



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

OFICIO: ITV/DEPI/No.102/2020

**A QUIEN CORRESPONDA
PRESENTE**

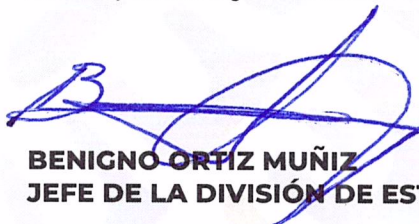
Por medio de la presente el que suscribe Dr. Benigno Ortiz Muñiz, Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Veracruz me permito hacer **CONSTAR** que, de acuerdo a los archivos de esta División de Estudios, el (la) **Dr. Oscar González Ríos** fungió como **Director(a)** de la Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada: **"Biocontrol de café verde durante su almacenamiento mediante el uso de levaduras"** desarrollada por el (la) **C. Nadia Contreras Delfín**, número de control **M17020012**.

Se extiende la presente a la Ciudad de Veracruz, Veracruz a los cinco días del mes de marzo del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®*




BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.c. Archivo





CERTIFICACIÓN DE ACTA DE EXAMEN DE GRADO DE MAESTRÍA



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

El suscrito Director del Instituto Tecnológico de Veracruz, certifica que en el Libro para Actas de Examen de Grado de Maestría N° 1 autorizado el día 18 del mes de Agosto del 2014 por la Dirección de Servicios Escolares y Estudiantiles de la Dirección General del Tecnológico Nacional de México, se encuentra asentada en la foja número 128 el Acta que a la letra dice: En la H. Veracruz, Veracruz a los 9 días del mes de diciembre de 2019, siendo las 14:00 horas, se reunieron en el Aula Magna del Instituto Tecnológico de Veracruz, clave 30DIT0002U, el jurado integrado por:

Presidente(a): Doctor en Ciencias de los Alimentos Oscar González Ríos 5691004

Secretario(a): Doctora en Ciencias (Biología) Rosa María Oliart Ros 3588258

Vocal: Doctora en Ciencias en Alimentos Patricia Guillermina Mendoza García 7768863

Y de acuerdo con las disposiciones reglamentarias en vigor, se procedió a efectuar el examen de Grado de Maestría a el (la) C. NADIA CONTRERAS DELFIN, número de control M17020012 aspirante al Grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA.

Tomando en cuenta el contenido de la TESIS cuyo título es: "Biocontrol de café verde durante su almacenamiento mediante el uso de levaduras" que fue dirigida por Dr. Oscar González Ríos; Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz, una vez concluido el examen oral, dictaminó que fuera APROBADO (A).

El (la) Presidente (a) del jurado le hizo saber a el (la) sustentante el resultado obtenido, el Código de Ética Profesional y le tomó la Protesta de Ley. Dándose por terminado el Acto a las 16:00 horas, y una vez escrita, leída y aprobada, fue firmada para constancia por las personas que en el acto intervinieron, para los efectos legales a que haya lugar se asienta la presente.

Rubrican.

Se extiende esta certificación a los diecisiete días del mes de diciembre de dos mil diecinueve.

COTEJÓ

Carlos Julián Genis Triana
Jefe del Departamento
de Servicios Escolares



SRIA. DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE VERACRUZ
DIRECCION

MARCO ANTONIO SALGADO CERVANTES
DIRECTOR



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Biocontrol de café verde durante su almacenamiento
mediante el uso de levaduras**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.Q. Nadia Contreras Delfín

Asesores:

Dr. Oscar González Ríos.

Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz.

H. VERACRUZ, VER.

3 de diciembre del 2019

RESUMEN

Contreras Delfín, Nadia. Maestría en ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Octubre del 2019. **Biocontrol de café verde durante su almacenamiento mediante el uso de levaduras**. Asesores: Dr. Oscar González Ríos, Dra. Mirna Leonor Suarez Quiróz.

La producción mundial de café supera los 100 millones de sacos, de los cuales más de 80 millones se exportan cada año. Debido a su comercialización global y los periodos largos que está en almacenamiento, es importante mantener su calidad. El almacenamiento es una etapa crítica debido a que se genera el desarrollo de hongos filamentosos, formación de micotoxinas y un deterioro en el grano, afectando la calidad e inocuidad. Por otro lado, se ha reportado que la aplicación de levaduras tiene gran potencial para reducir el daño económico producido por los hongos toxigénicos en la agricultura como agentes de biocontrol inhibiendo el crecimiento de hongos filamentosos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el uso de dos cultivos iniciadores de *Saccharomyces cerevisiae* (L1 y L2) durante la fermentación de café como agente de biocontrol en las poblaciones fúngicas que afectan los marcadores de calidad durante el almacenamiento en comparación con una fermentación natural (FN). Durante la fermentación se midió pH, acidez titulable, cuenta total y dinámica de levaduras por PCR-DGGE. En el almacenamiento por seis meses se evaluaron humedad; actividad de agua; defectos físicos; color; porcentaje de infección fúngica; PCR-DGGE; OTA; la fracción volátil de café verde y tostado y su calidad sensorial. La FN obtuvo valores más bajos en pH (3.9) y una acidez mayor (0.47%), también presentó mayor crecimiento de levaduras ($3.15E^7$ UFC/g) con respecto a L1 y L2. En los perfiles DGGE la cepa inoculada con L1 fue la que dominó durante todo el proceso de fermentación del café; la fermentación inoculada con L2 muestra la presencia de otra cepa que fue dominante durante las primeras 12 h del proceso, pero posteriormente L2 vuelve a predominar hasta el término de la fermentación. En la FN se observan otras cepas de levaduras distintas a L1 y L2, autóctonas de la zona de estudio. En café verde almacenado se observó

la disminución del % de infección de hongos para los tres tratamientos, el café inoculado con L1 no presentó OTA, en comparación con la cepa inoculada con *S.cerevisiae* L2 y FN que sí presentaron toxina, pero en cantidades muy bajas. En los marcadores de calidad los tratamientos no mostraron diferencias significativas. En el análisis de su fracción volátil tanto en café verde como en café tostado, se observaron diferencias entre los tratamientos, principalmente en el número de VOC's identificados, su abundancia relativa y aromas. El tratamiento que presentó mejores notas agradables tanto en café verde y café tostado fue el tratamiento con L1. Después de los seis meses de almacenamiento los tratamientos L1 y L2 son los que conservaron mejores atributos, obteniendo mejor equilibrio en taza y notas agradables como chocolate, cítrico y caramelo.

ABSTRACT

Contreras Delfin Nadia. Master of Science in Biochemical Engineering. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. December 2019. **GREEN COFFEE BIOCONTROL DURING STORAGE THROUGH THE USE OF YEASTS**. Advisors: Dr. Oscar González Ríos, Dra. Mirna Leonor Suarez Quiróz.

World coffee production exceeds 100 million bags, of which more than 80 million are exported every year. Due to its global marketing and the long periods in storage, it is important to maintain its quality. Storage is a critical stage because it generates the development of filamentous fungi, mycotoxin formation and a deterioration in the grain, affecting the quality and safety of the final product. On the other hand, it has been reported that the application of yeasts has great potential to reduce the economic damage caused by toxigenic fungi in agriculture. Some yeasts can act as biocontrol agents by inhibiting the growth of filamentous fungi. The objective of this work was to study the use of two *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures (L1 and L2) during coffee fermentation as a biocontrol agent in fungal populations that affect quality markers during storage compared to a natural fermentation (FN). During fermentation, pH, titratable acidity, Total Count and yeast dynamics were measured by PCR-DGGE, in the storage for 6 months humidity was evaluated; Aw; physical defects; color; % fungal infection; PCR-DGGE; OTA; the volatile fraction of green and roasted coffee and its sensory quality. The FN obtained lower values in pH (3.9) and a higher acidity (0.47%), also showed greater growth of yeasts (3.15×10^7 CFU / g) with respect to L1 and L2. In DGGE profiles, the strain inoculated with L1 was the one that dominated throughout the coffee fermentation process; the fermentation inoculated with L2 shows the presence of another strain that was dominant during the first 12 h of the process, but later L2 returns to predominate until the end of the fermentation. In the FN, other yeast strains other than L1 and L2, native to the study area, are observed. In stored green coffee, the decrease in % of fungal infection was observed for the three treatments, coffee inoculated with L1 did not present OTA, compared with the strain inoculated with *S. cerevisiae* L2 and FN that did present toxin, but in very quantities low. In the quality markers the treatments showed no

significant differences. In the analysis of its volatile fraction in both green coffee and roasted coffee, differences were observed between treatments, mainly in the number of VOCs identified, their relative abundance and aromas. The treatment that presented better pleasant notes in both green and roasted coffee was the treatment with L1. After 6 months of storage the treatments L1 and L2 are those that retained better attributes, obtaining better balance in cup and pleasant notes such as chocolate, citrus and caramel.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	3
1.1 El Café.....	3
1.1.1 Su importancia como producto comercial.....	4
1.1.2 Factores que intervienen en la calidad del grano.....	1
1.2 Beneficiado del café.....	1
1.2.1 Fermentación del café vía húmeda.....	1
1.2.2 Objetivos de la fermentación.....	1
1.2.3 Microorganismos que intervienen.....	1
1.3 Almacenamiento.....	1
1.3.1 Parámetros de la calidad del grano de café durante su almacenamiento.....	1
1.3.2 Marcadores de calidad en el café durante su almacenamiento.....	1
1.3.3 Factores que intervienen en el deterioro de los marcadores de calidad en el café durante su almacenamiento.....	1
1.3.4 Deterioro del grano de café durante el almacenamiento.....	1
1.4 Principales contaminantes del grano de café.....	1
1.4.1 Micotoxinas.....	1
1.4.2 Datos generales de toxicocinéticos y de toxicidad.....	1
1.4.3 Ocratoxina (OTA) en café.....	1
1.4.4 Regulación de la OTA.....	1
1.5 Métodos para el control de hongos.....	1
1.5.1 Fungicidas (control químico).....	1
1.6 Métodos alternativos por uso de microorganismos (biocontrol).....	1
1.6.1 Biocontrol.....	1
1.6.2 Tipos de biocontrol.....	1
1.6.3 Control microbiológico.....	1
1.7 Levaduras utilizadas como antagonistas.....	1
1.7.1 Mecanismos utilizados para la degradación de micotoxinas por levaduras... ..	1
1.7.2 Inhibición de la producción de micotoxinas.....	1
1.7.3 Biodegradación de micotoxinas.....	1

1.8	Uso de levaduras para el biocontrol de café	1
2.	Justificación.....	26
3.	Hipótesis.....	26
4.	Objetivos.....	27
4.1	Objetivo General.	27
4.2	Objetivos Específicos.	27
5.	Metodología General.....	31
6.	Materiales y Métodos	29
6.1	Materiales	29
6.1.1	Material biológico (cepas de levaduras).....	29
6.1.2	Medios de cultivo.....	29
6.1.3	Equipo de laboratorio.....	30
6.1.4	Equipo para biología molecular.....	31
6.2	Métodos.	32
6.2.1	Muestreo.	32
6.2.2	Seguimiento durante la fermentación.....	32
6.2.4	Marcadores de calidad del café durante el almacenamiento.	39
6.2.5	Porcentaje de infección fúngica	40
6.2.6	Cuantificación de Ocratoxina A (OTA) en café almacenado	41
6.2.7	Análisis de la fracción volátil del grano de café almacenado por SPME-GC-FIT	42
6.2.10	Preparación de la bebida.....	47
6.2.11	Selección de panel sensorial.....	47
6.2.12	Entrenamiento de panel sensorial	47
6.2.13	Análisis sensorial de la bebida de café	47
6.3	Resultados y discusión.....	53
6.3.1	Tratamiento postcosecha del café.....	53
6.3.2	Seguimiento del café en el almacenamiento	53
	Conclusiones.	119
	Bibliografía	127
	Anexo I. Formato del análisis de defectos en café verde	144
	Anexo II. Cuestionario de preselección de candidatos para el panel de evaluación sensorial del café.	145
	Anexo III. Formato para la prueba de identificación de sabores.....	147

Anexo IV. Formato para la prueba de ordenación de sabores.	148
Anexo V. Protocolo utilizado para la prueba triangular.....	149
Anexo VI. Formato para la prueba triangular.....	150
Anexo VII. Formato para la prueba de análisis descriptivo.	151

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Principales micotoxinas presentes en alimentos	13
Tabla 2.	Contenido máximo de OTA permitido en alimentos para los estados miembros de la Unión Europea	17
Tabla 3.	Algunas de las levaduras más utilizadas para Biocontrol en alimentos	21
Tabla 4.	Secuencias de primers utilizados para PCR-DGGE para análisis de ADN de levaduras	37
Tabla 5.	Mezcla de reactivos y programas para PCR de levaduras	38
Tabla 6.	Composición de gel para DGGE con gradiente desnaturizante del 30% a 60%	39
Tabla 7.	Condiciones de tostado de las muestras de café	47
Tabla 8.	Luminosidad del grano de café verde	66
Tabla 9.	Parámetro a* en grano de café verde	67
Tabla 10.	Parámetro b* en grano de café verde	68
Tabla 11.	Cromaticidad en grano de café verde	69
Tabla 12.	Ángulo matiz del grano de café verde	70
Tabla 13.	Determinación de número total de defectos en grano de café verde	72
Tabla 14.	Determinación de granulometría en grano de café verde	73
Tabla 15.	Concentración de OTA µg/kg en café	79
Tabla 16.	Compuestos presentes en el café verde (59) proveniente de los tratamientos FN, L1 y L2	89
Tabla 17.	Distribución por especie química de los compuestos orgánicos volátiles identificados en café verde de los 3 tratamientos estudiados: fermentación natural (FN), levadura 1 (L1) y levadura 2 (L2)	90
Tabla 18.	Alcoholes identificados en café verde de cada tratamiento aplicados	91

Tabla 19.	Ácidos identificados en café verde de cada tratamiento aplicados	91
Tabla 20.	Aldehídos identificados en café verde de cada tratamiento aplicados	92
Tabla 21.	Notas aromáticas de los compuestos identificados en café verde	95
Tabla 22.	Suma de áreas relativas (unidades arbitrarias) de los VOC's que aportan las notas olfativas detectadas en las muestras de café verde en cada tratamiento	97
Tabla 23.	Listado de VOC's extraídos e identificados en muestras de café tostado de los 3 tratamientos aplicados	105
Tabla 24.	Compuestos presentes en el café tostado (86) proveniente de los tratamientos FN, L1 y L2	107
Tabla 25.	VOC's identificados de cetonas, pirazinas y furanos en las fracciones volátiles del café tostado obtenido de los 3 tratamientos aplicados	109
Tabla 26.	Notas aromáticas de los compuestos identificados en café tostado.	111
Tabla 27.	Cualificación sensorial de las notas aromáticas proporcionadas por los VOC's de las muestras de café tostado de cada tratamiento	113
Tabla 28.	Efecto del microbiota presente en la fermentación sobre las notas sensoriales en la bebida de café al inicio del almacenamiento (Mes 0)	119
Tabla 29.	Efecto del microbiota presente en la fermentación sobre las notas sensoriales en la bebida de café después de 3 meses de almacenamiento (Mes 3)	122
Tabla 30.	Efecto del microbiota presente en la fermentación sobre las notas sensoriales en la bebida de café después de 6 meses de almacenamiento (Mes 6)	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Planta de café	1
Figura 2.	Ciclo del grano de café	4
Figura 3.	Capas que componen al grano de café	5
Figura 4.	Sacos de café almacenados	7
Figura 5.	Estructura general de la molécula de OTA	15
Figura 6.	Tipos de biocontrol	20
Figura 7.	Diagrama general de la metodología	28
Figura 8.	Espacio de color CIELAB	41
Figura 9.	Seguimiento del pH durante las fermentaciones	52
Figura 10.	Seguimiento de la acidez durante la fermentación	53
Figura 11.	Seguimiento de la temperatura durante las fermentaciones	54
Figura 12.	Seguimiento del crecimiento de las levaduras durante la fermentación	57
Figura 13.	Fermentaciones de FN (A), L1 (B) y L2 (C)	57
Figura 14.	Perfil DGGE del seguimiento de la fermentación del tratamiento fermentación natural (FN)	59
Figura 15.	Perfil DGGE del seguimiento de la fermentación de la primera muestra inoculada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (L1)	60
Figura 16.	Perfil DGGE del seguimiento de la fermentación de la segunda muestra inoculada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (L2)	61
Figura 17.	Actividad de agua (A_w) de los granos de café durante los seis meses de almacenamiento	63
Figura 18.	Seguimiento de la humedad durante los seis meses de almacenamiento en café pergamino	65
Figura 19.	Porcentaje de la infección fúngica durante seis meses de almacenamiento en medio PDA	75
Figura 20.	Porcentaje de la infección fúngica durante seis meses de almacenamiento en medio DG18	76
Figura 21.	Estructuras microscópicas de <i>A. niger</i>	77

Figura 22.	Perfil DGGE del seguimiento en el almacenamiento de la fermentación natural (FN)	81
Figura 23.	Perfil DGGE del seguimiento en el almacenamiento de la primera muestra inoculada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (L1)	82
Figura 24.	Perfil DGGE del seguimiento en el almacenamiento de la segunda muestra inoculada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (L2)	84
Figura 25.	Cromatograma del espacio de cabeza de café verde obtenido por fermentación natural (FN)	86
Figura 26.	Cromatograma del espacio de cabeza de café verde obtenido por fermentación con <i>S. cerevisiae</i> L1	87
Figura 27.	Cromatograma del espacio de cabeza de café verde obtenido por fermentación con <i>S.cerevisiae</i> L2	88
Figura 28.	Diferentes clases químicas de los VOC's en café verde producidos en los tratamientos FN= fermentación natural; L1= levadura 1; L2= levadura 2.	93
Figura 29.	Abundancia relativa de las diferentes clases químicas de los VOC's en café verde producidos en los tratamientos FN= fermentación natural; L1= levadura 1; L2= levadura 2	98
Figura 30.	Cualificación odorífica de la fracción volátil en muestras de café verde obtenida de los tratamientos aplicados durante la fermentación (FN; L1 y L2)	100
Figura 31.	Evolución de la fracción volátil en granos verdes durante el almacenamiento	102
Figura 32.	Cromatograma del espacio de cabeza de café tostado obtenido por fermentación natural (FN)	103
Figura 33.	Cromatograma del espacio de cabeza de café tostado obtenido por fermentación levadura 1 (L1)	104
Figura 34.	Cromatograma del espacio de cabeza de café tostado obtenido por fermentación levadura 2l (L2)	108

Figura 35.	Abundancia relativa de las diferentes clases químicas de los VOC's producidos durante el tostado de granos de café de los tratamientos FN= fermentación natural; L1= levadura 1; L2= levadura 2	115
Figura 36.	Perfil aromático global de café tostado por tratamiento estudiado	117
Figura 37.	Evolución de la fracción volátil en granos tostados durante el almacenamiento de 6 meses	120
Figura 38.	Comparación de 10 criterios favorables de las bebidas de café en el mes de inicio del estudio (fermentación natural= FNt0, levadura 1= L1t0 y levadura 2= L2t0)	120
Figura 39.	Comparación de 10 criterios favorables de las bebidas de café en el tercer mes del estudio (fermentación natural= FNt3, levadura 1= L1t3 y levadura 2= L2t3)	124
Figura 40.	Comparación de 10 criterios favorables de las bebidas de café en el tercer mes del estudio (fermentación natural= FNt6, levadura 1= L1t6 y levadura 2= L2t6)	125

LISTA DE ABREVIATURAS

ACB	Agentes de Control Biológico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribosómico
AFB1	Aflatoxina B1
ARN	Ácido ribonucleico
Aw	Actividad de agua
DG18	Agar Dicloran-Glicerol 18%
DGGE	Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización
DON	Deoxinivalenol
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FAO	Organización de Comida y Agricultura
FID	Detector con Ionización de Llama
GC	Cromatografía de gases
IARC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
ISO	Organización Internacional de Normalización
MATAB	Mezcla de Bromuro de Alquil-Trimetil Amonio
MIPE	Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades
mM	milimoles
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NIV	Nivalenol
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTA	Ocratoxina A
Pb	Pares de bases
PBS	Solución tampón de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar de Papa y Dextrosa
pH	Potencial de Hidrogeno

PR	Posición Relativa
RPM	Revoluciones Por Minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SPME	Extracción en fase solida con espacio de cabeza
T2	Toxina T2
TAE	Mezcla de Tris, Ácido Acético, EDTA
TE	Mezcla de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8
Tris-HCl	Hidroximetil amino metano
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta

Capítulo I

Introducción.

