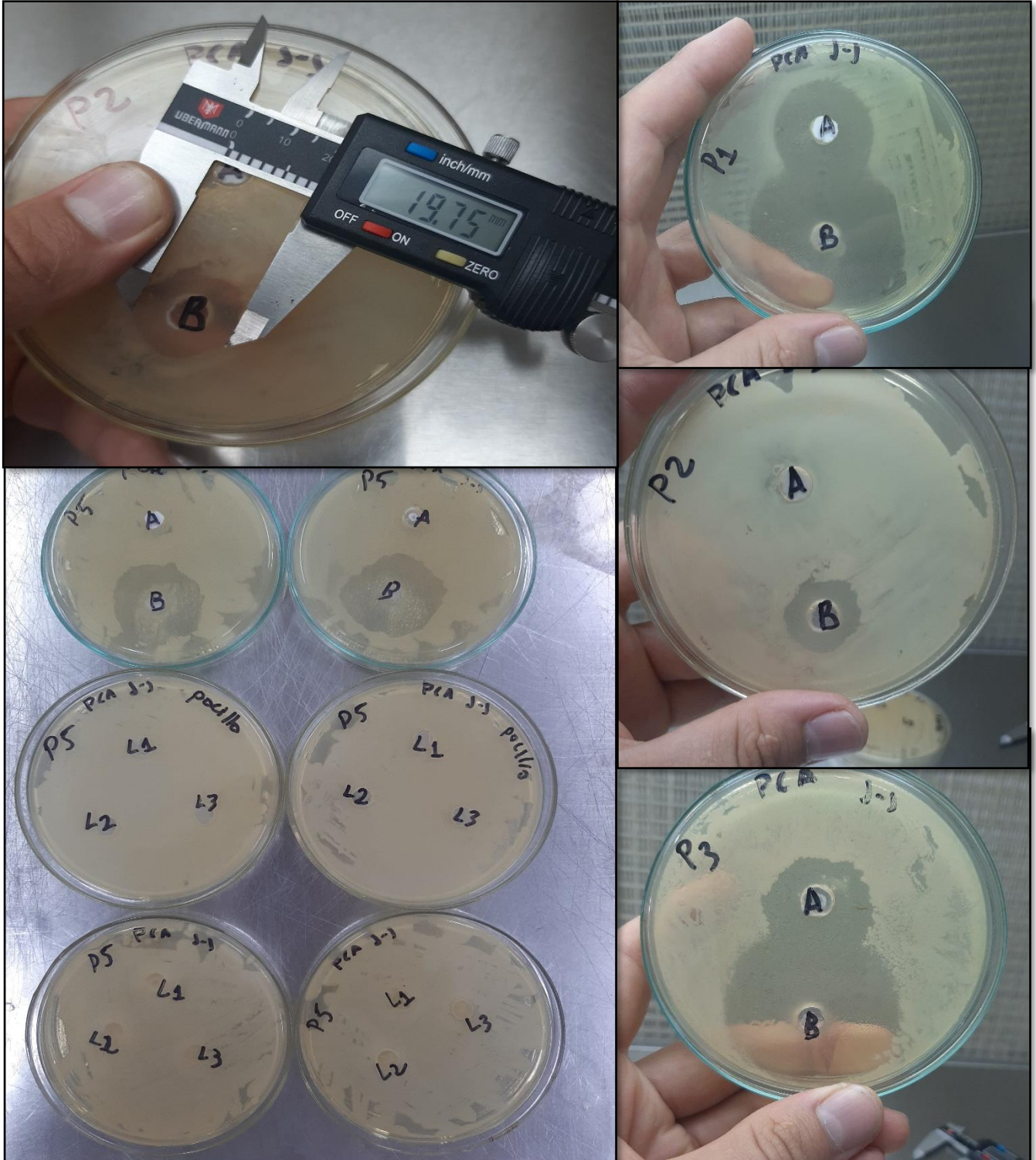
- da Mota, M. C. B., Batista, N. N., Rabelo, M. H. S., Ribeiro, D. E., Borém, F. M., & Schwan, R. F. (2020). Influence of fermentation conditions on the sensorial quality of coffee inoculated with yeast. *Food Research International*, 136, 109482; DOI: doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109482
- De Melo, G., Soccol, V., Pandey, A., Pedroni, A. Andrade, J., Gollo, A. & Soccol, C. (2014). Aislamiento, selección y evaluación de levaduras para su uso en la fermentación de granos de café por el proceso húmedo. *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos*, 188, pp 60-66.
- Federación Nacional de Cafeteros. (2017). Informes de gestión del Comité Departamentales de Cafeteros. Bogotá: Federación Nacional de Cafeteros.
- Ferreira, DDS (2019). Determinación del potencial aromático de vinos espumosos cuyos vinos base fueron elaborados con levaduras *Saccharomyces* y *Torulasporea delbrueckii*.
- García, G. M. (2004). *Biotecnología alimentaria* (Quinta edición). Distrito Federal, México: LIMUSA, S.A.
- Girón Rodríguez, F. (2012). Disipación y efectos de nuevos fungicidas sobre la fermentación y calidad de vinos tintos de Monastrell.
- Gopinandhan T., Basavaraj, y K., Raghuramulu, Y. 2013 Ochratoxin-A (OTA). Contamination in coffee-A revisit. *Indian Coffee*, Junio, 2013, 16-21
- Guerrero Gómez, L. S. (2018). Identificación y evaluación de la actividad metabólica de microorganismos contaminantes representativos de la etapa de elaboración de azúcar.
- Heussner, A. y Bingle, L. 2015. Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins* 2015, 7, 4253-4282; DOI: 10.3390/toxins7104253
- Huch, M. & Franz, C. (2015). Café: fermentación y microbiota. *Avances en alimentos fermentados y bebidas*, pp 501-513
- Juárez, A., Debernard, H., Quevedo, A., Malagó, F., & Morales, V. . (2018). características físicas del fruto de café (*Coffea arabica* L.) en híbridos de timor. *Agroproductividad*, 11(3), 115–120. <http://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/226/169>
- Kwon, HJ, Yoon, JA y Kim, MD (2018). Tolerancia de *Pichia farinosa* KCTC27753 aislada de Nuruk a inhibidores de fermentación.
- Lee, L., Cheona, M., Curran, P., Yu, B. & Quan, S. (2015). Fermentación y sabor del café: una relación compleja y delicada. *Química de alimentos*, 185, pp 182-191.
- López, C. F., Rojas, P. A., Montaña, L. O., Tovar, E. S., Rojas, Y., Arcos, C. A., . . . Vega, G. A. (2015). Estudio de algunas variables en el proceso de fermentación del café y 33 su relación con a calidad de taza en el sur de Colombia. *Agroecología: ciencia y tecnología*, 3(1), 7-12.
- López, R. J. (2017). Estudio de la fermentación de kefir de agua de piña con tибicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(2), 405-414
- Mallet, S., Weiss, S., Jacques, N., Leh-Louis, V., Sacerdot, C. y Casaregola, S. (2012). Información sobre el ciclo de vida de las levaduras del clado CTG revelada por el análisis del complejo de especies de *Milleromyza* (*Pichia*) *farinosa*. *PLoS One* , 7 (5), e35842.
- Martín Russo, V. (2016). *Hanseniaspora vineae*: caracterización y su uso en la vinificación.
- McGuire, RG (1992). Informe de mediciones objetivas de color, *HortScience HortSci* , 27 (12), 1254-1255. Obtenido el 10 de mayo de 2021 de <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/27/12/article-p1254.xml>
- Mendoza¹, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 15-23.