El café es una de las bebidas más ampliamente distribuidas en el mundo y se encuentra entre los principales productos agrícolas vendidos a nivel mundial. Debido a su comercialización global y los periodos largos de almacenamiento, un manejo adecuado del café es clave para conservar su calidad. Si no se realiza correctamente puede ocasionar severas pérdidas en el producto.

Si el grano es almacenado en condiciones apropiadas de humedad y temperatura, éste se estabiliza con el ambiente y su deterioro es lento. Algunos de los cambios en la calidad del grano de café ocurren durante la fase inicial del almacenamiento. Se ha observado que los granos de café almacenados por periodos prolongados de tiempo suelen presentar un aroma y sabor maderoso. Sin embargo, el daño más severo causado al café durante el almacenamiento proviene del ataque de hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus*. Por este motivo se debe tener cuidado con el contenido de humedad del grano de café cuando se almacena, ya que un contenido mayor al del 12% provoca un deterioro más rápido y mayor del producto por infección con hongos. El deterioro por hongos provoca cambios en la apariencia física, en su color, así como en la pérdida de su inocuidad. Además, causa la degradación de los precursores de aroma y sabor del grano de café, lo cual tiene un impacto negativo en percepción sensorial de la bebida.

Por otro lado, se ha reportado que la aplicación de levaduras tiene un gran potencial para disminuir el impacto económico negativo debido a la presencia de hongos toxigénicos en productos agrícolas. Algunas levaduras pueden actuar como agentes de biocontrol inhibiendo el crecimiento de estos. La presencia de levaduras en diversos procesos tecnológicos puede tener un efecto inhibitorio directo sobre la producción de ciertos hongos toxigénicos, el cual es independiente de su efecto antagónico. Además, se ha reportado también que las paredes celulares de varias especies de levaduras son capaces de absorber a las micotoxinas produciendo la degradación de estas a sustancias menos tóxicas.

Se ha demostrado que algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* presentan efectos antagónicos sobre el crecimiento de hongos toxigénicos mediante la supresión de genes, producción de metabolitos secundarios, enzimas o bien otro tipo de mecanismos, además de que producen precursores de aromas y sabores que ayudan a mejorar el perfil aromático de los productos.

En la actualidad no existe información acerca de la capacidad antagónica de las levaduras en la inhibición del crecimiento de hongos toxigénicos o en la síntesis de sus micotoxinas durante el almacenamiento de productos alimenticios sometidos a largos periodos de almacenamiento.

Es por ello que es necesario estudiar el impacto que tiene *Saccharomyces cerevisiae* como agente de biocontrol en café verde durante el almacenamiento, con la finalidad de encontrar una forma más eficiente y menos dañina para el control de hongos toxigénicos y de sus metabolitos secundarios, los cuales causan problemas de calidad e inocuidad en este producto, provocando graves pérdidas económicas. Además, se estudiará si estas cepas pueden producir precursores de aromas y sabores que tengan un impacto positivo en la calidad sensorial del producto.

1. Antecedentes

1.1 El Café.

Hasta la fecha, el café ha sido parte de nuestra vida diaria y como un medio de socialización, que mantiene la vida social viva. La planta de café ha sido representada como parte esencial de momentos especiales debido a su olor y sabor idiosincrásicos (Kaz *et al.*, 2011). A pesar de varias prohibiciones y creencias contra el café a lo largo de su historia, los rituales del café siguen siendo comunes en todo el mundo como "cultura del café" o "hábitos de beber café". Aunque el café es preparado y servido de manera diferente en diferentes dependiendo de la cultura, sin embargo, aún representa un símbolo cultural común que fortalece los lazos y la amistad entre las personas (Toros *et al.*, 1988).



Figura 1. Planta de café
(Suarez-Quiroz *et al.*, 2019)

De las más de 80 variedades de café que han sido identificadas en todo el mundo sólo dos tienen una gran importancia comercial a nivel mundial en la actualidad: *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. A partir de los frutos maduros del arbusto se obtiene el café verde, el cual que no tiene el olor, sabor y color típico del café que conocemos. Para que el café logre tener las cualidades sensoriales de sabor y aromas características deben de eliminarse las capas que lo cubren, y luego este grano debe ser tostado. El proceso de tostado es fundamental debido a que en este

proceso se producen reacciones químicas y físicas que son responsables de la formación de los compuestos precursores de sabor y aroma.

1.1.1 Su importancia como producto comercial

El café tiene una gran importancia económica a nivel mundial, ya que sus semillas, tostadas, molidas y en infusión, constituyen la bebida no alcohólica más consumida actualmente. Su cultivo es la actividad económica principal de varios países en desarrollo, y se estima que su procesamiento y comercialización genera más de 70.000 millones de dólares al año, dando trabajo a más de 125 millones de personas. Los suministros comerciales de café provienen de más de una especie, pero es *Coffea arabica* (cafeto de Arabia) la que suministra la mayor cantidad y mejor calidad de semillas (Rojo, 2014).

La dinámica de la producción mundial de café se caracteriza en general por una considerable inestabilidad y por el hecho de que, a una cosecha grande en un año anterior, le sigue con frecuencia una cosecha pequeña al siguiente. En los últimos 50 años ha habido un crecimiento constante en la producción mundial, intercalada por descensos periódicos (Waller *et al.*, 2007).

La oferta mundial de café está formada por la producción y las existencias en los países exportadores e importadores. Al igual que la mayor parte de los productos básicos agrícolas, el café está sujeto a considerables variaciones en la producción atribuibles a factores agronómicos y climáticos. Sin embargo, lo que se suele observar es una correlación negativa entre las existencias mundiales y los precios, de forma que en general pocas existencias suponen precios altos. Cabe señalar también que el comportamiento de los precios del café muestra fuertes correlaciones cuantitativas entre la disponibilidad y el consumo mundial, entre las existencias mundiales y el consumo, y entre las existencias iniciales y el consumo (Rojo, 2014).

La cadena de valor del café hace referencia a todos los ingresos generados desde la producción hasta el producto final. Las actividades que integran esta cadena están divididas entre los países productores, que en general exportan café verde, y

los países consumidores, que transforman el café verde en otros productos procesados aptos para el consumo final (Rojo, 2014).

En términos sociales es un hecho ampliamente reconocido que el café desempeña una importante función en el asentamiento de la población dedicada a la agricultura y en la creación de empleo en las zonas rurales. Cuando los precios disminuyen y llegan a ser más bajos que los costes de producción, la sostenibilidad de la economía en países que dependen mucho del café, se ve fuertemente amenazada (Rodríguez *et al*, 2011).

1.1.2 Factores que intervienen en la calidad del grano

La calidad del café es el resultado de un conjunto de procesos que permiten la expresión, desarrollo y conservación de las características fisicoquímicas propias del café hasta el momento de su transformación y consumo.

La calidad del café se define como el óptimo estado de este en la prueba de taza. Por lo tanto, la calidad del café es el conjunto de cualidades sensoriales que presenta este.

Dentro de los factores que son determinantes en la calidad del café se consideran las condiciones de la naturaleza (suelo, clima, altitud etc.); métodos y procedimientos del cultivo; tipo de beneficio; preparación de la bebida y almacenamiento, es toda una cadena de producción realizada en el café, estos métodos de preparación del café antes de la etapa de tostado afectan significativamente la calidad y el precio del producto final (Clarke y Macrae, 1988).

El almacenamiento es una etapa de gran importancia en la oferta y la demanda en el mercado internacional del café, esto conduce a los productores a almacenar el grano antes de ser tostado; tomando todas las precauciones para que se conserve la calidad en espera de mejores precios por el producto (Suarez-Quiroz *et al.*, 2004).

El precio del café está ligado a la calidad. Este componente de calidad incluye elementos básicos como: ser adecuado para el consumo humano, carecer de materias extrañas, plagas y hongos, además de tener la descripción del contrato o

muestra de venta, y presentar una calidad uniforme en la totalidad del lote, y no presentar sabores desagradables (taza limpia) (Cañas *et al*, 2015).



Figura 2. Ciclo del grano de café
(Haughto *et al*, 2014)

1.2 Beneficiado del café

El fruto cosechado, para ser producto comercial, debe ser sometido a varios tratamientos sucesivos que constituyen el beneficio. Este procesamiento puede ser por tres vías: Vía húmeda (con ausencia de agua o sumergida), vía mecánica o vía seca.

El objetivo de estos métodos es eliminar las partes externas del café cereza, es decir, la piel del fruto (exocarpio), la pulpa (mesocarpio), y el pergamino (endocarpio), para obtener café verde (Masoud *et al*, 2004).

1.2.1 Fermentación del café vía húmeda

La fermentación puede ser definida como la conversión química que ocurre dentro de una matriz biológica, la cual puede ser catalizada por enzimas e influenciada por factores externos tales como temperatura, una reducción del suplemento de oxígeno, etc. (Rothfos, 1980).

Es el proceso tecnológico de carácter bioquímico empleado para digerir el mesocarpio mucilaginoso, y permitir su eliminación posterior. El mucílago o mesocarpio es una estructura rica en azúcares y pectinas, que cubre el endospermo

de la semilla del café y mide aproximadamente 0,4 mm de espesor (Dicovski, 2009).

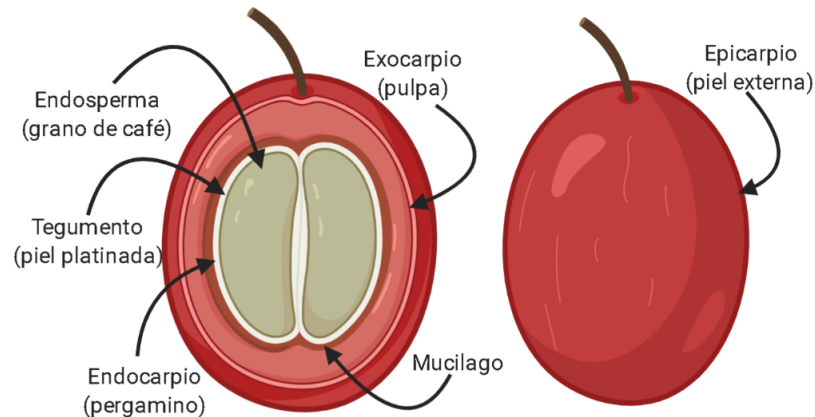


Figura 3. Capas que componen al grano de café (Figuerola,2019)

La fermentación, puede ser considerada como una de las etapas determinantes sobre la calidad del grano. En esta etapa, ocurren varias reacciones bioquímicas; básicamente, las levaduras y las bacterias presentes en el mucílago mediante sus enzimas naturales oxidan parcialmente los azúcares, produciendo energía (ATP) y otras sustancias como alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas, ésteres y dióxido de carbono (Puerta, 2012).

Debido al crecimiento microbiano, se generan cambios en el color, olor, densidad, acidez, pH, actividad de agua, y en la composición química del grano, los cuales se consideran como factores relevantes en la calidad final, y están directamente relacionados con el tiempo de duración de la etapa fermentativa (Koskei,2015).

Después de la remoción del mucílago vía mecánica o por fermentación natural, se pasa al proceso de lavado donde se retiran los productos de degradación del mucílago, y finalmente, en el secado se reduce la cantidad del agua del grano pergamino hasta un 12% (Puerta, 2006a; Puerta, 2008). La vía húmeda produce

café de mejor calidad y esta es utilizada para procesar principalmente el café arábica (González-Ríos *et al.*, 2007).

La fermentación natural del café debe de ser cuidadosamente controlada, de lo contrario, puede desarrollarse sabores no deseados, que son reflejados en la calidad en taza. Como resultado de una mala fermentación se genera ácido propiónico y ácido butírico, que son sabores no deseados (Evangelista *et al.*, 2014).

1.2.2 Objetivos de la fermentación

La fermentación tiene dos objetivos importantes el primero es la remoción de la pulpa, el mucilago que rodea los granos de café, esto para obtener lo que se le conoce como “café pergamino” (Masoud *et al.*, 2004) y el segundo es mejorar la apariencia externa de la semilla del café.

Para la obtención de mejores resultados se deben de cumplir los dos objetivos mencionados anteriormente, teniendo cuidado de no afectar la calidad del grano.

1.2.3 Microorganismos que intervienen

El uso de cepas iniciadoras es favorable para la producción de café de alta calidad con características distintivas, por ejemplo, una intensa percepción de sabor a notas florares y de vainilla (de Melo *et al.*, 2015). Sin embargo, para la obtención de cultivos iniciadores se requiere primeramente conocer los microorganismos nativos que se encuentran durante la fermentación. El uso de cultivos iniciadores es una alternativa viable para dirigir la etapa de fermentación y para asegurar una calidad consistente del producto terminado.

Los principales microorganismos del mucílago de café son levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* y *Rhodotorula*; las bacterias principalmente pertenecientes a los géneros: *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*; y algunos hongos, cuyo recuento depende de la manipulación de los frutos de café durante la recolección y de las condiciones en que permanecen los granos en el beneficio del café (Marín *et al.*, 2012)

1.3 Almacenamiento

Las metas del almacenamiento del café son mantener y retener el valor comercial del producto. Además, busca preservar la integridad del grano por el tiempo más largo posible sin afectar de forma severa su calidad original.

Algunas consideraciones que debemos tener al respecto son: que la semilla de café es un organismo vivo con una actividad fisiológica constante dentro del grano, que la seguridad del producto o alimento puede desarrollar sustancias tóxicas que pueden ser dañinas a la salud humana (Ocratoxinas) y que la duración del almacenamiento tiene impacto en la calidad del café (Monroig, 2005).



Figura 4. Sacos de café almacenados
(Broissin *et al.*, 2017)

1.3.1 Parámetros de la calidad del grano de café durante su almacenamiento

El almacenamiento de granos de café se considera una fase crítica para mantener la calidad de la bebida. Se ha observado que, durante el almacenamiento de los granos de café, estos sufren un deterioro debido a diversas alteraciones físicas, químicas, sensoriales que culminan con la pérdida de la calidad y precio desvalorado del café (Selmar *et al.*, 2008; Haddad *et al.*, 2014).

La determinación de los parámetros de calidad es importante para evaluar la funcionalidad de los atributos del grano y determinar su uso final (Clarke *et al.*, 2001), parámetros que son el resultado del control que se haya logrado en el cultivo, la cosecha, el beneficio, el almacenamiento y la trilla (Wheeler, 2001).

Clarke *et al.* (2001) y González-Ríos, *et al* (2007), opinan que la calidad del grano se puede deteriorar si la humedad es diferente al 12 %, porque a su juicio la actividad bioquímica de la semilla genera al café sabores no deseables.

1.3.2 Marcadores de calidad en el café durante su almacenamiento.

La preservación y conservación de las cosechas representan hoy en día una cuestión vital. Por lo tanto, el propósito del almacenamiento es preservar la calidad del café después de su cosecha, limpieza y secado. Además, nos permite homogenizar los contenidos de humedad de los diferentes granos por la transferencia de humedad de los más húmedos a los más secos (Banegas, 2009).

La producción de café es discontinua y periódica mientras que su consumo es de forma permanente e interrumpida. Para llevar a un equilibrio entre estos dos aspectos es necesario almacenar la producción para atender la demanda que se presenta durante el período entre cosechas (Guyot, 1996).

Es por esto, que es importante tener un control y seguimiento de los marcadores de calidad en el café durante su almacenamiento, los marcadores más importantes son calidad física, aromática, sanitaria y sensorial.

Las condiciones agroecológicas, unida a las variedades cultivadas y al sistema de beneficio utilizado, pueden influir en la calidad en taza (Raynolds *et al.*, 2007). La altitud puede tener un efecto significativo en la composición bioquímica, la calidad física y organoléptica de la taza de café (Lara *et al.*, 2007). El proceso de beneficio también es uno de los factores determinantes en obtención de la calidad del grano, ya que fallas en el proceso pueden originar hasta el 80% de los problemas de calidad (Aristizabal *et al.*, 2006). Así mismo, un buen beneficio influye favorablemente en la obtención de un café suave, determinando la calidad de la bebida (Puerta, 2000).

Para obtener una taza de café de buena calidad y equilibrada en todas sus cualidades sensoriales cuando se procesa el café, es necesario un control en cada una de las etapas de beneficio, así como en la recolección de cereza madura, despulpado y en la fermentación en tanques limpios (Puerta, 2000).

Las cualidades sensoriales del café comprenden el aroma, la acidez, el amargor, el cuerpo, el sabor y la impresión global de la bebida por su intensidad y balance se mide la calidad del café.

Cuidando estos marcadores se podrá mantener los granos de café almacenados durante mucho más tiempo, y con la confianza de que su calidad será constante, desde el día uno que se almaceno hasta el tiempo que se tenga en almacenado.

1.3.3 Factores que intervienen en el deterioro de los marcadores de calidad en el café durante su almacenamiento.

1.3.3.1 Contenido de humedad

La humedad es un factor que tiene un gran impacto en la velocidad con la cual el grano se deteriora. De manera general se conoce que el contenido ideal de humedad en el grano está entre el 11-12% para el Café arábica y 13% para el Café canephora. Sin embargo, a estas humedades aún queda en el grano agua libre que puede participar en reacciones de deterioro.

Por tanto, los estudios realizados nos permiten constatar que cuanto mayor sea la humedad del producto almacenado mayor será su oxidación, lo que implica una peor conservación (Harrys *et al.*, 2008)

1.3.3.2 Humedad relativa

La humedad relativa en el almacén es un factor determinante en la calidad del grano, un nivel del 75% de humedad relativa en el almacén corresponde a un contenido de humedad en el grano de 15-16 %; este porcentaje es crítico para la formación de hongos (Wintgens, 2004)

1.3.3.3 Temperatura

El almacenaje del café verde bajo condiciones de temperatura alta es también uno de los factores que más afectan la calidad del grano, produciendo un cambio de color que va del azul grisáceo al café para luego desvanecerse. El cuerpo de la bebida desarrolla sabores amargos que luego adquiere sabor a moho y finalmente a madera (Puerta, 2006).

1.3.3.4 Actividad de agua (Aw)

La actividad de agua es una propiedad que indica la disponibilidad de agua en un alimento para que existan reacciones químicas, bioquímicas (oxidación de lípidos, reacciones enzimáticas, reacción de Maillard) y desarrollo microbiano (Comaposada *et al.*, 2000).

Para garantizar una buena conservación es necesario almacenar el café con una humedad entre el 11-13% que corresponde a una Aw de 0.55-0.60, condición a la cual el café es microbiológicamente estable (Suárez-Quiroz *et al.*, 2004).

1.3.4 Deterioro del grano de café durante el almacenamiento.

Al no existir un almacenamiento con parámetros controlados, una tecnología apropiada para el almacenamiento y condiciones insuficientes para la conservación del grano de café, estos quedan expuestos a condiciones de humedad relativa, actividad de agua y temperatura que favorecen su deterioro. Estos factores repercuten en pérdidas en su calidad y favorecen el desarrollo de hongos (Juárez-Becerra *et al.*, 2010).

Si las condiciones que rodean al grano no son adecuadas, la presencia del deterioro será rápido. La humedad relativa y la temperatura son los dos factores ambientales de mayor importancia en la conservación, si estos son altos el deterioro se manifestará rápidamente, sin embargo, si estos son bajos, se prolonga la calidad del grano de café (Codex Alimentarius, 2013).

El contenido de humedad del grano está en función directa de la humedad relativa y temperatura ambiental, esto es debido a la capacidad higroscópica del grano, al tener la capacidad de ceder o ganar humedad de acuerdo a las condiciones ambientales que se presenten. Las mejores condiciones para realizar un almacenamiento y conservación de granos de café es un lugar fresco y seco (Juárez-Becerra *et al.*, 2010).

1.4 Principales contaminantes del grano de café

Entre los potenciales contaminantes del café pueden indicarse los residuos de plaguicidas, y los metabolitos producidos por ciertos hongos denominados micotoxinas, siendo la Ocratoxina A (OTA) la más relacionada con el café (Codex

Alimentarius, 2013). El riesgo de contaminación existe a lo largo de la cadena de producción, transformación, almacenamiento y transporte, lo que amerita una amplia vigilancia preventiva.

La unión europea dice que unos de los mayores riesgos es el tiempo y manejo de la cosecha hacia su etapa de secado del café verde, es por eso que exige que los productores mejoren el sistema que impida la formación de hongos (FAO, 2006).

Países como Japón, Estados Unidos, y los miembros de la Unión Europea, aplican estrictas medidas de control cuarentenario para impedir el ingreso de productos contaminados, con las implicaciones de pérdidas económicas y sanciones que pueden llegar a la prohibición de ingreso temporal o definitivo, de los productos alimenticios del país proveedor (FAO, 2006).

1.4.1 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, capaces de crecer en gran variedad de sustratos y bajo las más diversas condiciones ambientales, contaminando con frecuencia alimentos, en especial los de origen vegetal (Marín, 2013). La respuesta tóxica causada por las micotoxinas en el hombre y los animales se denomina “micotoxicosis”.

Las micotoxicosis han sido descritas desde la antigüedad y para algunos investigadores fueron la causa de la última de las diez plagas de Egipto (Marr *et al*, 1996). Los primeros casos documentados de estas intoxicaciones datan de la Edad Media en Europa, en donde se denominó a este cuadro clínico como “fuego del infierno”, debido a las alucinaciones, psicosis, delirios, convulsiones, sensación de quemazón y necrosis distal, que producían como resultado de la ingestión de alimentos preparados con cereales contaminados con alcaloides del cornezuelo o *Claviceps puerpurea* (González, 2010).

La micotoxicología moderna nace en 1962 gracias al descubrimiento de las aflatoxinas, a raíz de una crisis veterinaria que ocurrió cerca de Londres y en la que murieron alrededor de 100 000 pavos a causa de esta micotoxina (Parada, 1988). Las micotoxinas son producidas principalmente por hongos filamentosos bajo unas condiciones óptimas de temperatura que oscilan entre los 20-25 °C, requieren de

un pH entre 4 y 8 y una humedad relativa de 80 a 90 % (Murray *et al.*, 2009). Por su capacidad toxigénica las micotoxinas más importantes son: aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenas (deoxinivalenol- toxina T2) y las fumonisinas (Nakayama *et al.*, 2014).

La exposición a sus metabolitos tóxicos puede generar carcinogénesis, teratogénesis, inmunosupresión y cuadros clínicos de neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, mielotoxicidad, toxicidad pulmonar y endocrina (Marroquín *et al.*, 2014); siendo los mecanismos más importantes para la aparición de tales manifestaciones el estrés oxidativo y la genotoxicidad inducida por micotoxinas (Hope, 2013).

Las micotoxinas pueden disolverse en las fases lipídicas (fundamentalmente) o acuosas de los alimentos, y difundir al interior de ellos, ya que presentan una amplia variedad química (Pitt, 1996).

En consecuencia, estas toxinas pueden ser encontradas principalmente en cereales, semillas, frutas, y alimentos elaborados en base a estas materias primas. Se ha estimado que hasta un 25% de los cultivos alimentarios mundiales están contaminados con micotoxinas (OMS, 1999).

Aunque existen muchos tipos de micotoxinas, en la Tabla 1 se presenta algunas de las principales, en cuanto a presencia en productos alimenticios y toxicidad para los seres vivos, también se incluye los hongos productores, los alimentos principales que contaminan y sus efectos tóxicos más representativos.

Tabla 1. Principales micotoxinas presentes en alimentos.

MICOTOXINA	HONGO	SUSTRATO PRINCIPAL	PRINCIPALES EFECTOS TOXICOS
Aflatoxinas	<i>Aspergillus sp.</i>	Cereales, leche, frutos secos	Altamente cancerígena, produce toxicidad y cáncer de hígado.
Citrinina	<i>Penicillium sp.</i>	Cereales y frutas	Efecto nefrotóxico, inmunosupresor
Fumonisinias	<i>Fusarium sp.</i> <i>A. Niger</i>	Cereales (maíz)	Carcinógena, hepatotóxica
Ocratoxinas	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i>	Cereales, café, legumbres, quesos, carnes ahumadas, frutas	Efectos neurotóxicos, necrosis hepática, efectos inmunosupresores
Patulina	<i>Penicillium sp.</i>	Cereales, frutas, quesos	Neurotóxica, afecciones pulmonares, lesiones de hígado y riñón, carcinomas, inmunosupresor
Tricotecenos (T2, NIV, DON)	<i>Fusarium sp.</i>	Cereales	Afecciones sistema digestivo, circulatorio, nervioso y piel.
Zearalenona	<i>Fusarium sp.</i>	Cereales y subproductos	Afecciones sistema reproductor, estrógeno.

NIV: Nivalenol, DON: Deoxinivalenol, T2: Toxina T2

(González-Salgado, 2010)

La mayoría son moléculas complejas, con estructuras que van desde anillos heterocíclicos sencillos con pesos moleculares de 50 Da, a estructuras con pesos moleculares mayores a 500 Da. Al ser moléculas pequeñas, no inducen respuesta en el sistema inmune humano. Por lo tanto, el principal riesgo de la presencia de micotoxinas en la dieta humana reside en la incapacidad del ser humano para detectarlas biológicamente (Pitt, 1996).

1.4.2 Datos generales de toxicocinéticos y de toxicidad.

Una vez ingerida, esta micotoxina se absorbe casi por completo en el tracto gastrointestinal y alcanza rápidamente la circulación general (Kumagai *et al.*, 1982). Aunque la ingesta de OTA a través del consumo de alimentos contaminados no sea elevada, los parámetros toxicocinéticos y la capacidad de unirse a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, contribuyen a la larga vida media de esta micotoxina, aumentando así su potencial tóxico (Chu, 1971; Schlatter *et al.*, 1996).

La OTA es principalmente nefrotóxica. En estudios epidemiológicos se ha asociado al consumo crónico de OTA con el desarrollo de ciertas enfermedades endémicas, tanto en animales como en el hombre. En animales de granja el consumo crónico de la OTA se ha identificado como factor determinante en la etiología de la nefropatía porcina y de la nefropatía aviar espontánea (Krogh, 1987; Huff *et al.*, 1995), y en el hombre se le cree responsable de la Nefropatía Endémica de los Balcanes por la similitud entre sus síntomas y los de la nefropatía aviar y porcina, pero esta enfermedad es todavía hoy día un misterio para los epidemiólogos (Bozic *et al.*, 1995; Plestina; 1996). También se han demostrado efectos tóxicos de la OTA sobre el sistema inmune, nervioso y sobre el hígado.

Es teratogénica y carcinogénica en animales de experimentación y está clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) en el grupo 2B, como posiblemente carcinogénica en humanos (IARC, 1993). En cuanto a su potencial mutagénico, los datos a veces contradictorios, son objeto de este artículo de revisión.

1.4.3 Ocratoxina (OTA) en café

Su presencia como contaminante en café verde fue descrita por primera vez por Levi *et al.*, (1974) en niveles que fluctuaron entre 20 a 360 ppb y un límite de detección de 20 ppb. Desde entonces y hasta la fecha, los métodos de cuantificación de OTA son cada vez más sensibles y han puesto de manifiesto que la contaminación por esta toxina en café sigue siendo un problema que pone en riesgo la salud de los consumidores.

Los generos *Aspergillus* y *Penicillium* están asociados a la producción de metabolitos secundarios tóxicos, tales como Ocratoxina A (OTA). En áreas tropicales es principalmente producida por *Aspergillus carbonarius*, *A. niger* y *A. ochraceus* (Niño, 2018).

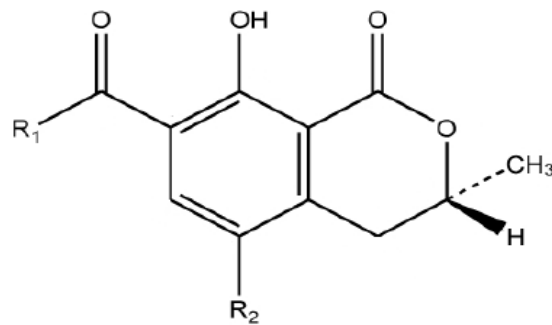


Figura 5. Estructura general de la molécula de ocratoxina A.

(González-Salgado, 2010)

Las especies de la sección *Nigri* han adquirido gran importancia como productoras de OTA desde la primera descripción de la producción de esta micotoxina por *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994), por *A. carbonarius* (Horie, 1995), y por *A. tubingensis* (Medina *et al.*, 2005).

La producción de OTA está relacionada principalmente a hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*. En zonas templadas como México, la principal cepa aislada es *A. westerdijkiae* (Suárez-Quiroz *et al.*, 2004).

Humedad, temperatura, el tipo de sustrato y algunos otros factores juegan un rol importante en el desarrollo de cepas productoras de OTA y sus toxigenesis (Le-Bars, 1988). Los factores que afectan el desarrollo de la cepa durante el almacenamiento son actividad de agua (*Aw*) y temperatura (Northolt *et al.*, 1979).

La revisión de la identificación de cepas Ocratoxigénicas de *P. viridicatum* permitió detectar que, en realidad, se trataba de cepas de *P. verrucosum* (Pitt, 1987). *P.*

verrucosum se ha dividido en dos especies ocratoxígenas: *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Frisvad *et al.*, 2004; Bragulat *et al.*, 2008).

Para la generación de OTA existen principalmente dos tipos de factores, estos son: los factores intrínsecos y extrínsecos. De los cuales los primeros están ligados al tipo de especie y los segundos, engloban la actividad de agua, humedad, temperatura, etc.

1.4.4 Regulación de la OTA.

En el caso de regulaciones para OTA, en 1991, el Comité Conjunto de Expertos sobre Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS (Joint Expert Committee on Food Additives) estableció un valor de ingesta semanal tolerable para OTA de 112 ng/kg de peso corporal (16 ng/kg/día). En 1998, debido a las propiedades tóxicas de la OTA, el Comité Científico sobre Alimentos de la UE (European Union Scientific Committee for Food) estimó que el nivel aceptable de seguridad en la ingesta diaria de OTA debía estar por debajo de 5 ng/kg. Desde el año 2002 la Unión Europea (UE) dispone de una normativa por la que se establecen los niveles máximos de OTA en distintos alimentos.

Para el 2006 la Unión Europea propuso para los contenidos máximos de OTA permitidos en los alimentos citados en la siguiente Tabla 2. La EFSA en ese mismo año declara una ingesta semanal tolerable para OTA de 120 ng/kg de peso corporal (EFSA, 2006).

Tabla 2. Contenido máximo de OTA permitido en alimentos para los estados miembros de la Unión Europea.

PRODUCTO ALIMENTICIO	LIMITE OTA (μG/KG)
Cereales:	
- Cereales no elaborados	5
- Productos derivados de cereales no elaborados, incluido los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano diario	3
Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10
Café:	
- Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5
- Café soluble (café instantáneo)	10
Vino:	
- Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licor y los vinos con un grado Alcohólico mínimo del 15% vol.) y vino de frutas	2
- Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cocteles aromatizados de productos vitivinícolas	2
Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo.	2
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.	0.5
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales y dirigidos específicamente a los lactantes.	0.5

(Comisión Europea, 2006).

1.5 Métodos para el control de hongos

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades de pre y poscosecha en los diferentes cultivos, siendo estos responsables de pérdidas económicas. Existen dos métodos principales para control de hongos patógenos en el café los cuales son los métodos químicos y los métodos alternativos con microorganismos (García-Moraleja *et al.*, 2015).

1.5.1 Fungicidas (control químico).

Un fungicida es un producto químico que es utilizado para eliminar o evitar el desarrollo de hongos fitopatógenos; la mayoría de ellos son fungistáticos o bacteriostáticos, es decir, no matan, sino que inhiben el desarrollo del microorganismo. Debido a que es un producto químico se debe de manejar con mucha precaución, esto para evitar cualquier daño a la salud humana, de los animales y del medio ambiente, debido a lo anterior se han buscado otras alternativas para el control de hongos. Sin embargo, debido al uso incontrolado de los fungicidas, han causado que los hongos se vuelvan resistentes a este tipo de métodos. Debido a esto surgen nuevos métodos para control hongos fitopatógenos (Gaviria-Hernández *et al.*, 2013)

Entre los tipos de fungicidas que se utilizan son los fungicidas cúpricos, los sistemáticos triazoles, Hexaconazole, Triadimenol, Clorotalonil, Orthocide, Tiofanato Metilico, estrobilurinas, entre otros.

1.6 Métodos alternativos por uso de microorganismos (biocontrol)

Los microorganismos antagonistas se han utilizado como agentes de biocontrol para diversas enfermedades post-cosecha en fruta fresca. Éstos pueden ser aislados de la superficie de los frutos o las hojas. Para el uso adecuado de este tipo de microorganismo es importante comprender los mecanismos de acción involucrados en la actividad de biocontrol, para un desarrollo más seguro de los procesos de aplicación y una base para seleccionar cepas nuevas y eficientes (Hernández *et al*, 2007; Silvana *et al.*, 2002).

Se deben abordar estudios básicos a nivel bioquímico y molecular que contribuyan a elucidar efectos tales como la antibiosis, la competencia por los nutrientes y la inducción de resistencia. En la mayoría de los estudios de biocontrol es aplicado un solo agente biocontrolador. Sin embargo, se ha señalado que se requiere evaluar el efecto de varios antagonistas combinados para asegurar un control adecuado de la enfermedad, disminuyendo dosis y minimizando el empleo de productos sintéticos,

considerando además que el uso de aditivos mejora el efecto de los microorganismos antagonistas (Hernández *et al*, 2007).

Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos, así también como microorganismos patógenos, nematodos, caracoles, insectos, ácaros, y vertebrados) tienen la capacidad de ejercer un efecto de biocontrol sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales (De Costa *et al.*, 2005; Wisniewski *et al.*, 1992).

1.6.1 Biocontrol

El biocontrol definido por Baker y Cook (1974) hace más de 20 años, como “La reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar”.

Por esta razón, se hablará de Biocontrol cuando se haga referencia a la utilización de microorganismos antagonistas para el control de enfermedades, entendiéndose por antagonistas, aquellos organismos que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos.

1.6.2 Tipos de biocontrol

El biocontrol puede suceder en forma natural, cuando dichos enemigos naturales de una plaga limitan su reproducción o desarrollo sin intervención humana. O puede ser un control aplicado, consecuencia de una selección y manipulación sobre bases científicas de esos enemigos naturales. Existen diferentes tipos de biocontrol de los cuales uno de los más utilizados es el control microbiológico (Figura 6).

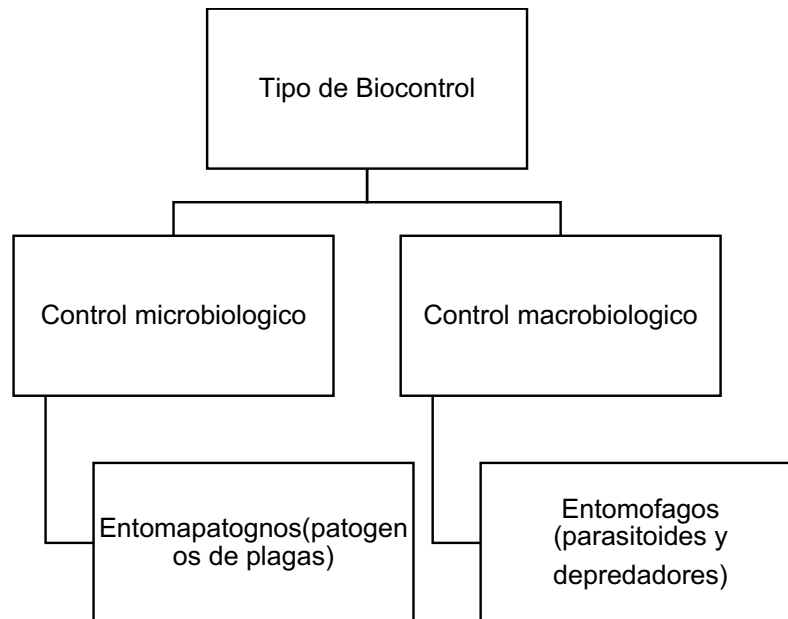


Figura 6. Tipos de Biocontrol (Cabrera, 2016)

1.6.3 Control microbiológico

El biocontrol es el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos. De manera similar al uso de bacterias benéficas (como los lactobacilos) para preservar alimentos o prevenir infecciones gastrointestinales. El biocontrol de plagas y patógenos ha sido utilizado en la agricultura de manera empírica desde sus inicios (Serrano *et al.*, 2007; Woodhead *et al.*, 1990).

La razón principal por la cual muchos productos agrícolas no son destruidos completamente por las plagas y las enfermedades es la presencia natural de agentes de biocontrol: organismos capaces de antagonizar con las plagas o patógenos, reduciendo sus efectos nocivos. El desarrollo y aplicación de este potencial de la naturaleza cobra cada vez mayor importancia, y seguramente tendrá un gran impacto en la agricultura en el futuro cercano. Recientemente, la aplicación de la ingeniería genética (la introducción artificial de genes de una especie en otra)

para mejorar la resistencia de cultivos a plagas o patógenos ha abierto un sinfín de posibilidades para el control biológico (Serrano *et al*, 2003).

1.7 Levaduras utilizadas como antagonistas

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de organismos unicelulares, incluyendo especies patógenas para plantas y animales, así como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad (González *et al*, 2003; Suárez *et al.*, 2016).

La aplicación de las levaduras tiene un gran potencial en la reducción del daño económico causado por hongos toxigénicos en la agricultura. Algunas levaduras actúan como agentes de biocontrol para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos (Pfliegler *et al.*, 2015).