- Moreira, R. F., Fernandes, P. A., & Moradas-Ferreira, P. (1998). Kluyveromyces marxianus flocculence and growth at high temperature is dependent on the presence of the protein p37. *Microbiology*, 144(3), 681-688.
- Mussatto, S., Machado, E., Martins, S. & Teixeira, J. (2011). Producción, composición y aplicación de café y sus residuos industriales. *Food Bioprocess Technol.*, 4, pp 661-672
- Nasanit, R. y Satyawut, K. (2015). Estudio microbiológico durante la fermentación del café de Coffea arabica var. chiangmai 80 en Tailandia. *Agricultura y recursos naturales* , 49 (1), 32-41.
- Ocampo-López, O. L., & Alvarez-Herrera, L. M. (2017). Tendencia de la producción y el consumo del café en Colombia. *Apuntes del CENES*, 36(64), 139-165; DOI: doi.org/10.19053/01203053.v36.n64.2017.5419
- Ogunremi, OR, Agrawal, R. y Sanni, A. (2020). Producción y caracterización de compuestos volátiles y fitasa a partir de levaduras potencialmente probióticas aisladas de alimentos de cereales fermentados tradicionales en Nigeria. *Revista de Ingeniería Genética y Biotecnología* , 18 , 1-8.
- OIC., 2020. Efectos de la COVID-19 en el sector mundial del café: encuesta de los miembros. Organización internacional de Café. Serie Coffee Break No. 3.
- Pereira, A., Martínez, S., Inácio, A., Borém, F. & Shwan, R. (2020). Ácidos orgánicos producidos durante la fermentación y la percepción sensorial en cafés especiales utilizando cultivo indicador de levadura. *Food Research International*, 128.
- Pérez, D., & Zárate, M. (2013). Determinación de la flora micológica del maíz seco y su harina en la parroquia San Juan-Canton Gualaceo. 1–85.
- Puerta, G. I. (2006). Sistema de aseguramiento de la calidad y la inocuidad del café en la finca. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).
- Puerta Q., G.I. (2010). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. Chinchiná: Cenicafé. 12 p. (Avances Técnicos No. 402).
- Puerta, G. I. (2013). Cinética química de la fermentación del mucílago de café a temperatura ambiente. *Revista Cenicafé*, 64(1), 42 - 59.
- Puerta, G. I. (2013). Especificaciones de origen y buena calidad del café de Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).
- Puerta, G. I. (2013). Factores procesos y controles en la fermentación del café. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).
- Puerta, G. I., & Echeverry, J. G. (2015). Fermentación controlada del café: tecnología para agregar valor a la calidad. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).
- Puerta, G. I., Marín, J., & Osorio, G. A. (2015). Microbiología de la fermentación del mucílago de café según su madurez y selección
- Puerta, G. I., Marín, J., & Osorio, G. A. (2015). Microbiología de la fermentación del mucílago de café según su madurez y selección.
- Quintero, L. & Rosales, M. (2014). El mercado mundial del café: tendencias recientes, estructura y estrategias de competitividad. *Visión Gerencial*, 13(2), 291–307.
- Ramírez, A. (2018). Rendimiento del café pergamino húmedo determinado por características específicas de los productores. *Coporaación Universitaria Lasallista*, 1–107. http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/2421/1/Rendimiento_cafe_pergamin_o_humedo.pdf
- Rández Gil, F., Prieto Alamán, J. A., & Hernández López, M. J. (2004). Utilización de cepas de *Torulaspota delbrueckii* en la producción de masas dulces.