La aplicación de las levaduras en varios procesos tecnológicos puede tener un efecto inhibitor directo sobre la producción de toxinas, que es independiente de su efecto de supresión de crecimiento. Además, varias especies de levadura son capaces de acumular las micotoxinas de productos agrícolas, y de ese modo la descontaminación eficiente de ellas. Varias cepas de levadura también son capaces de degradar las toxinas a sustancias menos tóxicas o incluso no tóxicas (Pfliegler *et al*, 2015). En la siguiente tabla (Tabla 3) se presentan algunas de las levaduras que han sido utilizadas como agentes de biocontrol para la conservación de los alimentos.

Tabla 3. Algunas de las levaduras más utilizadas para Biocontrol en alimentos.

<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Candida oleophila</i>
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus flavus</i>
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Pichia kluyveri</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>

(Pfliegler *et al*, 2015)

Como una alternativa en los últimos 25 años, se ha evaluado la eficiencia de diferentes microorganismos, incluyendo levaduras, para el biocontrol de hongos filamentosos (Leibinger *et al.*, 1997; Janisiewicz y Korsten, 2002; Mari *et al.*, 2003;

Benítez-Ahrendts y Carrillo, 2004; Bencheqroun *et al.*, 2007; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007; Droby *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010). Las levaduras poseen características que las sitúan, dentro de los microorganismos, con gran potencial para su uso como agentes de biocontrol, esto por sus diferentes mecanismos que utilizan para la inhibición de metabolitos secundarios generados por hongos filamentosos (Guerrero-Prieto *et al.*, 2012).

La prevención de la aparición de los hongos toxigénicos es la forma más directa para prevenir la contaminación por micotoxinas. Durante las últimas dos décadas, las levaduras se han convertido en herramientas principales en la investigación de agentes de biocontrol, ya que muchas especies muestran propiedades antagonistas prometedoras contra hongos filamentosos que infectan frutas, verduras, granos, o productos cárnicos curados, además de que varias de estas especies de hongos filamentosos son toxigénicos (Liu *et al.*, 2013; Kabak *et al.*, 2016, Pfliegler *et al.*, 2015). Las especies de levaduras antagónicas son capaces no solo de reducir la pérdida económica causada por hongos patógenos filamentosos pre o pos-cosecha, sino que también son útiles en la prevención de la contaminación por micotoxinas de diversos productos, y también se consideran generalmente ecológicas (Cheong *et al.*, 2013; Pfliegler *et al.*, 2015).

1.7.1 Mecanismos utilizados para la degradación de micotoxinas por levaduras

Debido a su gran adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, pueden utilizarse como agentes de control biológico, y a su vez, pueden usar uno o más mecanismos de antagonismo.

La capacidad antagónica de las levaduras contra los hongos filamentosos puede atribuirse a la competencia por nutrientes y espacio, secreción de compuestos antifúngicos, parasitismo en los hongos patógenos, formación de biopelículas, así como la inducción y estimulación de la resistencia de la planta huésped como una respuesta de defensa que involucra la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la producción de enzimas hidrolíticas y efecto killer (Lee *et al.*, 2015).

1.7.2 Inhibición de la producción de micotoxinas.

Las levaduras pueden producir metabolitos que tienen un efecto supresor significativo sobre la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de micotoxinas o bien pueden inhibir el crecimiento de hongos filamentosos. El principal VOC es el 2-feniletanol, este inhibe la germinación de las esporas y la biosíntesis de toxinas como la aflatoxina B1 (AFB1) produciendo por *P. flavus* (Pettersson *et al.*, 1998; Pfliegler *et al.*, 2015).

La inhibición de la biosíntesis de OTA, que es una de las micotoxinas más importantes, también se ha relacionado con varias levaduras. Es notable que las cepas de *P. anomala* y *S. cerevisiae* pudieron reducir significativamente la producción de OTA de *Penicillium verrucosum*, mientras que los efectos de inhibición del crecimiento de estas levaduras fueron menos marcados. Los mecanismos de inhibición no se investigaron en detalle, pero no se observó adsorción o degradación de la toxina, lo que indica que la biosíntesis de OTA en sí estaba inhibida (Pettersson *et al.*, 1998)

Además de la adsorción de micotoxinas, se tiene conocimiento que la capacidad de algunas levaduras de inhibir la biosíntesis de OTA de *Aspergillus westerdijkiae* a nivel de la transcripción (Pfliegler *et al.*, 2015). Se encontró que una cepa de vino de *S. cerevisiae* antagonizaba el crecimiento de *Aspergillus* y también inhibía la producción de OTA de *A. carbonarius* y *A. ochraceus* a través de la represión del gen biosintético pks (policétido sintasa) (Cubaiu *et al.*, 2012; Pfliegler *et al.*, 2015).

1.7.3 Biodegradación de micotoxinas

La biodegradación de micotoxinas es una de las características más prometedoras de las levaduras aplicadas como agentes de biocontrol. La mayoría de los aditivos bacterianos han sido investigados para la descontaminación y desintoxicación de DON, una de las toxinas más abundantes e importantes en los alimentos y alimentos para animales, pero también se ha demostrado que las levaduras son útiles contra esta toxina.

Las capacidades de desintoxicación de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum fermentans*, *Kluyveromyces marxianus* y *Metschnikowia pulcherrima* han sido probadas en harina de trigo y forraje contaminados con micotoxinas. La pared celular de las levaduras hace que las células sean capaces de adsorber una amplia gama de compuestos del medio ambiente. Las células viables, las células no viables y los productos de pared celular de las levaduras probióticas con alta capacidad de adsorción son capaces de reducir la biodisponibilidad de toxinas en los alimentos.

Se ha demostrado que los componentes de la pared celular de las levaduras como los b-D-glucanos, glucomananos y manano-oligosacáridos son los responsables de la adsorción de micotoxinas. La capacidad de adsorción depende tanto del componente de levadura como del tipo de las micotoxinas, pero no está correlacionada directamente con ninguna característica bioquímica de la levadura (por ejemplo, contenido de manano o glucano) (Pfliegler *et al.*, 2015).

La descontaminación de toxinas parece requerir la integridad estructural de la pared celular de levadura y las células no viables (por ejemplo, tratadas con calor o ácido) son generalmente más eficaces en su capacidad de adsorción (Pfliegler *et al.*, 2015). La cantidad de toxina eliminada depende tanto de las concentraciones de toxinas y microorganismos como de la cantidad total de pared celular. Recientemente se demostró que el potencial de las levaduras vinícolas para adsorber OTA está controlado genéticamente y es un rasgo hereditario poligénico,

que puede explotarse en estrategias de mejoramiento para desarrollar cepas adsorbentes de micotoxinas más efectivas (Pfliegler *et al.*, 2015).

1.8 Uso de levaduras para el biocontrol de café

Algunos trabajos en los que se han aislado levaduras *Pichia*, *Sporobolomyces roseus*, *Candida sp.*, se encontró que tenían la mayor actividad antagonista frente a una cepa de *Aspergillus westerdijkiae* que son productoras de OTA. Se realizaron pruebas en agar y fueron seleccionadas para caracterizarlas. Se utilizaron para aplicaciones de fermentaciones en el café cerezas contaminado con *A. westerdijkiae*, mostrando una reducción de contenido de Ocratoxina A (OTA) de hasta un 88%. Estos resultados ponen de manifiesto que ciertas especies de levaduras funcionan como un agente de biocontrol de hongos toxigénicos en granos de café (de Melo *et al* 2014).

También se han utilizado cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Pichia guilliermondii* como cultivos iniciadores para la fermentación de café, demostrando que estas levaduras no sólo funcionan como agentes de biocontrol, sino que también ayudan a mejorar la calidad de la bebida y a mejorar sus precursores aromáticos. Demostrando que, las levaduras durante todas las pruebas realizadas persistieron hasta el final de la fermentación (Evangelista *et al* 2014).

Para que se puedan usar cepas de levaduras para biocontrol se necesitan aislar, seleccionar y hacer una evaluación de estas. Un estudio hace un enfoque experimental para la identificación de objetivos y la selección de levaduras de café autóctonas y su potencial uso como cultivos iniciadores durante la etapa de fermentación del procesamiento húmedo. Demostraron que *Pichia fermentans* produjo las concentraciones más altas compuestos de éster (acetato de etilo y acetato de isoamilo), mientras que *Saccharomyces sp.* fue la mejor cepa productora de pectinasa (de Melo *et al* 2014). Estos compuestos han sido identificados como compuestos fúngicos, que ayudan al biocontrol.

Capítulo II

2. Justificación.

Se ha demostrado que algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ejercen efectos antagónicos sobre el crecimiento de hongos filamentosos, pero en la actualidad no existe información acerca de la capacidad antagónica de las levaduras en la inhibición del crecimiento de hongos o en la síntesis de sus micotoxinas en el café durante el almacenamiento.

3. Hipótesis.

El uso de cultivo iniciador de *Saccharomyces cerevisiae* en la etapa de fermentación tendrá un efecto benéfico en los marcadores de calidad, y estos permanecerán durante el período de almacenamiento.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo General.

- ✓ Estudiar el uso de un cultivo iniciador de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de café como agente de biocontrol de las poblaciones fúngicas que afectan los marcadores de calidad durante el almacenamiento.

4.2 Objetivos Específicos.

- ✓ Evaluar el uso de dos cultivos iniciadores de *Saccharomyces cerevisiae* (L1 y L2) durante la fermentación del café.
- ✓ Estudiar la dinámica de *S. cerevisiae* L1 y L2 durante la etapa de fermentación y el almacenamiento mediante PCR-DGGE.
- ✓ Identificar los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) y no volátiles producidos durante la fermentación y el almacenamiento de café
- ✓ Evaluar la calidad en taza del café verde almacenado durante seis meses.

5. Metodología General.

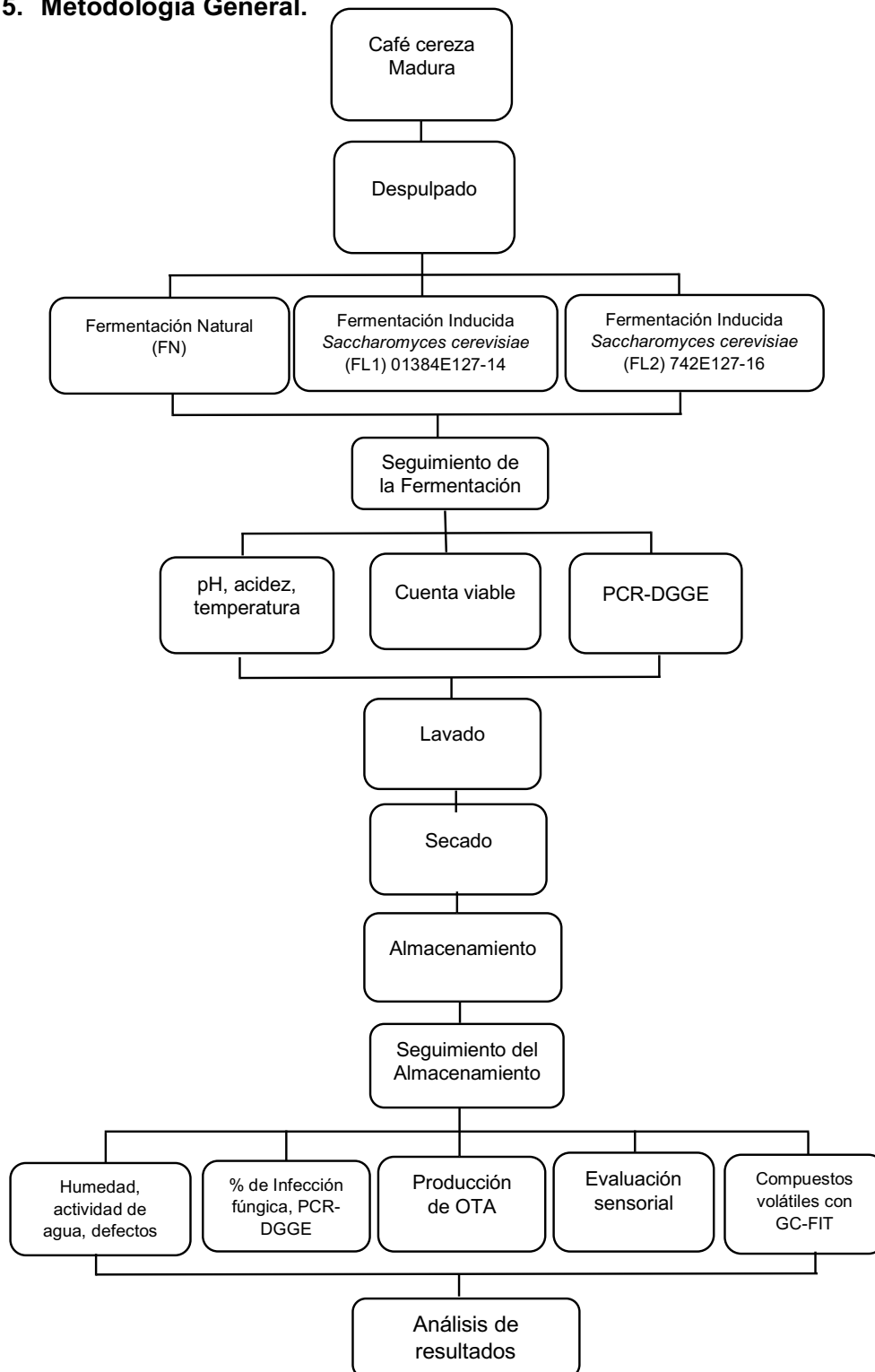


Figura 7. Diagrama general de la metodología

Capítulo III

6. Materiales y Métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Material biológico (cepas de levaduras)

Se utilizaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* L1 (01384E127-14) y L2 (742E127-16) proporcionadas por la empresa Danstar Ferment A.G Suiza. Para su activación se utilizó 1 g de levadura por cada kg de café despulpado, la levadura seca fue rehidratada con agua potable en una relación de 1:10 (p/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de su utilización.

6.1.2 Medios de cultivo

El aislamiento e identificación de cepas se llevó a cabo empleando los siguientes medios de cultivo: agar de papa y dextrosa (PDA) (DIBICO®), agar dicloran-glicerol 18% (DG18). El medio PDA se acidificó con ácido tartárico estéril al 10% (aprox. 1.4 mL de ácido tartárico por 100 mL de medio) para la disminución del pH del mismo a 3.5.

La composición y modo de empleo de cada uno de los medios está descrito en el Anexo I.

6.1.3 Equipo de laboratorio

6.1.3.1 Microscopio estereoscopio

Las observaciones macroscópicas de los cultivos y cepas aisladas se llevaron a cabo utilizando un estereoscopio PLIT modelo ES-24, el cual posee un objetivo único con un rango de 2x a 4x e iluminación.

6.1.3.2 Medidor de color

Las determinaciones de color en el grano verde se llevaron a cabo utilizando un medidor de color Konica minolta modelo CR410.

6.1.3.3 Microscopio de campo claro

Las observaciones microscópicas se llevaron a cabo con un microscopio Motic® BA200, que posee objetivos de 10X, 40X, 100X (inmersión), además cuenta con una interfase electrónica (Motic® Camera MCI001/2001) que permite visualizar las observaciones en computadora mediante el uso del software Motic® Images Plus Version 2.0 ML elaborado por Motic® China Group Co. (China).

6.1.3.4 Lector de micropozos

La cuantificación de OTA se realizó en un lector ELISA automático para tiras de pozos, NEOGEN® Stat Fax® 4700, con un rango de medición lineal: 0.00 a 3.0 (A), una exactitud fotométrica de $\pm 1.0\%$ y una longitud de onda de 650 nm.

6.1.4 Equipo para biología molecular

6.1.4.1 Microcentrifuga

Se utilizó en una microcentrifuga Spectrafuge™ 24D modelo C2400 (Labnet International), con velocidad máxima de 13 300 rpm, 16 300 x g.

6.1.4.2 Termociclador

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Select Bio Products modelo SelectCycler™ II.

6.1.4.3 Espectrofotómetro uv- visible

La cantidad y calidad del ADN fue cuantificada mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). Este equipo permite leer la concentración del ADN a 260 nm, y 260/280 nm para el contenido de ácidos nucleicos/proteínas y 260/230 nm para ácidos nucleicos/inhibidores.

6.1.4.4 Equipo para electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)

La DGGE se llevó a cabo en un equipo Bio-Rad Dcode™ System, USA, precalentado a una temperatura de 60°C.

6.1.4.5 Transiluminador uv

Los geles de verificación de las extracciones de ADN y productos de PCR fueron observados y fotografiados utilizando un transiluminador UV Bio-Imaging Systems MiniBIS® Pro 16mm y para los geles DGGE se utilizó un transiluminador Bio-Rad Gel Doc™ XR+.

6.2 Métodos.

6.2.1 Muestreo.

Una muestra de 300 kg de café en cereza (*Coffea arabica*) variedad Costa Rica-Colombia fue obtenida en la finca los Tecolotes de la comunidad Tepetzigo perteneciente al municipio de Huatusco del estado de Veracruz (México). El café fue despulpado utilizando una despulpadora de discos. Se obtuvieron 150 kg de café despulpado que se dividieron en lotes de 50 kg c/u. Se realizaron tres tratamientos de fermentación: Fermentación natural (FN), la cual se realizó en la cuba de fermentación del beneficio por el microbiota nativo de la zona; Fermentación L1 (FL1), utilizando un inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* L1 (01384E127-14), y Fermentación L2 utilizando un inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* L2 (742E127-16). Para la inoculación de las levaduras L1 y L2, se utilizó 1 g de levadura seca por cada kg de café despulpado, es decir que se utilizaron 50 g de levadura seca que fue disuelta en 500 mL de agua potable en un vaso de precipitados. Las fermentaciones L1 y L2 se realizaron en cubas de plástico con capacidad de 31 galones previamente lavadas. Una vez inoculado el café, este fue cubierto con agua potable. La fermentación tuvo una duración de 48 h.

Al final de la fermentación se procedió a lavar el café con agua potable hasta eliminar los restos de mucílago degradado y posteriormente se realizó el secado. Para el secado se utilizaron zarandas de madera provistas de una malla de plástico. El secado se realizó al sol y se protegió durante la noche. El secado duró aproximadamente cuatro días.

Al final del secado, el café fue colocado en sacos de polipropileno nuevos y se almacenó a temperatura ambiente en un área libre de humedad.

6.2.2 Seguimiento durante la fermentación.

Durante esta etapa se le dio seguimiento al pH y temperatura tomando muestras de 300 g de cada tratamiento. Este procedimiento se realizó cada doce horas, las muestras fueron tomadas en condiciones asépticas y colocadas en bolsas estériles para ser trasladadas al laboratorio y realizarles los siguientes análisis: acidez titulable, cuenta total viable de levaduras y extracción de ADN para realizar la técnica de PCR-DGGE.

se realizó un seguimiento de la fermentación, esto durante 5 tiempos diferentes (de las 0 h hasta las 48 h), donde se llevaron a cabo la recopilación de datos de los diferentes análisis (determinación del pH, acidez titulable, temperatura, cuenta total viable de levaduras y por último PCR-DGGE).

6.2.2.1 Determinación de potencial de hidrógeno (pH).

Se le determinó al café directamente en las cubas de fermentación empleando un equipo portátil marca HANNA INSTRUMENTS modelo HI 2210, las lecturas se tomaron en cinco puntos de la cuba y se obtuvo un promedio de las lecturas.

6.2.2.2 Acidez titulable.

Se determinó utilizando 20 g de café despulpado al cual se le agrego 50 mL de agua destilada, después se agito por 15 min y se tituló con NaOH al 0.01N utilizando como indicador fenolftaleína (González-Ríos, 2007).

6.2.2.3 Temperatura.

Se le determinó al café directamente en las cubas de fermentación empleando un termómetro de mercurio (escala 0°C – 100 °C), las lecturas se tomaron en cinco puntos de la cuba y se obtuvo un promedio de las lecturas.

6.2.2.4 Cuenta total viable de levaduras.

La cuenta total viable de levaduras se realizó por el método de diluciones utilizando agua peptonada al 0.1% como diluyente. Alícuotas de 1 mL de cada dilución se colocaron en cajas de Petri a las cuales se les agregó Agar de Papa y Dextrosa acidificado con ácido tartárico estéril al 10%. La incubación se llevó a cabo a 30 °C durante 24 h. Los resultados fueron expresados en Unidades Formadoras de Colonias por ramo de café (UFC/g).

6.2.3 Dinámica de levaduras por PCR-DDGE.

6.2.3.1 Protocolo de extracción del ADN total en muestras de café

La extracción del ADN total de cada una de las muestras de café se llevó a cabo empleando el protocolo descrito por El Sheikha et al. (2009, 2011). Los ensayos se realizaron por duplicado para cada muestra.

En condiciones asépticas se colocaron aprox. 20 g de cada muestra de café en tubos de 50 mL, se le agregó 20 mL de agua peptonada estéril al 1%, posteriormente los tubos se incubaron en agitación a 20°C con agitación media durante 1 h., después se tomaron 2 mL de la solución de lavado de las muestras y fueron colocadas en tubos Eppendorf estériles de 2 mL, con previa adición de 0.3 g de perlas de vidrio (Sigma, USA) de 425-600 µm de diámetro. Los tubos se agitaron en vórtex durante 30 min a velocidad máxima, se centrifugaron a 12 000 x g durante 15 min, el sobrenadante fue desechado y el residuo se resuspendió con 300 µL de Tampón de Lisis (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8) y se agitaron en vórtex durante 3 min a velocidad máxima.

Se adicionaron 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8.0), 100 µL de lisozima (25 mg/mL) y 50 µL de proteinasa K (20 mg/mL), entre cada adición se agitaron en vortex por 3 min a velocidad máxima. Posteriormente, los tubos se incubaron en baño María a 42°C durante 30 min, posteriormente se adicionaron 50

μL de SDS 20% (Dodecil Sulfato de Sodio, IBI Scientific), se agitaron en vórtex por 3 min a velocidad máxima y se incubaron a 42°C por 10 min.

Se agregó 400 μL de MATAB (Mezcla de Bromuro de Alquil-Trimetil Amonio, Sigma) 2% (p/p) NaCl 3M, se agitaron en vórtex durante 3 min a velocidad máxima y se incubaron a 65°C durante 10 min. Se adicionaron 700 μL de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:21, v/v/v), se agitó en vórtex durante 5 min a velocidad máxima. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 12 000 x g durante 15 min y la fase acuosa fue recuperada en un nuevo tubo Eppendorf estéril.

La etapa de lavado con la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico se repitió una vez más. El fenol residual fue eliminado con 600 μL de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y por centrifugación a 12 000 x g durante 15 min. La fase acuosa fue recuperada en un nuevo tubo Eppendorf estéril y se le agregó 30 μL de acetato de sodio 3M pH 5 e inmediatamente se le agregó un volumen igual al contenido en el tubo de isopropanol frío (-20°C).

Los tubos se guardaron en congelación durante 12 h, pasado este tiempo se centrifugaron a 12 000 x g durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. Se adicionó un volumen de 500 μL de etanol al 70% y se centrifugó a 12 000 x g durante 10 min. Finalmente, se eliminó la fase acuosa y se dejó secar el precipitado depositado en el fondo del tubo a temperatura ambiente (2-3h). Al finalizar esta etapa se le agregó a cada tubo 50 μL de agua ultra pura para resuspender el precipitado, se dejó solubilizar durante 3 h y se conservó en el congelador a -20°C hasta su análisis.

6.2.3.2 Verificación de ADN en gel de agarosa

La cantidad y pureza de los extractos de ADN fueron estimados por electroforesis en gel de agarosa (IBI Scientific, USA) al 1% (p/v) en solución TAE 1X (Invitrogen, USA). Se tomaron 5 μ L del extracto de ADN de cada muestra y se mezclaron con 2 μ L de una solución de colorante Blue/Orange (Promega, USA), la mezcla se depositó en los pozos del gel de agarosa. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kpb (Promega, USA).

La migración tiene una duración de 45 minutos a 1 hora con una tensión de 100 V. Inmediatamente el gel se sumergió en solución de bromuro de etidio (IBI Scientific, USA) a 0.1 μ g/mL durante 15 min, después durante 10 min en agua destilada para retirar los residuos de bromuro de etidio. Finalmente, el gel se observó y fotografió en un transiluminador UV.

6.2.3.3 Verificación por espectrofotómetro uv-visible

La cuantificación y pureza del ADN extraído fueron estimados en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000. Este equipo permite observar la relación de contenidos entre ácidos nucleicos y proteínas que idealmente debe ser entre 1.8 y 2, si es superior a 2 representa que hay una contaminación por ARN y si es inferior a 1.8 representa que hay un contenido elevado de proteínas.

Para efectuar la lectura fue requerido 1 μ L del extracto de ADN y el equipo se calibró con agua ultra pura grado biología molecular, libre de ácidos nucleicos u otros contaminantes.

6.2.3.4 Amplificación por PCR

En la técnica DGGE, se le agregó una GC-clamp de 30 nucleótidos al extremo 5' de uno de los primers para asegurar que el fragmento de ADN no fuera totalmente separado durante la migración (Sheffield et al., 1989).

Levaduras

La región D1/D2 del ADNr 26/28S fue amplificada utilizando los cebadores, GC-NL1f y LS2r. Este par de primers cubre la región polimorfa D1/D2 desde las posiciones 27 a 50 para NL1f y 266 a 285 para LS2 del gen del ARN 26S del ribosoma de *Saccharomyces cerevisiae* (M19229 GenBank). Estas dan origen a un amplicón de 258 pb.

Tabla 4. Secuencias de cebadores utilizados para PCR-DGGE para análisis de ADN de levaduras.

Población	Primers	Posición	Secuencia
Levaduras	GCNL1f (Sigma, France)	27 – 50	5`- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G – 3`
	LS2r (Sigma, France)	266 – 285	5`- ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC – 3`

6.2.3.4.2 Mezcla de reactivos para PCR

La amplificación por PCR se realizó en microtubos de 0.2 mL (Axygen, USA) y la mezcla de reactivos para levaduras se preparó como lo describió El Sheikha *et al.* (2009).

6.2.3.4.3 Condiciones de PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA).

La amplificación por PCR se realizó de acuerdo a los métodos de Hesham *et al.* (2006) y mejoradas por El Sheika *et al.*, (2011). La desnaturalización inicial se realizó a 94°C durante 3 min, seguido de 10 ciclos con una desnaturalización a 94°C durante 30 s, una hibridación a 62°C por 30 s (esta temperatura disminuye 1°C en cada ciclo, hasta llegar a 52°C) y una elongación a 72°C por 1 min.

Después se realizó 40 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 30 s, una hibridación a 52°C por 30 s, una elongación a 72°C por 1min y una elongación final a 72°C por 10 min (Tabla 5).

Tabla 5. Mezcla de reactivos y programas para PCR de levaduras

Reactivos	Volumen por muestra μ l	Programa PCR
Agua pura (Eppendorf, Alemania)	18.75	1. 94 °C 3 min 2. 94 °C 30 s 3. 62 °C 30
Primer GC 338f (Sigma, France)	10	4. 72 °C 10 min 5. Ir a 2, 10 veces
Primer 518r (Sigma, France)	10	6. 94 °C 30 s 7. 52 °C 30 s
dNTPs 10 Mm (Promega, France)	1	8. 72 °C 1 min 9. Ir a 6, 40 veces
Buffer Top taq	5	10. 72 °C 10 min
Top taq polimerasa	0.25	11. 16 °C
Extracto de ADN	5	

6.2.3.5 Electroforesis en Gel de Acrilamida con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Los fragmentos de ADNr amplificados por PCR fueron analizados por DGGE en un gel de acrilamida/bisacrilamida 8% (37.5/1, v/v, Promega, France) con un gradiente desnaturalizante que se extiende de 30% a 60% para el ADN de levaduras (El Sheika *et al.*, 2010) (Tabla 6).

Tabla 6. Composición de gel para DGGE con gradiente desnaturizante del 30% a 60%.

Reactivos	Solución desnaturizante 30 % (A)	Solución desnaturizante 60 % (B)
40 % acrilamida	20 ml	20 ml
Formamida	12 ml	24 ml
Urea	12.6 ml	25.2
TAE 50X	2 ml	2 ml
H2O	cbp 100 ml	cbp 100 m

6.2.3.5.1 Composición del gel DGGE

Este gradiente desnaturizante se conformó de urea (Promega, France) y de formamida (Promega, France). 100% corresponde a 7M de urea y 40% de formamida (v/v).

6.2.3.5.2 Preparación del gel DGGE

Las soluciones A y B fueron preparadas en dos tubos falcón (50 ml) diferentes antes de ser depositados en el compartimento A y B, correspondientes a la preparación del gradiente en un equipo (Bio-Rad Modelo 485, USA) especial para mezclar los componentes de este gel. Una vez preparadas y depositadas las soluciones en sus respectivos compartimentos, se les agregara 50 µl de persulfato de amonio 10% (p/v) y 50 µl de Tetrametiletilendiamina (TEMED).

El gel se colocó en un espacio de 0.75mm de espesor entre dos placas de vidrio de 10 mm de ancho. Se transfirió el gel de la preparación del gradiente hasta el espacio entre las dos placas de vidrio con ayuda de una bomba Percom-I (Watson-Marlon, USA) con una velocidad de agitación ajustada a 20 rpm.

Una vez que se llenó el molde, se colocara un “peine” plástico con 16 “dientes” sobre la superficie del espacio creado por las dos placas de vidrio, estos corresponden a 16 pozos, donde se depositaran las muestras a analizar. Se dejará reposar el gel una hora para una buena polimerización.

6.2.3.5.3 Condiciones de electroforesis de la DGGE

La cuba de electroforesis del equipo Bio-Rad Dcode™ System fue llenada con TAE 1X (Tris-acetato, EDTA pH 8.3) y precalentada a la temperatura de migración, 60°C (Díez et al., 2001).

El gel DGGE se colocó en la cuba precalentada a 60°C. Previamente se depositaron 10 µl de colorante Blue / Orange y 30 µl de los productos de PCR con ayuda de una micropipeta.

La electroforesis se realizó primero a 20V durante 10 min y después a 80V durante 12 h para el ADN de levaduras.

Después de la migración el gel fue retirado delicadamente de las placas de vidrio y sumergido en una solución de Bromuro de etidio (IBI Scientific, USA) a 0.1 µl/ml durante 30 min y después fue lavado con TAE 1X durante 20 min. El gel se observó y se tomó una fotografía sobre un transiluminador UV Bio-Rad Gel Doc™ XR+.

6.2.4 Marcadores de calidad del café durante el almacenamiento.

Las muestras de café pergamino seco obtenidas de cada tratamiento fueron almacenadas en sacos de polipropileno nuevos, los sacos fueron colocados en tinas de plástico en una bodega a temperatura ambiente. Se tomaron de muestras aleatorias de 1 kg, utilizando la técnica de cuarteo, desde el inicio del almacenamiento hasta los 6 meses. Se realizaron pruebas físicas: defectos, color, humedad, Aw y granulometría a cada una de ellas. Durante el almacenamiento se dio seguimiento a la diversidad de levaduras mediante la técnica de PCR-DGGE, la producción de OTA, el % de infección fúngica y la composición de compuestos volátiles (VOC's) y evaluación sensorial.

6.2.4.1 Determinación de pérdida de masa en café verde

Se realizó por diferencia de peso antes y después de colocarse en una estufa de vacío a 105°C durante 16 horas, este procedimiento se lleva a cabo por triplicado (ISO 6673: 2003).

Determinación de la actividad de agua (A_w)

La A_w se le determinó a las muestras de café verde almacenado, las determinaciones se hicieron por triplicado empleando un medidor de actividad de agua marca Aqualab Series 3Te (Pullman, WA) a 25 ± 1 °C.

6.2.4.2 Determinación de Color.

La determinación del color en los granos de café verde almacenados se realizó empleó un colorímetro HUNTER LAB COLORFLEX, se calcularon los parámetros de color L^* , a^* y b^* del sistema CIELab, las determinaciones se realizaron por triplicado. Antes de cada medición el colorímetro fue calibrado utilizando un estándar proporcionado por el fabricante.

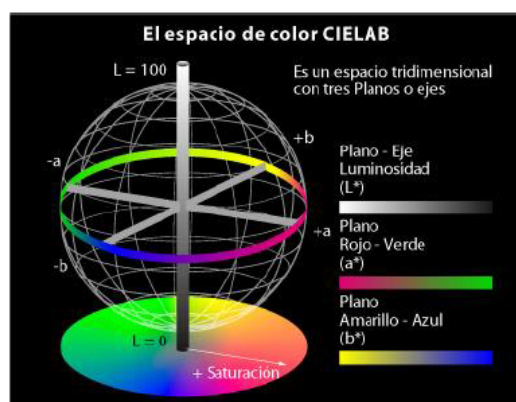


Figura 8. Espacio de color CIELAB.

Donde:

L^* = Mide el grado de luminosidad (0 / + 100)

a^* = El grado de coloración rojiza a verde (+ 100 /-80).

b^* = El grado de coloración amarilla hacia azulosa (+70/-80)

Se calculó el parámetro de cromaticidad o cambio en la intensidad del color (0= tenue, 60°=intenso), definida por la siguiente fórmula (López y Gómez, 2004):

$$c^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

6.2.4.3 Análisis de defectos físicos.

Las muestras de café verde en estudio se les evaluó el número de defectos físicos bajo la norma ISO-4149-2005, se pesaron 300 g de café verde y se procedió a contar granos que presentaran defectos genéticos (café triangulo, café concho o elefante y café caracol); granos con defectos agronómicos (café brocado y dañado por frío) y café con defectos debido al beneficio. Al número de cafés defectuosos se les multiplica por un coeficiente asignado al tipo de defecto ISO-10470:2004.

6.2.4.5 Análisis granulométricos.

Se tomaron 300 g de café verde de cada tratamiento y se procedió a despergaminar; estas muestras se hicieron pasar por cribas de diferentes diámetros que van desde 18/64 in (7.10 mm) hasta 13/64 in (5 mm). Los granos retenidos en cada criba se pesaron y los resultados son expresados en peso y porcentaje de café verde retenido.

La fórmula para calcular el porcentaje de granos retenidos en cada criba es:

$$\% \text{ Retenido de la criba} = \frac{C}{n} * 100$$

Donde:

C = Peso en gramos retenido en cada criba

n = Muestra utilizada de 300g

6.2.5 Porcentaje de infección fúngica

Un total de 50 granos de cada tratamiento obtenidos cada treinta días, se inocularon por la técnica de siembra directamente en agar Dicloran-Glicerol 18% (DG18: Glucosa 10g, peptona 5g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄.7H₂O 0.5g, agar 15g, glicerol 220g y 1mL etanol 0.2%, cloranfenicol 0.1g, dicloran 2mg, agua destilada QS 1L) (Hocking y Pitt, 1980) y medio PDA, as cajas petri fueron incubados a 25°C durante

7 días, posteriormente se analizaron visualmente para observar el crecimiento de colonias sobre los granos, obteniendo el porcentaje de infección empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de infección fúngica} = \frac{\text{número de granos infectados}}{\text{número total de granos}} \times 100$$

6.2.6 Cuantificación de Ocratoxina A (OTA) en café almacenado

La finalidad del presente protocolo es la extracción y purificación de la toxina presente en el grano de café, producida por los géneros de hongos *Aspergillus* y *Penicillium*, la ocratoxina A que está clasificada como 2B por la IARC, como un posible carcinógeno para los humanos. Se pesaron 100 g de café verde, previamente congelado a -80 °C y molidos, después se tamizó en malla 20, pesando 10 g de muestra en tubos falcón y se agregó 40 mL de solución Etanol/Agua al 70% (v/v). Fue centrifugados a 5000 RPM por 15 min, y del sobrenadante se tomaron 100 uL para realizar el ensayo de acuerdo a las indicaciones del fabricante, que a continuación se especifican.

6.2.6.1 Extracción de la toxina

La purificación de la micotoxina se realizó a través de la reacción antígeno-anticuerpo (inmunoensayo enzimático competitivo Veratox®) por medio de ELISA. Este ensayo usa anticuerpos de captura contra anticuerpos anti- ocratoxina A; a estos se les agregó muestra o estándar más conjugado ocratoxina A-enzima y anticuerpos anti-ocratoxina A produciendo que la ocratoxina A libre y el conjugado ocratoxina A-enzima compitan para unirse a sitios específicos del anticuerpo anti-ocratoxina A.

Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-ocratoxina A se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa. El conjugado ocratoxina A-enzima que no se unió es removido posteriormente en un proceso de lavado. El substrato / cromógeno es agregado e incubado. El conjugado ocratoxina A enzima a través de los anticuerpos, convierte al cromógeno en una sustancia azul. La adición de la

solución stop provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medición se realizó fotométricamente a 650 nm; la absorción es inversamente proporcional a la concentración de ocratoxina A en la muestra.

6.2.7 Análisis de la fracción volátil del grano de café almacenado por SPME-GC-FIT

6.2.7.1 Preparación de las muestras de café (verde y tostado) para su estudio en compuestos orgánicos volátiles (VOC's)

A) Preparación de muestras en café verde:

Se pesaron 100 ± 1 g de café verde de cada proceso (FN, L1 y L2) y se congelaron a aproximadamente a $-80 \pm 1^\circ$ C durante 12 h antes de molerlas con un molino de discos Perten® (Laboratory Mill tipo 3600). Los polvos se tamizaron en una malla de 0.5 mm y se envasaron en bolsas de plástico y se almacenaron a $-20 \pm 1^\circ$ C hasta su análisis.

B) Preparación de muestras en café tostado:

Las muestras de café fueron tostadas a las condiciones descritas en el apartado 4.10. Posteriormente se tomaron aproximadamente 80 g de cada tratamiento y se desgasificaron antes de molerlas durante 12 horas a una temperatura de -20° C. Para su molienda se utilizó un molino de muela Ditting® con un tamaño de partícula de <400 micrones. Después de moler, los cafés se envasan en bolsas de plástico y se almacenan a $-80 \pm 1^\circ$ C hasta su análisis.

6.2.7.2 Método de extracción en HS-SPME

Los compuestos volátiles de café verde fueron analizados por micro-extracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME). El espacio de cabeza es la fase gaseosa situada por encima de la muestra del café molido dentro del recipiente. Esta fase está cargada de compuestos volátiles después de alcanzar la temperatura de equilibrio a 50° C.