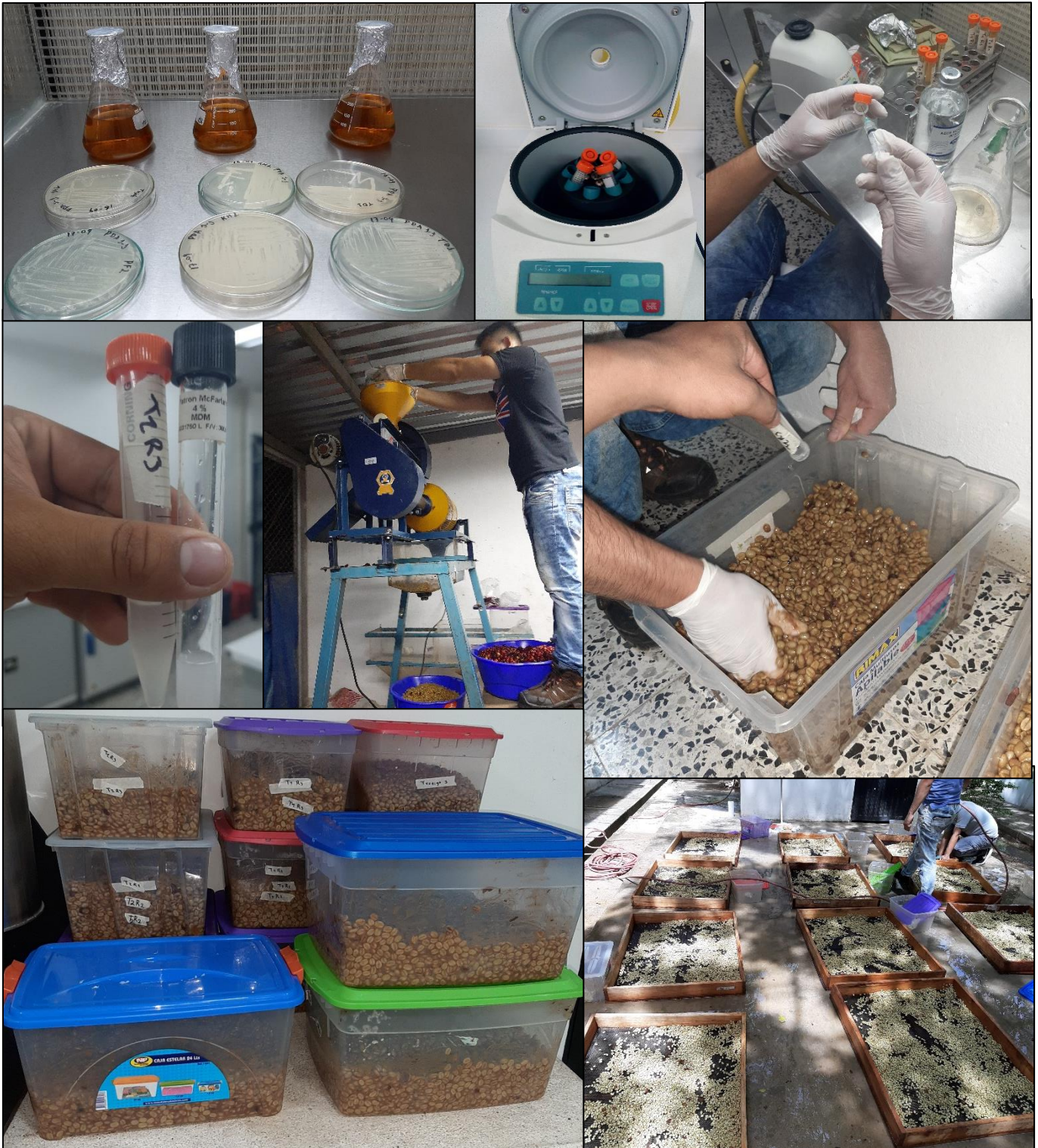
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). The Microbiology of Wine and Vinifications. In Handbook of Enology (2nd ed., Vol. 1, pp. 1–89). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470010363.ch3>
- Rima, H., Steve, L. e Ismail, F. (2012). Propiedades antimicrobianas y probióticas de las levaduras: de las aplicaciones fundamentales a las novedosas. *Fronteras en microbiología* , 3 , 421.
- Rojas, L. C., Cajiao, A., & Cardenas, R. (2015). Aislamiento de hongos en las diferentes etapas del beneficio de café cultivado y comercializado en Toledo, Norte de Santander. @ *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 13(2), 96-107.
- Salazar Gallego, F. A. (2021). Café de Colombia, análisis de los principales productores de café del mundo (Bachelor's thesis, Escuela de Economía, Administración y Negocios. Facultad de Negocios Internacionales).
- Sanchez De La Cruz, I. G. (2018). Efecto de la adición de levadura (*Saccharomyces* sp) en el proceso de fermentación de café (*Coffea arabica*).
- SCA. (2015). SCAA Protocols Cupping Specialty Coffee. Specialty Coffee Association of America, 1–10. <http://www.scaa.org/?page=resources&d=coffee-protocols>.
- SCAA - Specialty Coffee Association of America. 2015. SCAA Protocols cupping specialty coffee. Santa Ana, CA.
- Silva, C., Batista, L., Abreu, L., Dias, E. & Shwoan, R. (2008). Sucesión de comunidades bacterianas y fungicidas durante la fermentación del café natural (*Coffea arabica*). *Microbiol Alimentario.*, 25, pp 951-957
- Souza, ML de, Passamani, FRF, Ávila, CL da S., Batista, LR, Schwan, RF y Silva, CF (2017). Uso de leveduras selvagens como agente de biocontrole contra fungos toxigênicos e produção de OTA. *Acta Scientiarum - Agronomía*, 39 (3), 349 - 358. 10. 4025 / actasciagron.v39i3.32659.
- UCDAVIS. (2018). *Kluyveromyces marxianus*. Recuperado de: <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/kluyveromyces-marxianus>
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, 78, 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Young, G. D., Rodríguez, F. J., & Piedra, J. M. S. (2019). Ocratoxina A en café. *Revista Ciencia y Salud*, 3(3), ág-21.
- Zumbado, W., Esquivel, P., & Wong, E. (2006). Selección de una levadura para la producción de biomasa: Crecimiento en suero de queso. *Agronomía Mesoamericana*, 17 N2(1021–7444), 151–160. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5039970>
- Martínez Benítez, E. (2004). Estudio de especies micotoxígenas del género *Penicillium* *Penicillium verrucosum* Dierckx. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Vaamonde, G. (2008). Micotoxinas emergentes y re-emergentes: acido ciclopiazonico.
- Ranjbar, R., & Farahani, A. (2019). *Shigella*: antibiotic-resistance mechanisms and new horizons for treatment. *Infection and drug resistance*, 12, 3137.
- Sánchez García, E., Castillo Hernández, S., & García Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. *OmniaScience Monographs*.