Todas las muestras de café verde en polvo y café tostado molido se acondicionan a temperatura ambiente durante 90 minutos antes del muestreo para el análisis del espacio de cabeza (HS). Se colocó un gramo de muestra en polvo en un vial sellado de 2 mL. Para llevar a cabo la extracción de los compuestos volátiles, se utilizó una fibra SPME (Supelco Co., Bellefonte, PA, Ca.) de 75 µm tipo Carboxen/PDMS. Los tiempos de extracción probados fueron de 5, 10 y 15 minutos a temperaturas de 25, 40 y 60 ° C, dejando cada muestra un tiempo de equilibrio de 30 minutos. Para la desorción de los compuestos, la fibra se colocó en el inyector de GC calentado a 250 ° C durante 4 min. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

6.2.7.3 Separación y análisis de los compuestos orgánicos volátiles (VOC's)

Para la separación y análisis de los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) se utilizó un cromatógrafo Perkin-Elmer® Clarus 500 utilizando una columna DB-WAX (científica J&W), de 30 m de largo, con un diametro interno de 0.32 mm y 0.25 µm de espesor.

.La inyección se realizó en modo splitless a 250°C con un inserto específico para SPME (Supelco Co., Bellefonte, PA, Ca) de 0.75 mm de diámetro. El caudal de gas portador (hidrógeno) es de 1.5 mL/min. La temperatura de la columna se programó de 44° C a 170° C a 3° C/min, seguido de un aumento de 170° C a 250° C a 8° C / min. La detección se realizó utilizando un detector de ionización de flama (FID) a 300° C. El caudal de 300 mL/min y el flujo de nitrógeno ("reposición") de 30 mL/min.

6.2.7.4 Identificación de compuestos orgánicos volátiles (VOC's)

La identificación de los constituyentes volátiles del espacio de cabeza se realiza comparando sus índices de retención relativa calculados, con los proporcionados por la literatura. Los índices de retención relativa se calcularon a partir de los tiempos de retención de los compuestos separados y los alcanos lineales de control (Estándar de índice de retención, Sigma).

6.2.8 Estandarización del tostado de café.

Las muestras de café verde de 300 ± 1 g y de un tamaño de 18" y libre de defectos físicos provenientes de cada tratamiento fueron tostados en un tostador de laboratorio marca "Solo Café" a una temperatura constante del aire a $250 \pm 3^\circ\text{C}$. Un nivel de tostado medio se aplicó a todos los granos verdes de los 3 tratamientos (FN; L1 y L2).

Con la finalidad de no alterar la evaluación sensorial de los granos de café para cada tratamiento, se procedió a controlar tres parámetros físicos, esto con la finalidad estandarizar el proceso de tostado: medición del cambio de color, porcentaje de pérdida de peso y aumento de volumen de los granos tostados. Este último parámetro se mide por diferencia en el volumen antes y después del tostado. El color se mide por la luminiscencia (L^*) de las muestras de café tostados utilizando un colorímetro marca Minolta (modelo CR410). La pérdida del peso del café tostado se expresó como un porcentaje del peso total.

El proceso del tostado fue realizado mensualmente durante los 6 meses que duro el estudio. Las condiciones de temperatura y tiempo tienen un gran impacto sobre las propiedades estructurales del grano del café y como consecuencia en el sabor final de la bebida, aun cuando se trate de un mismo grado de tostado (González-Ríos *et al.*, 2007). Estos datos fueron corroborados con la escala visual AGTRON, la cual fue generada por la "Specialty Coffee Assosiation of American" (SCAA).

Tabla 7. Condiciones de tostado de las muestras de café

CONTROL DEL PROCESO DE TOSTADO										
Código	Café Verde (g)	Café Tostado (g)	% de pérdidas de peso	Volumen de café verde	Volumen de Café Tostado	% de Aumento	Tiempo (min)	Peso de 100 granos	Humedad	Observaciones
FNAM0	207.7	175.4	15	320	550	60	9.38.54	19.1	7.8	L*= 42.75 MD
FNAM3	201.1	170.85	15	330	550	60	9.41.99	18.8	7.8	L*= 41.15 MD
FNAM6	202.3	172.2	15	320	520	60	12.41.47	19.4	8	L*= 44.82 MD
L1AM0	200	167.7	16	320	540	60	10.42.10	19.4	8.5	L*= 40.80 MD
L1AM3	203.6	171.3	16	300	550	65	9.48.50	19	7.3	L*= 41.02 MD
L1AM6	202.9	170.5	16	310	560	65	9.47.26	18.6	8	L*= 41.10 MD
L2AM0	203.3	170.5	16	320	540	65	9.41.94	18.9	7.8	L*= 40.3 MD
L2AM3	201.4	172.1	15	310	540	60	9.20.62	18.5	7.2	L*= 45.78 MD
L2AM6	202.5	171.2	15	310	550	60	9.46.94	18.2	7.8	L*= 44.78 MD

L* = Valor de Luminiscencia (Colorímetro Minolta CR-410)
 (MD)= Valor de Medio Oscuro (Escala Agtron)
 (CV)= Valor de Humedad Inicial de Café Verde

6.2.9 Molienda del café.

En la preparación de una bebida de café de buenas características, el grado de molienda o tamaño de las partículas es un factor que ejerce una marcada influencia, puesto que debe estar acorde con el tipo de extracción que va a utilizarse con el fin de que los compuestos solubles sean extraídos en la proporción adecuados (González-Ríos, 2004).

Los parámetros que caracterizan una molienda son el tamaño medio y la distribución de partículas. La molienda del café tostado se debe realizar en el momento de la preparación de la bebida, de lo contrario las características sensoriales del café pueden verse afectada; se llevará a cabo de acuerdo con el tamaño de partícula en un molido fino (Broissin-Vargas *et al.*, 2017).

6.2.10 Preparación de la bebida

La bebida de café para ser degustada se preparó siguiendo la siguiente metodología (Gonzales-Ríos *et al.*, 2004), utilizando 50 ± 1 g de café molido (molido de trituración

de partícula < 400 micras) de los tratamientos FN, L1 y L2, las muestras fueron pesadas en una balanza analítica OHAUS modelo GT21000, una vez que fueron pesadas la muestras se colocaron en cafeteras tipo pistón marca "Boudin®" y disuelta en 1L de agua desmineralizada (Ciel®, México), pH 7.0 a una temperatura de $95 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 5 minutos, se presiona el pistón, separando la bebida del "spend" (método de prensa francesa o "émbolo"). La temperatura de las tazas en el momento de la degustación fue de $55 \pm 3^\circ\text{C}$.

6.2.11 Selección de panel sensorial

Se realizó un llamado a la comunidad estudiantil del Tecnológico de Veracruz, para formar parte de un panel sensorial para café. A los candidatos se les informó en lo que consistía ser parte de un panel sensorial de café y la importancia que tiene esto en el proyecto de tesis, una vez conociendo esto se procedió a la selección del panel, esto consistió en el reconocimiento de sabores básicos y, el ordenamiento de intensidad de sabores, de acuerdo a (Gutiérrez & Barrera, 2015) (Meilgaard *et al.*, 2006). El panel entrenado quedó conformado por un total de 16 jueces (7 mujeres y 9 hombres) con un rango de edad de 20 a 23 años.

6.2.12 Entrenamiento de panel sensorial

Una vez elegido al panel sensorial fue imprescindible en que se tenga un entrenamiento acerca de los atributos que se deseen evaluar en las pruebas triangulares y descriptivas.

6.2.13 Análisis sensorial de la bebida de café

a) Prueba triangular

Las sesiones de degustación se realizaron de acuerdo con el método de prueba triangular (Norma ISO 4120-1983). Se presentan tres bebidas A, B, C (dos son idénticas); el jurado responde a la pregunta "¿Cuál es la muestra única?". Las características sensoriales comparadas para juzgar las diferencias fueron color, aroma, cuerpo, acidez, amargura, astringencia y gustos particulares. Las muestras se codificaron y se presentaron de acuerdo con las seis órdenes de combinación

posibles. El enfoque de respuesta general de todo el grupo se consideró al contar el número de respuestas acertadas y al comparar el valor obtenido con el de la tabla de distribución binomial para una probabilidad de 1/3, a fin de identificar diferencias significativas.

b) Análisis descriptivo

El objetivo de esta prueba fue identificar y cuantificar las características sensoriales favorables y no favorables de las diferentes muestras de la bebida de café estudiadas según el método de perfil sensorial establecido en la norma ISO 6564-1985. Al panel entrenado se le propuso evaluar 10 criterios favorables: intensidad aromática, calidad aromática, cuerpo, acidez, amargor, astringencia, dulzor, sabores afrutado, cítrico, málico. Las no favorables fueron áspero, terroso, quemado, fermentado y agrio. También se incluyó el nivel de preferencia.

Las muestras que fueron evaluadas en esta prueba sensorial fueron nueve: tres muestras obtenidas en el tiempo inicial (Mes 0) de cada uno de los tratamientos (FNt0, L1t0 y L2t0); tres muestras obtenidas del tercer mes de cada uno de los tratamientos (FNt3, L1t3 y L2t3); y tres muestras obtenidas del sexto y último mes de cada uno de los tratamientos (FNt6, L1t6 y L2t6).

Antes de realizar el análisis descriptivo de los tratamientos en estudio, se les realizaron tres evaluaciones con otras muestras de café, esto con la finalidad de que los jueces se familiarizaran con las características a evaluar.

La evaluación se realizó presentando a cada uno de los jueces tres muestras de café en tazas de porcelana codificada con números de tres dígitos, cada juez tenía la tarea de asignarle un valor que iba desde 0 hasta 5, donde 0 era la ausencia de intensidad percibida y 5 la mayor intensidad en cada uno de los atributos evaluados. Las muestras evaluadas fueron preparadas (ver preparación de la bebida) y presentadas en las mismas condiciones (temperatura, cantidad y apariencia). Cada ensayo fue realizado por duplicado.

En el análisis para cada muestra y cada descriptor será el promedio de las calificaciones otorgadas por el jurado y serán tratados estadísticamente.

Capítulo IV

6.3 Resultados y discusión.

6.3.1 Tratamiento postcosecha del café.

Una vez que se realizó el corte del grano de café se recibieron 300 kg de café cereza y se procedió a realizar el procesamiento postcosecha. Inicialmente se realizó una selección del café para eliminar las cerezas inmaduras o sobremaduras y material extraño (hojas, piedras, palos, etc). Posteriormente se realizó un despulpado de discos (marca Siemen) que realiza su proceso con ayuda de agua. El café despulpado fue pesado y colocado en las cubas de fermentación para posteriormente llevar a cabo la inoculación con las levaduras a estudiar (L1 y L2). La fermentación natural (FN) se dejó en la cuba de fermentación de la finca para que está fuera conducida con el microbiota nativa de la zona. Antes de agregar el café despulpado a sus cubas de fermentación, se realizó la hidratación y preparación de los inóculos de las levaduras. Los inóculos hidratados se agregaron al café despulpado y se cubrieron con agua, para posteriormente homogenizar. Se tomó el primer muestreo contando éste como tiempo cero (t_0), y dando inicio al seguimiento de la fermentación, cada 12 h. La fermentación tuvo una duración de 48 h (t_{48}). El muestreo se realizó aleatoriamente y de forma aséptica utilizando guantes y bolsas estériles. Los parámetros que se tomaron fueron pH, acidez titulable, temperatura, cuenta viable de levaduras y, por último, muestras para PCR-DGGE. La fermentación en el tratamiento testigo (FN) el café no se cubrió con agua debido a que el proceso que se realiza en el beneficio no utiliza agua.

6.3.1.1 Análisis del seguimiento de las fermentaciones.

En la Figura 9 se presenta el seguimiento del pH durante la fermentación (0 h hasta 48 h), observando que, al inicio de ésta los tratamientos tienen pH iniciales de 6.74, 6.64 y 6.66 y disminuye conforme va pasando el tiempo de fermentación alcanzando valores de 3.96, 5.34 y 4.85 para los tres tratamientos FN, L1 y L2, respectivamente. Para los tratamientos inoculados L1 y L2 no hubo diferencia significativa entre tratamientos, sin embargo, la fermentación natural presentó un pH más bajo, lo que puede ser atribuido a dos factores, el primero es al tipo de fermentación debido a

Resultados y discusión

que la fermentación natural fue realizada en ausencia de agua, y se ha reportado que las fermentaciones bajo agua presentan mayores pH en comparación con una en ausencia de ésta, debido a que el agua permite la disolución de los ácidos presentes durante la fermentación. Y el segundo factor es debido a los microorganismos que intervinieron en la fermentación, ya que en la fermentación natural pueden predominar las bacterias que producen grandes cantidades de ácidos orgánicos, especies como *L. mesenteroides dextranicum*, *L. brevis* y otros lactobacilos han sido reportados en fermentaciones de café mexicano produciendo ácido láctico y acético (Avallone *et al.*, 2001). La tendencia descendente del pH durante el proceso de fermentación se debe a un aumento de la acidez de la masa fermentativa, que coincide con la producción de ácidos orgánicos generados a partir de los azúcares y del rompimiento de las pectinas presentes en el mucílago de café durante la fermentación (Correa *et al.*, 2014).

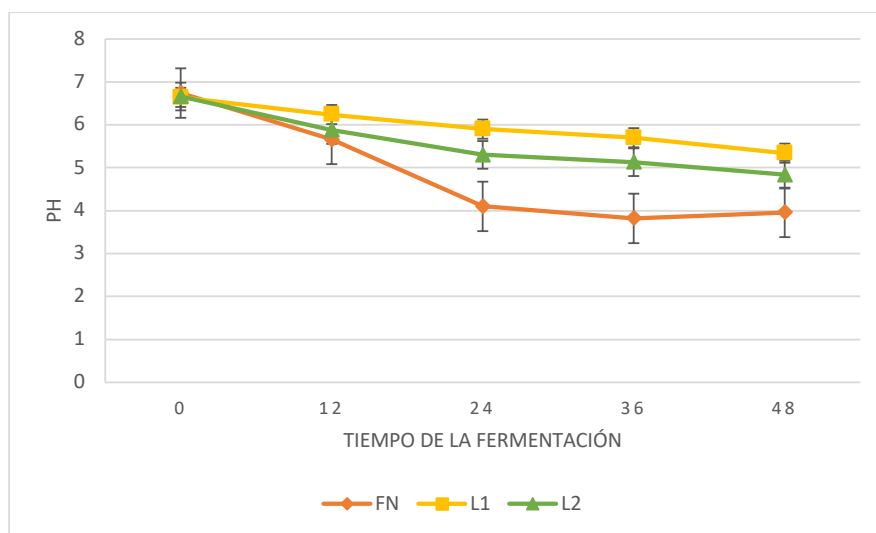


Figura 9. Seguimiento del pH durante las fermentaciones.

La acidez titulable se midió cada 12 horas, este parámetro permite medir la cantidad total de ácidos en una solución determinada por titulación. Los resultados se muestran en la Figura 10 en donde se observa que, al igual que en el pH, la fermentación natural es la que presenta mayor acidez durante toda la fermentación.

Resultados y discusión

Al inicio de la fermentación (t_0) presentó un porcentaje de acidez de 0.05% y al llegar al t_{48} alcanzó los 0.47%, esto en comparación con las muestras inoculadas (L1 y L2) que comenzaron en t_0 con 0.01 % y al finalizar las 48 h de fermentación (t_{48}) terminaron con 0.08 y 0.10 % de acidez. Esto se puede atribuir al tipo de fermentación que tuvieron L1 y L2 con respecto a FN. Sin embargo, estos resultados se corroboran con las lecturas obtenidas en pH (Figura 12), ya que se observó que FN es la que obtuvo mayor pH alcanzando un pH de 3.9, mientras que FL1 y FL2 alcanzaron pH de 5.34 y 4.84, sugiriendo que FN tiene una mayor cantidad total de ácidos libres. Los ácidos producidos por la microbiota natural durante la fermentación del café son el ácido acético, málico, quínico, láctico, los cuales pueden penetrar a través del pergamino y afectar el sabor de la bebida, sin embargo en este trabajo se observó que los valores de acidez total, alcanza valores bajos aún en la FN, respecto a los reportados en otros trabajos en donde se alcanzan valores de 1.37 hasta 2.0% dependiendo de los diferentes métodos de despulpado (Kipkorir et al, 2105).

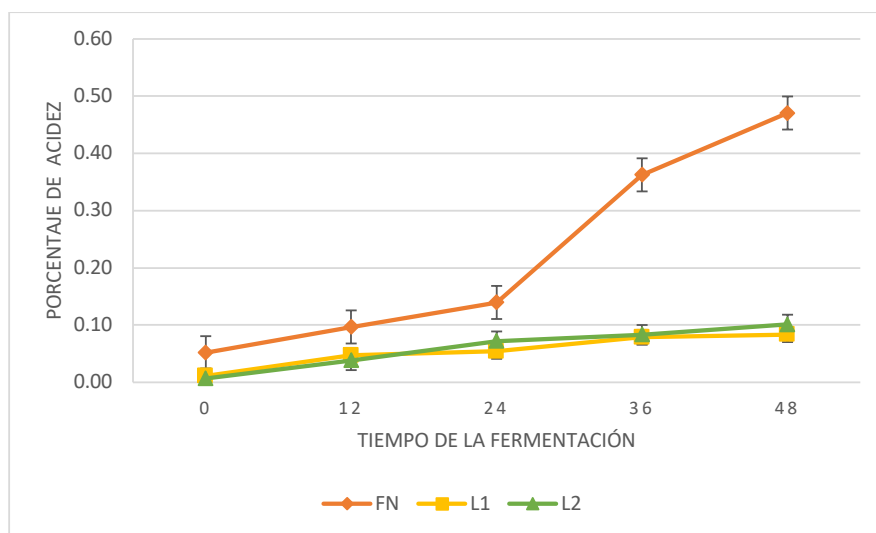


Figura 10. Seguimiento de la acidez durante la fermentación.

La temperatura alcanzada por el café durante el seguimiento de la fermentación fue tomada con un termómetro de mercurio (0 a 100°C), tomando mediciones de forma

Resultados y discusión

axial en cinco puntos distintos de las cubas de fermentación. Los resultados mostraron que hay una diferencia entre la FN y los tratamientos inoculados con *Saccharomyces cerevisiae* (L1 y L2), principalmente al finalizar la fermentación, como se muestra en la Figura 11. La FN fue la que obtuvo mayor temperatura alcanzando 28°C muy diferente con respecto a L1 y L2, con 20.6 °C y 19.8 °C respectivamente. Esto se le puede atribuir a la presencia de agua durante la fermentación que permitió una mayor estabilidad de las mismas, debido a que el incremento de la temperatura interna de la masa de café durante los procesos de fermentación se debe a que éste se comporta como un proceso exotérmico, en el que se libera energía desde las primeras horas, dadas por las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo, para la producción de alcoholes y ácidos (Ferreira *et al.*, 2013). Es por esto que el agua en L1 y L2 actúa como regulador de la misma por lo que no se pueden observar cambios en procesos sumergidos.

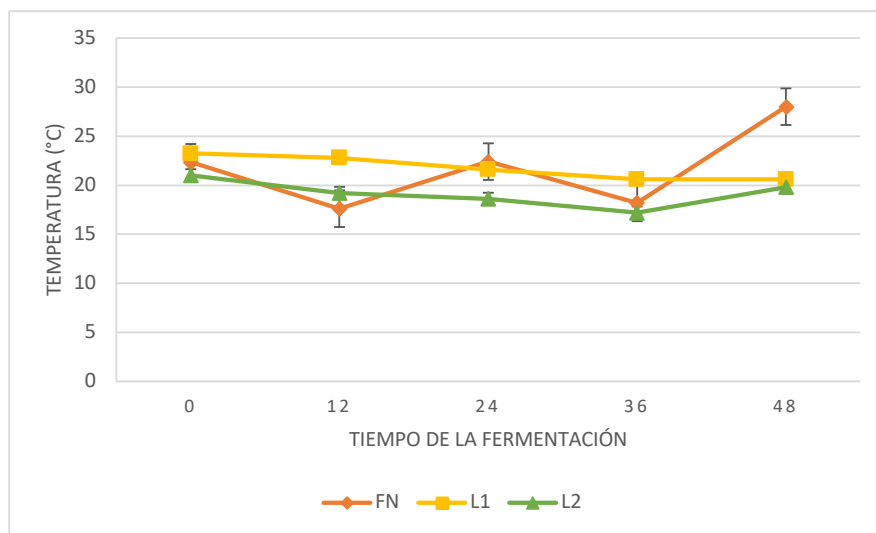


Figura 11. Seguimiento de la temperatura durante las fermentaciones.

Resultados y discusión

6.3.1.2 Cuenta viable de levaduras durante la fermentación de café.

Se realizó el conteo de levaduras totales por la técnica de las diluciones y vaciado en placa en medio PDA acidificado. Los resultados se muestran en la Figura 12, donde se observa que al inicio de la fermentación la FN presenta una cuenta inicial de $5.6E^4$ UFC/g que se incrementa a las 24 h hasta alcanzar $7.30E^7$ UFC/g, y observa una disminución de ésta hasta llegar a $3.15E^7$ UFC/g a las 48 h de fermentación; para la fermentación inoculada con L1, inicia con $4.35E^5$ UFC/g y transcurrida las 24 h había un crecimiento de $2.54E^6$ UFC/g, al finalizar la fermentación la cuenta fue de $2.70E^6$ UFC/g; para la fermentación inoculada con L2 inicia con $1.09E^5$ UFC/g, a las 24 h de fermentación había un crecimiento de $4.29E^5$ UFC/g y al término de la fermentación (48 h) presentó una cuenta de $4.46E^5$ UFC/g. Los resultados obtenidos en la cuenta viable de levaduras coinciden con el comportamiento obtenido en el pH, temperatura y acidez total, mostrando que de los tres tratamientos FN fue la que obtuvo mayor crecimiento de levaduras, y esto se vio reflejado en una mayor acidez total, la disminución de pH y el aumento en la temperatura en comparación con las fermentaciones inducidas con las levaduras L1 y L2. Esto puede atribuirse a las especies de levaduras presentes (L1 y L2) en comparación con FN, debido que ésta contiene diferentes especies de levaduras y bacterias, en comparación con los inóculos que solo predomina una cepa de levadura durante toda la fermentación, resultado del manejo aséptico que se fermentaron, otra atribución es la condición que se llevaron las fermentaciones (sumergida y seca). Sin embargo, la finalidad de realizar fermentaciones inducidas (inóculos) en el caso de este estudio con *Saccharomyces cerevisiae* (L1 y L2), fue la de degradar el mucílago y ayudar a mejorar los precursores aromáticos y sensoriales del café al producir metabolitos, como orgánicos volátiles, que son formados durante el tostado. A si mismo a comprobar que después de la fermentación las levaduras actúan como agentes de biocontrol contra microorganismos que deterioran los parámetros de calidad e inocuidad del grano de café durante su almacenamiento. Se pudo demostrar en este trabajo que las cajas inoculadas con *Saccharomyces cerevisiae* (L1 y L2) a pesar que no alcanzaron

Resultados y discusión

valores altos en los parámetros medidos, sí degradaron el mucílago para lavarlo y posteriormente secar el café.

Estudios realizados a fermentaciones naturales de café han demostrado que los microorganismos responsables de la fermentación son especies nativas que se localizan durante todo el procesamiento del café, las cuales incluyen levaduras, bacterias y hongos filamentosos. Las especies de levaduras más reportadas durante la fermentación del café son *Pichia burtonii*, *Pichia kluyveri*, *Debaryomyces polymorphus*, *Arxula adenivorans*, *P. holstii*, *P. anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *D. hansenii* y *P. guilliermondii* (Silva *et al.*, 2008; Masoud *et al.*, 2006). Los géneros de bacterias con actividad proteolítica más reportadas pertenecen a *Erwinia*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Escherichia* y *Bacillus* (Avallone, *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008).

Se ha reportado en otros trabajos que la pulpa de café es utilizada como fuente de carbono y nitrógeno para los microorganismos presentes en la fermentación de café, y estos producen cantidades de etanol, ácido acético, láctico y otros metabolitos que se ve reflejado en la disminución del pH (de 5.5 a 6.0 a 3.5 a 4.0) (Avallone *et al.*, 2001; de Melo *et al.*, 2014).

En muchos estudios realizados han sugerido la importancia de controlar la fermentación del café, esto con el fin de tener microorganismo que ayuden a la generación de metabolitos que ayuden a los precursores de aromas y sabores deseados en la taza de café (Martínez *et al.*, 2017, Silva *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2014).

Resultados y discusión

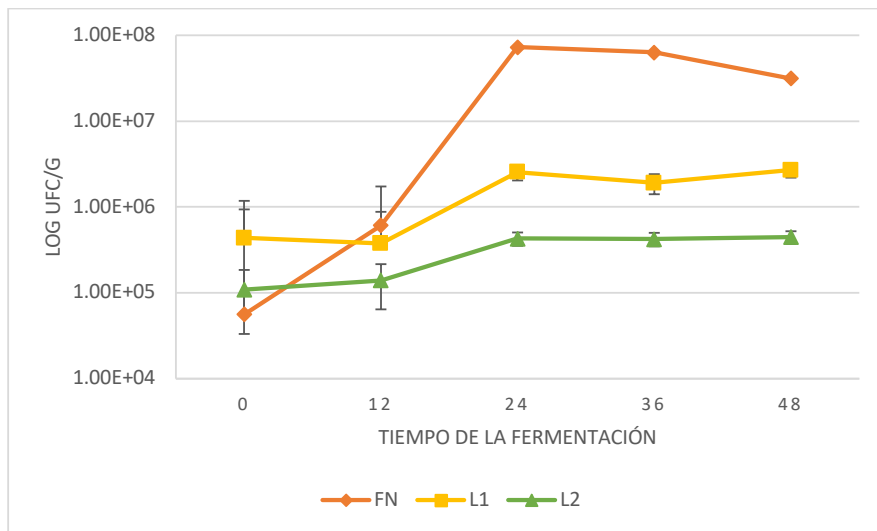


Figura 12. Seguimiento del crecimiento de las levaduras durante la fermentación

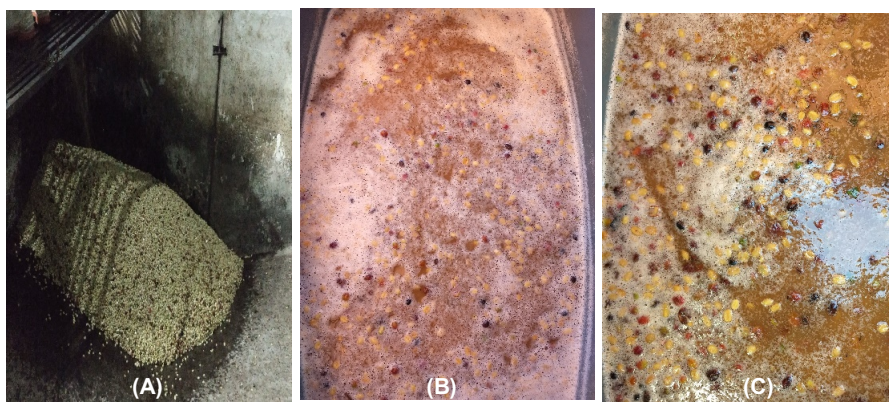


Figura 13. Fermentaciones de FN (A), L1 (B) y L2 (C)

Resultados y discusión

6.3.1.3 Dinámica de la población de *Saccharomyces cerevisiae* en la etapa de fermentación mediante PCR-DGGE.

Para darle seguimiento a la predominancia de los inóculos de *Saccharomyces cerevisiae* L1 y L2 en los granos de café durante la fermentación, se tomaron muestras de café a diferentes tiempos (0, 12, 24, 36 y 48h) y se colocaron de manera aséptica en bolsas ziploc las cuales fueron congeladas para su posterior transporte y análisis. A cada tratamiento se le realizó extracción de ADN, los fragmentos de ADNr fueron amplificados por PCR y posteriormente analizados por medio (GDDE) Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (El Sheika *et al.*, 2010). A continuación, se presentan los perfiles DGGE (Figuras 14, 15 y 16) que representan la dinámica de levaduras de los tres tratamientos, cada carril vertical representó una muestra de café a diferentes tiempos de fermentación con su respectivo duplicado y cada banda representó una especie de levaduras. En el primer carril se colocó ADN amplificado de las cepas puras de *S. cerevisiae*, estas proporcionadas por la empresa Danstar, esto permitió relacionar si las bandas de cada carril migraron a la misma distancia que las cepas inoculadas (L1 y L2). La técnica DGGE permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferentes secuencias de nucleótidos, por lo que se asume que cada banda corresponde a una especie diferente, por lo que la migración de bandas a la misma distancia en carriles diferentes corresponde a la misma especie. Sin embargo, es posible a partir de esta técnica conocer la identidad de las especies mediante la secuenciación de cada banda. Durante los últimos años, en el ámbito de alimentos esta técnica ha sido utilizada principalmente para estudiar la dinámica de levaduras en fermentaciones en vino (Portillo *et al.*, 2016), la diversidad de bacterias y levaduras en cacao (Batista *et al.*, 2015), las levaduras involucradas en el proceso de fermentación en café (Silva *et al.*, 2017).

En la Figura 14 se observa el perfil de DGGE de la fermentación natural (FN), en los primeros cuatro carriles se colocó ADN de las cepas *S. cerevisiae* L1 y L2 y a partir del quinto al último carril se colocó ADN de las muestras de café fermentado a diferentes tiempos de fermentación. Las intensidades de las bandas se relacionan con la abundancia de la población estudiada. Como se puede observar, las bandas

Resultados y discusión

dominantes en la FN no corresponden a las cepas inoculadas con *S. cerevisiae* debido a que la migración no se dio a la misma distancia, se observa también bandas con menor intensidad y a diferentes distancias que corresponden a otras especies de levaduras.

Masoud y Jespersen en 2006, estudiaron la diversidad de las poblaciones de levaduras en la fermentación de café, y encontraron que las especies de levaduras que más predominan durante todas las distintas etapas del procesamiento del café son *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum*.

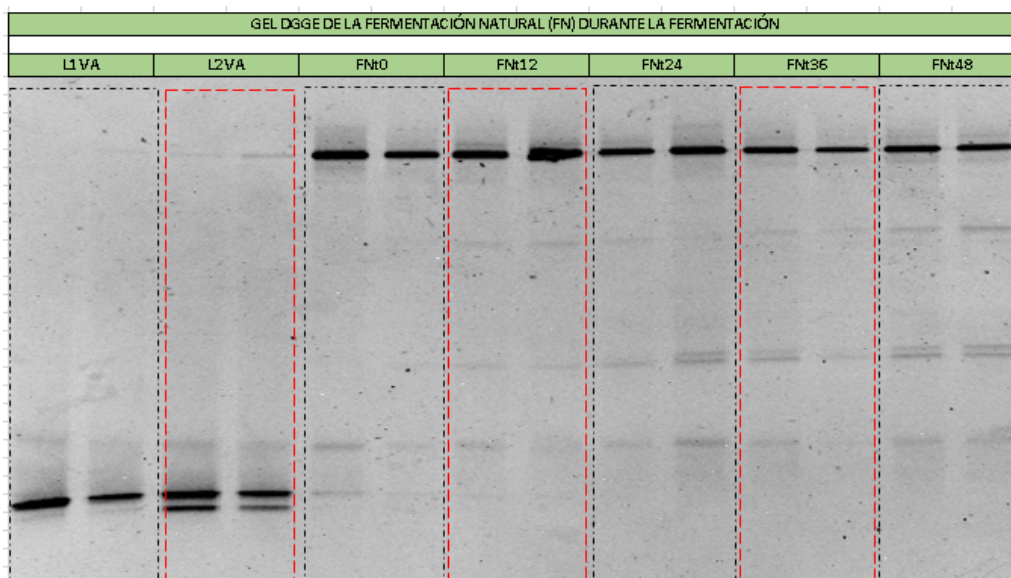


Figura 14. Perfil DGGE del seguimiento de la fermentación del tratamiento fermentación natural (FN)

L1VA: Cepa 1 inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L1), L2VA: Cepa 2 inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L2), Fnt: Fermentación natural en los diferentes tiempos de fermentación (0 a 48 h) con sus duplicados.

En la Figura 15 se muestra la dinámica de la levadura inoculada con *S. cerevisiae* L1, como se explicó en el experimento anterior en los primeros y dos últimos carriles se colocó el ADN amplificado de la cepa pura de *S. cerevisiae* (L1) y en los carriles restantes fueron colocados el ADN de las muestras tomadas a diferentes tiempos de fermentación.

Resultados y discusión

Como se observa la cepa de *S. cerevisiae* L1, aparece a lo largo de toda la fermentación con bandas de alta intensidad lo que indica que esta cepa no solo predomina durante todo el tiempo que duró la fermentación, sino que además aumentó el grosor de las bandas, lo que indica una mayor cantidad, esto se corroboró por la técnica de cuenta viable de levaduras se puede observar que se comenzó a ver el aumento en el grosor de las bandas a las 24 h de fermentación y estas perduraron hasta las 48 h donde se alcanzaron cuentas de $2.07E6$ UFC/g. Es importante resaltar que se observó también durante las primeras 12 horas otra cepa de levadura con bandas de baja intensidad, posteriormente esta esta cepa desaparece y la que predomina es la cepa inoculada L1.

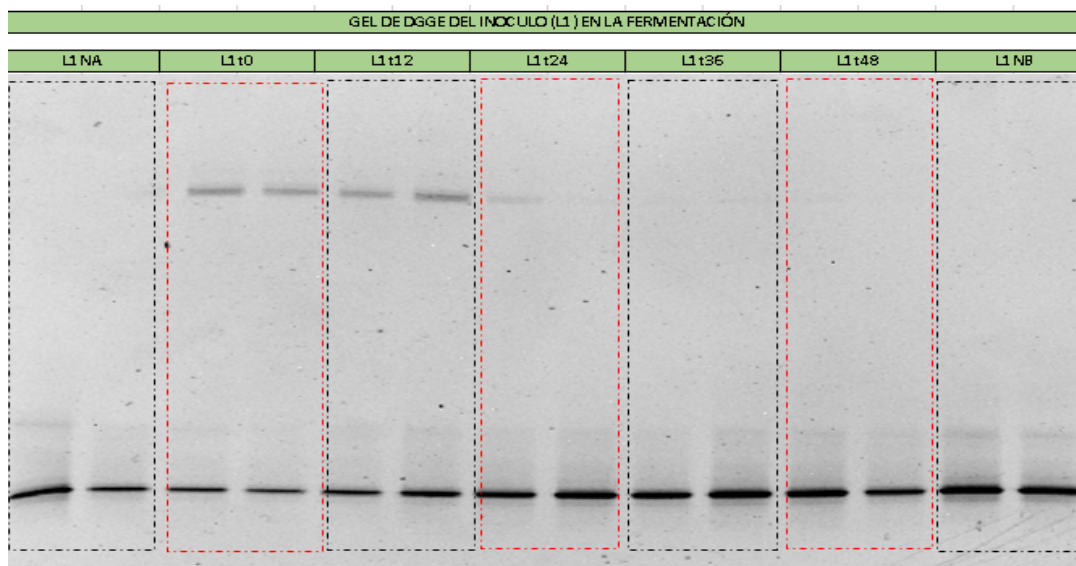


Figura 15. Perfil DGGE del seguimiento de la fermentación de la primera muestra inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L1).

L1NA: Cepa 1 inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L1), L1NB: Cepa 1 inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L1), L1t: Inoculo con *Saccharomyces cerevisiae* (L1) en los diferentes tiempos de fermentación (0 a 48 h) con sus duplicados.

Resultados y discusión

El perfil de DGGE para el tratamiento inoculado con *S. cerevisiae* L2 se presenta en la Figura 16. Como se explicó en el experimento anterior, en los primeros y dos últimos carriles se colocó el ADN amplificado de la cepa pura de *S. cerevisiae* (L2) y en los carriles restantes fueron colocados el ADN de las muestras tomadas a diferentes tiempos de fermentación. Este perfil presenta diferencias con respecto al tratamiento anterior, debido a que se observa la presencia en mayor abundancia de otra cepa de levadura que predomina durante las primeras 12 h de fermentación y posteriormente, la cepa de *S. cerevisiae* L2 se vuelve la dominante durante el resto del proceso. Sin embargo, es importante resaltar que las dos cepas prevalecen durante toda la fermentación. Se puede observar que la banda de la cepa que predomina durante las primeras 12 horas parece coincidir con la banda que predomina en la FN y con la banda que aparece en la fermentación con el primer inóculo con *S. cerevisiae* L1. Esto no se puede confirmar sin que se realice una secuenciación de estas bandas, pero se puede asumir que se trata de la misma levadura autóctona que se encuentra en el café desde etapas anteriores y que prevaleció durante toda la fermentación.

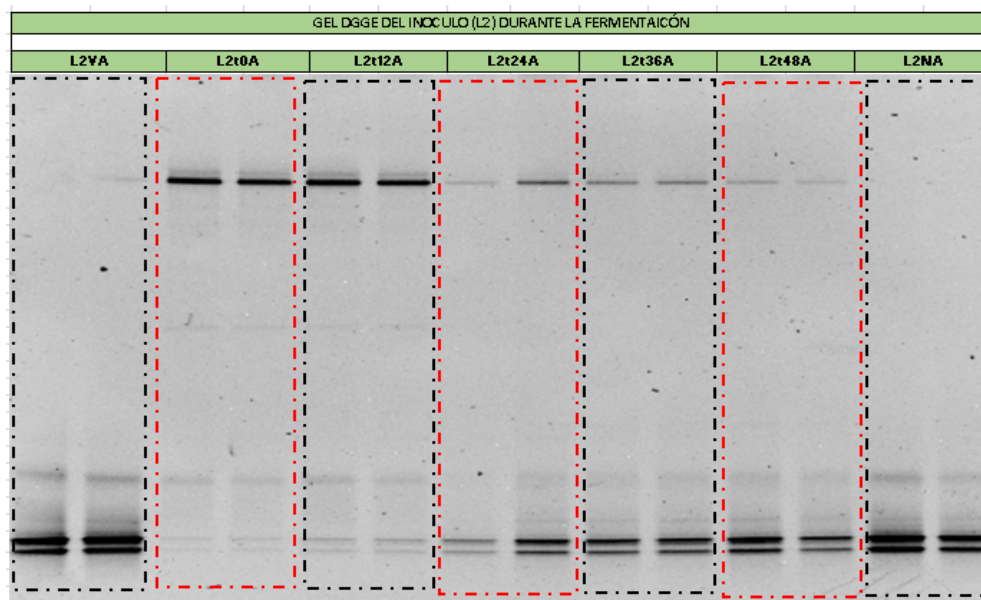


Figura 16. Perfil DGGE del seguimiento de la fermentación de la segunda muestra inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L2).

Resultados y discusión

L2VA: Cepa 2 inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L1), L2NA: Cepa 2 inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L2), L2t: Inóculo *Saccharomyces cerevisiae* (L2) en los diferentes tiempos de fermentación (0 a 48 h) con sus duplicados.