ANEXOS

ANEXO A (Resultados prueba actividad antimicrobiana)



ANEXO B (Proceso de fermentación con adición de levaduras)



ANEXO C (Análisis físico y sensorial)




ANEXO D (Fichas técnicas)

Tratamiento	T1R1 (11)	T1R2 (12)	T1R3 (13)	T2R1 (21)	T2R2 (22)	T2R3 (23)
(Muestra)	T3R1 (31)	T3R2 (32)	T3R3 (33)	Testigo 1 (1)	Testigo 2 (2)	Testigo 3 (3)

	FICHA TÉCNICA			
	Fecha:	18/02/21	Muestra:	

DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):	JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:	
	Departamento:	HUILA
	Municipio:	GIGANTE
	Vareda/Predio:	LA FLORIDA/LA PALMA
	Variedad:	COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):	1650
Teléfono/Celular:	3223063156	

ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	10.6	OBSERVACIONES Se encontró: G. Vinagre, causado por retrasos en la recolección y en el despulpado, fermentaciones prolongadas, uso de aguas contaminadas, sobrecalentamiento o almacenamiento húmedo del café. G. Decolorados ambar o mantequillos, causado problemas de nutrientes en el suelo. G. Inmaduros o paloteados, causado por recolección de granos verdes o pintones, roya o sequia o falta de abono. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Aplastados, por maltrato durante el beneficio, pisar el café durante el secado o desgaste de camisas. G.	
	Almendra total (g):	205		
	Almendra sana (g):	184.7		
	Broca	g		5.6
		%		2.7
	Pasilla	g		15.7
		%		7.7
Merma (%):	18.0			
F.R. (Kg):	94.7			

ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	FRUTOS ROJOS, DULCE, CHOCOLATE, PANELA, CITRICA,	
	Sabor	HERBAL, DULCE, CHOCOLATE	
	Acidez	MEDIA MEDIA	
	Cuerpo	MEDIO, MEDIO, DULCE, PERSISTENTE LUN	
	Puntaje total	83.13	

OBSERVACIONES	Es considerado un café especial según las SCAA.
----------------------	---


Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
 Coordinador CESURCAFÉ
 (57)(8) 8754753 Ext 1131
cesurcafe@usco.edu.co

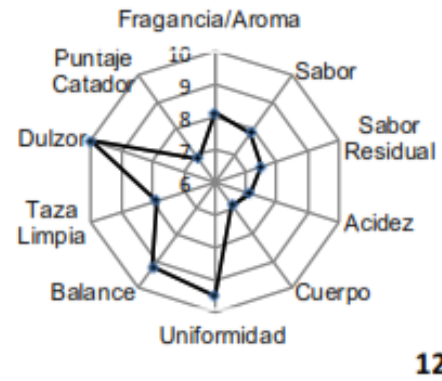

Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
 Catador Certificado Q Grader
 SCAA

	FICHA TÉCNICA			
	Fecha:	18/02/21	Muestra:	


DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):	JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:	
	Departamento:	HUILA
	Municipio:	GIGANTE
	Vareda/Predio:	LA FLORIDA/LA PALMA
	Variedad:	COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):	1650
	Teléfono/Celular:	3223063156

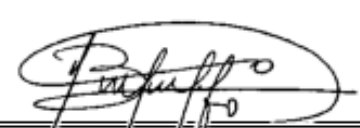
ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	11.7	OBSERVACIONES	
	Almendra total (g):	204.6		
	Almendra sana (g):	188		
	Broca	g		5.1
		%		2.5
	Pasilla	g		15.5
		%		7.6
	Merma (%):	18.2		
F.R. (Kg):	93.1			

Se encontró: G. Decolorados ambar o mantequillos, causado problemas de nutrientes en el suelo. G. Inmaduros o paloteados, causado por recolección de granos verdes o pintones, roya o sequía o falta de abono. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Aplastados, por maltrato durante el beneficio, pisar el café durante el secado o desgaste de camisas. G. Brocados, causado por insectos. G. Cristalizados, causado por altas temperaturas en el secado. G. Negro, por falta de agua durante el desarrollo del fruto, fermentaciones prolongadas,

ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	PANELA, CITRICO, HERBAL FRESCO PRONUNCIADO	
	Sabor	HERBAL RESIDUAL ASTRINGENTE	
	Acidez	MEDIA MEDIA	
	Cuerpo	MEDIO, MEDIO, DULSON, UN POCO ASTRINGENTE EN	
	Puntaje total	81.00	

OBSERVACIONES	Es considerado un café especial según las SCAA.
----------------------	---


Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
 Coordinador CESURCAFÉ
 (57)(8) 8754753 Ext 1131
cesurcafe@usco.edu.co



Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
 Catador Certificado Q Grader
 SCAA

	FICHA TÉCNICA			
	Fecha:	18/02/21	Muestra:	


DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):	JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:	
	Departamento:	HUILA
	Municipio:	GIGANTE
	Vareda/Predio:	LA FLORIDA/LA PALMA
	Variedad:	COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):	1650
	Teléfono/Celular:	3223063156

ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	11.1	OBSERVACIONES	
	Almendra total (g):	203.3		
	Almendra sana (g):	185.8		
	Broca	g		2.6
		%		1.3
	Pasilla	g		16.4
		%		8.1
	Merma (%):	18.7		
F.R. (Kg):	94.2			

Se encontró: G. Decolorados ambar o mantequillos, causado problemas de nutrientes en el suelo. G. Inmaduros o paloteados, causado por recolección de granos verdes o pintones, roya o sequía o falta de abono. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Aplastados, por maltrato durante el beneficio, pisar el café durante el secado o desgaste de camisas. G. Brocados. causado por insectos. G. Cristalizados, causado por altas temperaturas en el secado. G. Negro, por falta de agua durante el desarrollo del fruto, fermentaciones prolongadas.

ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	CITRICO, HERBAL FRESCO, DULCE, PANELA	
	Sabor	HERBAL CITRICO	
	Acidez	MEDIA MEDIA	
	Cuerpo	MEDIO, ALTO, DULCE PERSISTENTE EN	
	Puntaje total	83.13	

OBSERVACIONES	Es considerado un café especial según las SCAA.
----------------------	---


Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
 Coordinador CESURCAFÉ
 (57)(8) 8754753 Ext 1131
cesurcafe@usco.edu.co

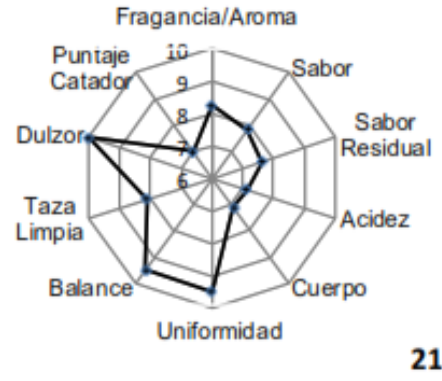

Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
 Catador Certificado Q Grader
 SCAA

	FICHA TÉCNICA			
	Fecha:	18/02/21	Muestra:	


DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):	JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:	
	Departamento:	HUILA
	Municipio:	GIGANTE
	Vareda/Predio:	LA FLORIDA/LA PALMA
	Variedad:	COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):	1650
	Teléfono/Celular:	3223063156

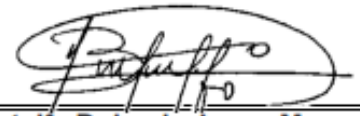
ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	11.3	OBSERVACIONES	
	Almendra total (g):	204.6		
	Almendra sana (g):	191.7		
	Broca	g		4
		%		2.0
	Pasilla	g		11.8
		%		5.8
	Merma (%):	18.2		
F.R. (Kg):	91.3			

Se encontró: G. Vinagre, causado por retrasos en la recolección y en el despulpado, fermentaciones prolongadas, uso de aguas contaminadas, sobrecalentamiento o almacenamiento húmedo del café. G. Decolorados ambar o mantequillos, causado problemas de nutrientes en el suelo. G. Decolorados sobresecados, debido a demasiado tiempo en el secado. G. Inmaduros o paloteados, causado por recolección de granos verdes o pintones, roya o sequía o falta de abono. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Brocados, causado por


ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	DULCE, CHOCOLATE, AMARGO, HERBAL SECO, CITRICO,	
	Sabor	NOTAS SECAS, RESIDUAL DULCE	
	Acidez	MEDIA, MEDIA, ASTRINGENTE	
	Cuerpo	MEDIO, MEDIO, DULZON, PULPOSO, EN FRIO SE TORNA	
	Puntaje total	82.13	

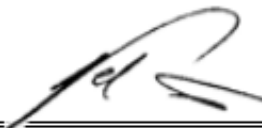
OBSERVACIONES	Es considerado un café especial según las SCAA.
----------------------	---


Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
 Coordinador CESURCAFÉ
 (57)(8) 8754753 Ext 1131
cesurcafe@usco.edu.co

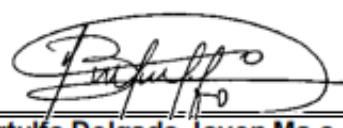

Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
 Catador Certificado Q Grader
 SCAA

Fecha: 18/02/21 Muestra: 22

DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario): JUAN E CUBILLOS ANGULO			
	Cédula:			
	Departamento: HUILA			
	Municipio: GIGANTE			
	Vareda/Predio: LA FLORIDA/LA PALMA			
	Variedad: COLOMBIA F5			
	Altura (m.s.n.m.): 1650			
	Teléfono/Celular: 3223063156			
ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	11	OBSERVACIONES Se encontró: G. Inmaduros o paloteados, causado por recolección de granos verdes o pintones, roya o sequía o falta de abono. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Aplastados, por maltrato durante el beneficio, pisar el café durante el secado o desgaste de camisas. G. Brocados, causado por insectos. G. Negro, por falta de agua durante el desarrollo del fruto, fermentaciones prolongadas, recolección de cerezas sobremaduras o mal secado.	
	Almendra total (g):	205		
	Almendra sana (g):	187.7		
	Broca	g		5.8
		%		2.8
	Pasilla	g		16.2
		%		7.9
	Merma (%):	18.0		
F.R. (Kg):	93.2			
ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	DULCE, CHOCOLATE, HERBAL FRESCA, NOTAS	 <p style="text-align: right;">22</p>	
	Sabor	HERBAL, DULCE		
	Acidez	MEDIA MEDIA		
	Cuerpo	MEDIO, MEDIO, DULCE SUAVE, EN FRÍO SE TORNA		
	Puntaje total	84.25		
	OBSERVACIONES	Es considerado un café especial según las SCAA.		



Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
Coordinador CESURCAFÉ
(57)(8) 8754753 Ext 1131
cesurcafe@usco.edu.co



Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
Catador Certificado Q Grader SCAA



FICHA TÉCNICA




Fecha: 18/02/21 Muestra: 23

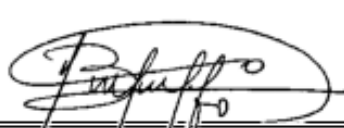
DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):	JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:	
	Departamento:	HUILA
	Municipio:	GIGANTE
	Vareda/Predio:	LA FLORIDA/LA PALMA
	Variedad:	COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):	1650
	Teléfono/Celular:	3223063156

ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	10.4	OBSERVACIONES Se encontró: G. Vinagre, causado por retrasos en la recolección y en el despulpado, fermentaciones prolongadas, uso de aguas contaminadas, sobrecalentamiento o almacenamiento húmedo del café. G. Decolorados ambar o mantequillos, causado problemas de nutrientes en el suelo. G. Averanados o arrugados, causado por un desarrollo pobre del café por sequía o debilidad del café. G. Inmaduros o paloteados, causado por recolección de granos verdes o pintones, roya o sequía o falta de abono. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas	
	Almendra total (g):	206.2		
	Almendra sana (g):	176.6		
	Broca	g		4.3
		%		2.1
	Pasilla	g		28
		%		13.6
	Merma (%):	17.5		
F.R. (Kg):	99.1			

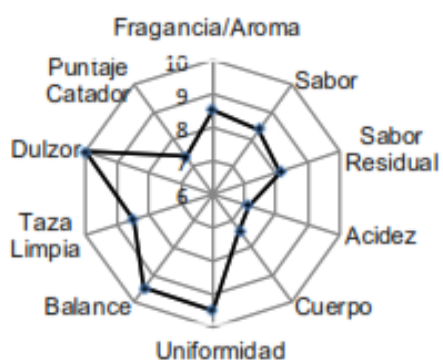
ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	DULCE, PANELA, CHOCOLATE, DULCE CITRICO, HERBAL FRESCA	
	Sabor	DULCE, CITRICO, HERBAL	
	Acidez	MEDIA, MEDIA, UN POCO ASTRINGENTE	
	Cuerpo	MEDIO, MEDIO, DULSON, PULPOSO, UN TANTO	
	Puntaje total	83.00	


OBSERVACIONES Es considerado un café especial según las SCAA.


Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
 Coordinador CESURCAFÉ
 (57)(8) 8754753 Ext 1131
cesurcafe@usco.edu.co

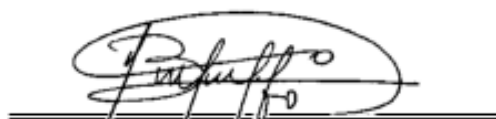

Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
 Catador Certificado Q Grader
 SCAA

Fecha: 18/02/21 Muestra: 31

DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):		JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:		
	Departamento:		HUILA
	Municipio:		GIGANTE
	Vareda/Predio:		LA FLORIDA/LA PALMA
	Variedad:		COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):		1650
	Teléfono/Celular:		3223063156
ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):		11.9
	Almendra total (g):		205.8
	Almendra sana (g):		178
	Broca	g	5.6
		%	2.7
	Pasilla	g	26.4
		%	12.8
	Merma (%):		17.7
F.R. (Kg):		98.3	
			OBSERVACIONES
			Se encontró: G. Vinagre, causado por retrasos en la recolección y en el despulpado, fermentaciones prolongadas, uso de aguas contaminadas, sobrecalentamiento o almacenamiento húmedo del café. G. Decolorados ambar o mantequillos, causado problemas de nutrientes en el suelo. G. Inmaduros o paloteados, causado por recolección de granos verdes o pintones, roya o sequía o falta de abono. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Brocados. causado por insectos. G. Negro, por falta de agua durante el desarrollo del fruto, fermentaciones
ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	CITRICA, DULCE, HIERBA BUENA, LIMON, VAINILLA, HERBAL FRESCA,	 <p style="text-align: right;">31</p>
	Sabor	DULCE, HERBAL, PANELA	
	Acidez	MEDIA, MEDIA, ASTRINGENTE	
	Cuerpo	MEDIO, MEDIO, DULCE PRONUNCIADO	
	Puntaje total	84.38	
OBSERVACIONES		Es considerado un café especial según las SCAA.	



Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
Coordinador CESURCAFÉ
(57)(8) 8754753 Ext 1131
cesurcafe@usco.edu.co



Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
Catador Certificado Q Grader
SCAA

	FICHA TÉCNICA			
	Fecha:	18/02/21	Muestra:	


DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):	JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:	
	Departamento:	HUILA
	Municipio:	GIGANTE
	Vareda/Predio:	LA FLORIDA/LA PALMA
	Variedad:	COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):	1650
	Teléfono/Celular:	3223063156

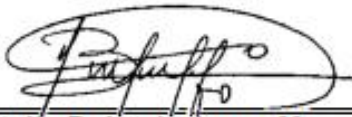
ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	11.4	OBSERVACIONES	
	Almendra total (g):	205.6		
	Almendra sana (g):	187.9		
	Broca	g		5
		%		2.4
	Pasilla	g		16.6
		%		8.1
	Merma (%):	17.8		
F.R. (Kg):	93.1			

Se encontró: G. Averanados o arrugados, causado por un desarrollo pobre del cafeto por sequía o debilidad del cafeto. G. Inmaduros o paloteados, causado por recolección de granos verdes o pintones, roya o sequía o falta de abono. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Aplastados, por maltrato durante el beneficio, pisar el café durante el secado o desgaste de camisas. G. Brocados, causado por insectos. G. Negro, por falta de agua durante el desarrollo del fruto, fermentaciones prolongadas, recolección de cerezas sobremaduras o mal

ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	DULCE, CARAMELO, PANELA, CITRICO, HERBAL FRESCO, VEGETALOSA	
	Sabor	DULCE, RESIDUAL ASTRINGENTE, UNA TASA CON SABER A	
	Acidez	MEDIA MEDIA	
	Cuerpo	MEDIO, MEDIO, DULCE, SUAVE, DELICADO, EN FRIJO	
	Puntaje total	80.50	

OBSERVACIONES	Es considerado un café especial según las SCAA.
----------------------	---


Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
 Coordinador CESURCAFÉ
 (57)(8) 8754753 Ext 1131
cesurcafe@usco.edu.co


Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
 Catador Certificado Q Grader
 SCAA

	FICHA TÉCNICA			
	Fecha:	18/02/21	Muestra:	


DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):	JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:	
	Departamento:	HUILA
	Municipio:	GIGANTE
	Vareda/Predio:	LA FLORIDA/LA PALMA
	Variedad:	COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):	1650
	Teléfono/Celular:	3223063156

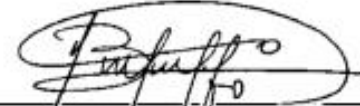
ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	10.7	OBSERVACIONES	
	Almendra total (g):	206		
	Almendra sana (g):	188.8		
	Broca	g		4.1
		%		2.0
	Pasilla	g		17.2
		%		8.3
	Merma (%):	17.6		
F.R. (Kg):	92.7			

Se encontró: G. Decolorados arbar o mantequillos, causado problemas de nutrientes en el suelo. G. Inmaduros o paloteados, causado por recolección de granos verdes o pintones, roya o sequía o falta de abono. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Aplastados, por maltrato durante el beneficio, pisar el café durante el secado o desgaste de camisas. G. Brocados. causado por insectos.

ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	DULCE, CHOCOLATE, NOTAS HERBALES FRESCAS	
	Sabor	HERBAL RESIDUAL MANCHOSO ASTRINGENTE	
	Acidez	MEDIA MEDIA	
	Cuerpo	MEDIO, MEDIO, DULCE, CREMOSO, PRESISTENTE EN	
	Puntaje total	82.75	

OBSERVACIONES	Es considerado un café especial según las SCAA.
----------------------	---


Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
 Coordinador CESURCAFÉ
 (57)(8) 8754753 Ext 1131
cesurcafe@usco.edu.co

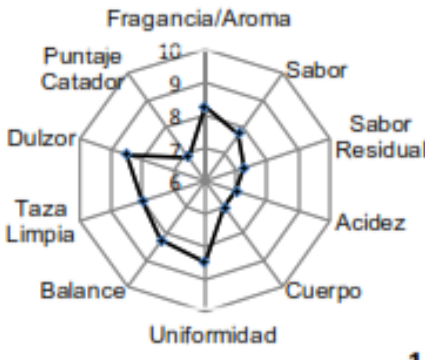

Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
 Catador Certificado Q Grader
 SCAA

	FICHA TÉCNICA			
	Fecha:	18/02/21	Muestra:	


DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):	JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:	
	Departamento:	HUILA
	Municipio:	GIGANTE
	Vareda/Predio:	LA FLORIDA/LA PALMA
	Variedad:	COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):	1650
	Teléfono/Celular:	3223063156


ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	11.2	OBSERVACIONES	
	Almendra total (g):	206.6		
	Almendra sana (g):	193.2		
	Broca	g		4
		%		1.9
	Pasilla	g		12.4
		%		6.0
	Merma (%):	17.4		
F.R. (Kg):	90.6			

Se encontró: G. Decolorados ambar o mantequillos, causado problemas de nutrientes en el suelo. G. Averanados o arrugados, causado por un desarrollo pobre del café por sequía o debilidad del café. G. Inmaduros o paloteados, causado por recolección de granos verdes o pintones, roya o sequía o falta de abono. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Brocados. causado por insectos. G. Negro, por falta de agua durante el desarrollo del fruto, fermentaciones prolongadas, recolección de cerezas sobremaduras o mal secado.

ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	DULCE, CIRUELA, CHOCOLATE, CITRICO, HERBAL, VEGETALOSO	
	Sabor	HERBAL, RESIDUAL ASTRINGENTE, UNA TASA CON SABOR A	
	Acidez	MEDIA, MEDIA, ASTRINGENTE	
	Cuerpo	MEDIO, MEDIO, DULSON, EN FRIO SE TORNA AGUADO	
	Puntaje total	77.38	

OBSERVACIONES	No considerado un café especial según las SCAA.
----------------------	---


 Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
 Coordinador CESURCAFÉ



 Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
 Catador Certificado Q Grader

	FICHA TÉCNICA		 UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
	Fecha:	18/02/21	


DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):	JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:	
	Departamento:	HUILA
	Municipio:	GIGANTE
	Vareda/Predio:	LA PALMA
	Variedad:	COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):	1650
	Teléfono/Celular:	3223063156

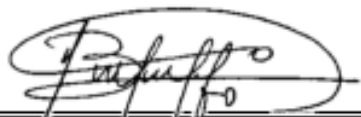
ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	10.9	OBSERVACIONES	
	Almendra total (g):	205.2		
	Almendra sana (g):	186.3		
	Broca	g		5.3
		%		2.6
	Pasilla	g		17.2
		%		8.4
	Merma (%):	17.9		
F.R. (Kg):	93.9			

Se encontró: G. Vinagre, causado por retrasos en la recolección y en el despulpado, fermentaciones prolongadas, uso de aguas contaminadas, sobrecalentamiento o almacenamiento húmedo del café. G. Decolorados ambar o mantequillos, causado problemas de nutrientes en el suelo. G. Averanados o arrugados, causado por un desarrollo pobre del cafeto por sequía o debilidad del cafeto. G. Decolorados sobresecados, debido a demasiado tiempo en el secado. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Aplastados, por maltrato durante el beneficio.

ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	HERBAL, DULCE, CITRICO, CHOCOLATE, CAÑA-GUARAPO	
	Sabor	CITRICO, HERBAL, RESIDUAL, DULCE	
	Acidez	MEDIA MEDIA	
	Cuerpo	MEDIO, ALTO, DULCE, CREMOSO, PERSISTENTE	
	Puntaje total	84.38	

OBSERVACIONES	Es considerado un café especial según las SCAA.
----------------------	---


Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
 Coordinador CESURCAFÉ

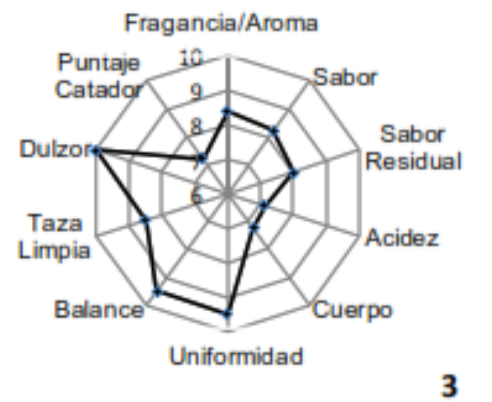

Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
 Catador Certificado Q Grader

FICHA TÉCNICA


Fecha: 18/02/21 Muestra: 3

DATOS DEL PRODUCTOR	Nombre (Propietario):	JUAN E CUBILLOS ANGULO
	Cédula:	
	Departamento:	HUILA
	Municipio:	GIGANTE
	Vareda/Predio:	LA FLORIDA/LA PALMA
	Variedad:	COLOMBIA F5
	Altura (m.s.n.m.):	1650
	Teléfono/Celular:	3223063156

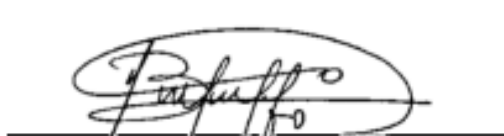
ANÁLISIS FÍSICO	Humedad (%):	10.7	OBSERVACIONES Se encontró: G. Decolorados ambar o mantequillos, causado problemas de nutrientes en el suelo. G. Averanados o arrugados, causado por un desarrollo pobre del café por sequía o debilidad del café. G. Partidos, debido a la despulpadora mal ajustada o camisa defectuosa o recolección de cerezas verdes. G. Brocados. causado por insectos. G. Negro, por falta de agua durante el desarrollo del fruto, fermentaciones prolongadas, recolección de cerezas sobremaduras o mal secado.	
	Almendra total (g):	201.1		
	Almendra sana (g):	183.4		
	Broca	g		3.3
		%		1.6
	Pasilla	g		15.8
		%		7.9
	Merma (%):	19.6		
F.R. (Kg):	95.4			

ANÁLISIS SENSORIAL	Fragancia/Aroma	DULCE, CITRICA, HERBAL FRESCA MANDARINA, CHOCOLATE	
	Sabor	DULCE, RESIDUAL PRONUNCIADO	
	Acidez	MEDIA, MEDIA, ASTRINGENTE	
	Cuerpo	MEDIO, MEDIO, DULCE, UN POCO ASTRINGENTE EN	
	Puntaje total	83.75	

OBSERVACIONES Es considerado un café especial según las SCAA.



Nelson Gutiérrez Guzmán Ph.D.
Coordinador CESURCAFÉ



Bertulfo Delgado Joven Ms.c.
Catador Certificado Q Grader