6.3.2 Seguimiento del café en el almacenamiento.

6.3.2.1 Cambios físicos y químicos en el café durante el almacenamiento.

La preservación de todos los atributos sensoriales que se desean en el café depende esencialmente del almacenamiento. El almacenamiento es una etapa posterior de postcosecha que continua después del secado del café, durante ésta el café puede pasar largos periodos almacenado hasta la comercialización. Por lo tanto, el almacenamiento es considerado uno de los factores más importantes para mantener la calidad del producto final, para satisfacer la demanda entre la cosecha y asegurar el mejor precio del mercado para el productor (Meira *et al.*, 2014).

En este trabajo se llevó a cabo el almacenamiento del café proveniente de los tres tratamientos en estudio, café inoculado con cepa de *S. cerevisiae* L1 y L2 y café proveniente de una fermentación natural. Las muestras de café secas (8 al 11%) fueron colocadas en sacos de polipropileno en un almacén a temperatura ambiente, libre de humedad y aislado del suelo y paredes. Se le dio seguimiento mensual a los marcadores de calidad que son afectados durante el almacenamiento: humedad, actividad de agua, color, porcentaje de infección fúngica, contenido de Ocratoxina A, generación de compuestos orgánicos volátiles y evaluación sensorial. La dinámica de levaduras presentes en la etapa de almacenamiento se realizó utilizando la técnica PCR-DGGE.

6.3.2.2 Análisis de Actividad de agua (Aw) del grano de café almacenado.

El café tiene un comportamiento higroscópico, esto quiere decir que su actividad de agua (Aw) va variando dependiendo de las condiciones en las que se esté almacenando (temperatura y humedad relativa). Dependiendo de estas condiciones es el comportamiento hidrosópico del grano, ya sea que gane humedad o la pierda y este proceso sucede durante el periodo que se encuentre almacenado.

Resultados y discusión

En la Figura 17 se presentan las Aw de las muestras en estudio de los tres tratamientos las cuales fueron almacenadas en sacos de polipropileno bajo las condiciones que se llevan a cabo en los almacenes de café locales. Se observó una disminución de este parámetro en el tercer (junio) y cuarto (julio) mes de almacenamiento donde las Aw de 0.63, 0.65 y 0.64 (mes 2) hasta 0.55, 0.583 y 0.57 respectivamente. Posteriormente para los meses 5 y 6 el café aumentó su Aw hasta alcanzar valores de 0.74 para FN y 0.71 para L1 y L2. Estas variaciones son debidas a las condiciones ambientales. La disminución observada en los meses 3 y 4 corresponde a los meses de junio y julio que son los más secos del año, posteriormente los meses donde aumentó la Aw corresponden a épocas de lluvia. Trabajos reportados sobre la Aw en granos de café han demostrado que las condiciones óptimas deben estar entre 0.6 hasta 0.7 debido a que Aw más altas propicia el crecimiento de hongos filamentosos y un deterioro en el grano (Harrys y Miller, 2008).

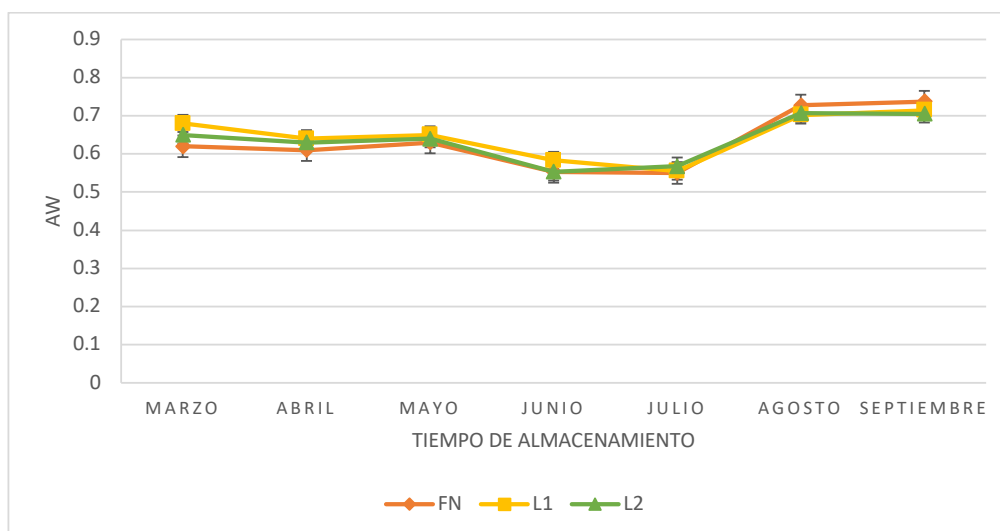


Figura 17. Actividad de agua (Aw) de los granos de café durante los seis meses de almacenamiento.

Resultados y discusión

6.3.2.3 Determinación de la humedad del grano de café almacenado.

De acuerdo a Othón-Serna (1996), la humedad óptima del grano en café verde debe estar entre el 11 % al 12 %, estas condiciones deben de permanecer durante el almacenamiento, debido a que humedades más altas propician el crecimiento de hongos filamentosos, la pérdida de la viabilidad de los granos del café, y cambios físicos en el color.

Las humedades iniciales fueron de 11.66% y 11.61% para los tratamientos L1 y L2 respectivamente (Figura 18), los granos de café para el tratamiento FN iniciaron su almacenamiento con un contenido de humedad más bajo de 8.33%, a pesar de que todos los tratamientos fueron secados por el mismo método y el mismo tiempo. El secado se realizó al sol, cada lote fue secado en zarandas diferentes; este comportamiento se puede explicar debido al tipo de fermentación por la cual se realizaron los tratamientos, en una fermentación sumergida en agua el grano de café absorbe más agua, lo que requiere más tiempo de secado en comparación con una fermentación en ausencia de esta.

El comportamiento de la humedad durante todo el periodo de almacenamiento muestra que el café en los tres tratamientos pierde humedad desde el primer mes, y posteriormente la humedad se mantiene constante hasta el último mes de almacenamiento en donde los contenidos de humedad finales fueron de 8.81% para FN, 8.29% para L1 y 8.4% para L2. Los bajos porcentajes de humedad en los tratamientos se debe a dos factores principalmente, el primer factor es al tipo de empaque que se utilizó para almacenar el café que fue de polipropileno, y en la industria el utilizado son los sacos de yute, y el segundo factor fueron las épocas secas cuando fue almacenado el grado, debido a que la humedad relativa en épocas la humedad relativa del aire es inferior, lo que provocó que el café cediera agua al medio y esto provocó su deshidratación; este mismo fenómeno explica el incremento que se observó y continuó en los granos almacenados, debido a que al

Resultados y discusión

llegar épocas donde la humedad relativa del aire es superior, el café capturó agua del medio ambiente y se hidrató.

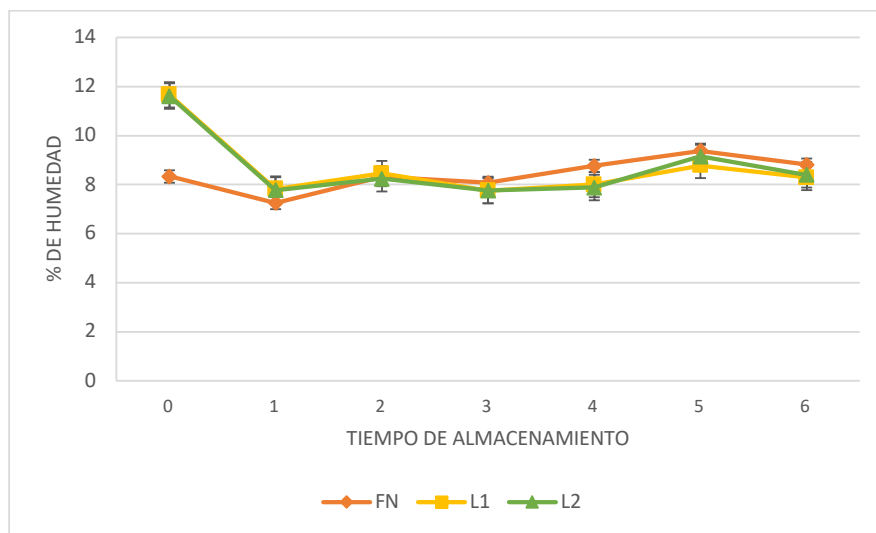


Figura 18. Seguimiento de la humedad durante los seis meses de almacenamiento en café pergamino.

6.3.2.4 Análisis de color del grano de café almacenado.

El color es un parámetro importante, ya que permite evaluar la calidad de grano de café, este es uno de los factores que influyen en la aceptación o rechazo de un lote. Existen diversas reacciones que pueden afectar el color durante el procesamiento, de las más comunes están la degradación de pigmentos, en especial los carotenoides y clorofila, reacciones de Maillard y la oxidación de ácido ascórbico (Rockland et al., 1980). Existen diferentes espacios de color, los más utilizados L^* , a^* y b^* debido a la distribución uniforme de los colores y su cercanía a la percepción humana del color (León et al., 2006). La luminosidad (L^*) representa la brillantez y va de 0 (negro) a 100 (blanco). En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de la luminosidad (L^*) durante los seis meses de almacenamiento. Como se observa, no existe una diferencia significativa entre los tratamientos FN con respecto a L1 y L2.

Resultados y discusión

Tabla 8. Luminosidad del grano de café verde

Meses	FN	L1	L2
0	77.39 ±0.26 ^a	75.61±1.7 ^a	73.62±0.61 ^a
1	77.58 ±0.13 ^a	76.05 ±1.7 ^a	76.51 ±2.41 ^a
2	76.68 ±0.42 ^a	76.51 ±0.26 ^a	76.28 ±0.86 ^a
3	71.51 ±2.9 ^a	73.93 ±2.05 ^a	69.67 ±1.38 ^a
4	74.12 ±0.24 ^a	71.48 ±0.74 ^a	72.9 ±1.98 ^a
5	70.36 ±1.83 ^a	70.27 ±0.01 ^a	68.67 ±0.95 ^a
6	73.8 ±2.03 ^a	72.11±3.40 ^a	72.52 ±1.68 ^a

Prueba de Tukey. Superíndices iguales no son significativamente diferentes entre tratamientos p(<0.05)

El valor a* indica un grado de color que va de la tonalidad rojo a verde donde la tendencia hacia el rojo va desde 0 a 100 y la tonalidad verde desde -1 a -80. Como se observa en la Tabla 9, durante el mes 0 existe una tendencia hacia el grado de tonalidad verde, y entre tratamientos no hay una diferencia significativa. Se puede apreciar que durante los seis meses de almacenamiento el grado de tonalidad en los tratamientos persiste en la tonalidad verde, al inicio del almacenamiento los valores para cada tratamiento son FN -2.17, -2.16 para L1 y -2.27 para L2 y al finalizar los seis meses de almacenamiento obtuvieron en FN de -1.06, -1.4 para L1 y -1.39 para L2.

Resultados y discusión

Tabla 9. Parámetro a* en grano de café verde

Meses	FN	L1	L2
0	-2.17 ±0.04 ^a	-2.16 ±0.11 ^a	-2.27 ±0.14 ^a
1	-1.76 ±0.18 ^a	-2.4 ±0.10 ^a	-2.44 ±0.0 ^a
2	-0.7 ±0.30 ^a	-1.11 ±0.15 ^a	-0.96 ±0.08 ^a
3	-0.67 ±0.19 ^a	-1.3 ±0.28 ^a	-1.08 ±0.22 ^a
4	-0.61 ±0.04 ^a	-1.27 ±0.13 ^a	-1.25 ±0.09 ^a
5	-0.85 ±0.06 ^a	-1.41 ±0.03 ^a	-1.05 ±0.11 ^a
6	-1.06 ±0.34 ^a	-1.4 ±0.13 ^a	-1.39 ±0.28 ^a

Prueba de Tukey. Superíndices iguales no son significativamente diferentes p(<0.05)

El valor b* indica un grado de color que va de la tonalidad amarillo a azul donde la tendencia hacia el amarillo va desde 1 a 70 y la tonalidad azul desde -1 a -80. Como se puede observar en la Tabla 10, sí existe diferencia significativa entre los tratamientos FN y L2. Durante los seis meses de almacenamiento, todos los tratamientos están hacia el tono amarillo. Sin embargo, en el mes 2 existe una disminución significativa en los tres tratamientos; en el último mes de almacenamiento los tratamientos aumentaron significativamente quedando en FN 11.79, 10.47 para L1 y 10.16 para L2.

Resultados y discusión

Tabla 10. Parámetro b* en grano de café verde.

Meses	FN	L1	L2
0	12.54±0.25 ^a	11.34±0.45 ^{ab}	10.68 ±0.21 ^b
1	12.48 ±0.07 ^a	11.15 ±0.58 ^{ab}	10.85±0.45 ^b
2	10.2 ±0.18 ^a	9.68 ±0.08 ^{ab}	9.38±0.05 ^b
3	10.77 ±0.37 ^a	10.28±0.33 ^{ab}	9.23 ±0.33 ^b
4	10.91 ±0.12 ^a	9.75 ±0.03 ^{ab}	9.88 ±0.60 ^b
5	10.33 ±0.29 ^a	9.91 ±0.14 ^{ab}	9.47 ±0.31 ^b
6	11.79 ±0.24 ^a	10.47 ±0.66 ^{ab}	10.16 ±0.71 ^b

Prueba de Tukey. Superíndices iguales no son significativamente diferentes; $p(<0.05)$

En el presente trabajo también fue estudiada la cromaticidad, que es definida como el grado de saturación del color y es proporcional a la intensidad de color percibido. Los resultados mostrados en la Tabla 11 indican que existe diferencia significativa entre tratamientos FN y L2. También se observa que en los primeros meses, contando desde el mes cero al mes dos, hay una disminución muy significativa en el grado de saturación del color con respecto al tiempo, sin embargo, en el mes tres hubo un aumento solo en FN y L1, el tratamiento L2 se mantiene con una disminución significativa; durante los seis meses de almacenamiento la cromaticidad se mantiene con variaciones, en el último mes de almacenamiento los tres tratamientos aumentan significativamente quedando FN de 11.82, L1 de 10.57 y L2 de 10.25.

Resultados y discusión

Tabla 11. Cromaticidad en grano de café verde.

Meses	FN	L1	L2
0	12.73 ±0.24 ^a	11.54±0.45 ^{ab}	10.92±0.19 ^b
1	12.6±0.03 ^a	11.4±0.55 ^{ab}	11.12±0.44 ^b
2	10.23±0.20 ^a	9.75±0.10 ^{ab}	9.43±0.05 ^b
3	10.29±1.06 ^a	10.36±0.36 ^{ab}	9.3±0.36 ^b
4	10.92±0.11 ^a	9.83±0.04 ^{ab}	9.96±0.62 ^b
5	10.37±0.28 ^a	10.02±0.13 ^{ab}	9.53±0.29 ^b
6	11.83±0.21 ^a	10.57±0.64 ^{ab}	10.25±0.74 ^b

Prueba de Tukey. Superíndices iguales no son significativamente diferentes p(<0.05)

El ángulo matiz es una de las cualidades fundamentales en la propiedad de un color, definido técnicamente como «el grado en el cual un estímulo puede ser descrito como similar o diferente de los estímulos como rojo, amarillo y azul».

Los valores de ángulo de matiz arriba de 90° indican un color verde, y entre más alto sea este valor el color verde es más intenso, alcanzando un color verde puro a los 90° (Broissin *et al.*, 2017). Como se observa en la Tabla 12, durante el mes 0 existe una tendencia hacia el verde puro, aunque los ángulos matiz de L1 (100.8) y L2 (101.99) son ligeramente más altos que FN (99.81), no hay una diferencia significativa entre tratamientos, al finalizar los seis meses de almacenamiento se obtuvieron en FN 95.13, 97.65 para L1 y 97.77 para L2 estas disminuciones en los tratamientos no tienen impacto en su calidad.

Resultados y discusión

Tabla 12. Ángulo matiz del grano de café verde.

Meses	FN	L1	L2
0	99.81±0.36 ^a	100.8 ±0.42 ^a	101.99±0.89 ^a
1	98.03±0.87 ^a	102.15±1.14 ^a	102.69±0.53 ^a
2	93.88±1.64 ^a	96.55±0.85 ^a	95.83±0.55 ^a
3	93.82 ±1.51 ^a	97.2±1.30 ^a	96.68±1.15 ^a
4	93.17 ±0.24 ^a	97.4±0.72 ^a	97.19±0.12 ^a
5	94.69 ±0.46 ^a	98.09±0.33 ^a	96.35±0.90 ^a
6	95.13 ±1.76 ^a	97.65±1.20 ^a	97.77±1.03 ^a

Prueba de Tukey. Superíndices iguales no son significativamente diferentes $p(<0.05)$

6.3.2.5 Análisis de defectos y granulométrico del grano de café almacenado.

En la tabla 13 se muestra el número de defectos de los granos de café provenientes de los diferentes tratamientos durante los seis meses de almacenamiento. Los defectos son definidos como cualquier cosa diferente a un grano normal, que pueda presentarse como consecuencia de malas prácticas agrícolas o de proceso, por lo que se pueden dividir en tres grupos: defectos provenientes del campo, del proceso y del almacenamiento. Los granos se almacenaron en café pergamino y en saco de polipropileno, mensualmente se despergaminó para su posterior análisis, observando que en el café procesado por fermentación natural (FN) había un mayor número de defectos, esto comparado con los tratamientos inoculados con L1 y L2. Sin embargo, todos los tratamientos tuvieron una buena calidad del café verde, debido a que el número de defectos encontrados están por debajo del rango aceptado, de acuerdo a la SCAA “Specialty Coffee American Association” (23 defectos como máximo).

Uno de los defectos que predominó durante los seis meses de almacenamiento fue GQRF (grano quebrado, roto, fracturado), que se debe a un mal manejo de la despulpadora y a un mal despergaminado, debido a esto se agrupó en defectos de

Resultados y discusión

proceso, por lo tanto, se determinó que no existen defectos que fueran resultado del tipo de fermentación que se estudiaron.

Existen defectos como las conchas o caracoles, que no se asocian con los tratamientos postcosecha, debido a que son defectos genéticos generados por la unión de dos pústulas deformes (ISO 10470:2004).

Durante los seis meses de almacenamiento no se observó una diferencia significativa entre cada tratamiento y los meses de almacenamiento. Aunque existen trabajos que han reportado que existe una relación en el deterioro físico con el incremento de la humedad relativa principalmente en el grano de café verde, en este trabajo no se observó dicho deterioro, lo que indica que las muestras fueron almacenadas en condiciones adecuadas (Broissin *et al.*, 2017).

El tamaño del grano de café es otro parámetro importante, debido a que permite a determinar su calidad. En la Tabla 14 se muestran los resultados del análisis granulométrico obtenidos de los granos de café provenientes de los diferentes tratamientos (FN, L1 y L2) durante los seis meses de almacenamiento. El mayor porcentaje de granos de café verde fueron retenidos en la criba 18" (7.10 mm). Se observó que no existen diferencias significativas entre tratamientos. La homogeneidad del tamaño del grano es un factor de calidad deseable por los industriales ya que facilita un tostado homogéneo, sin embargo, el tamaño también es un factor de calidad ya que se han asociado a los granos de tamaño grande con cafés que han sido cultivados en su estado óptimo de maduración (Broissin *et al.*, 2017).

Tabla 13. Determinación de números totales de defectos en granos de café verde.

Meses	Beneficio			Almacenamiento		
	FN	L1	L2	FN	L1	L2
Mes 0	10.06±1.65 ^a	9.76±1.97 ^a	8.9±2.09 ^a	1.28±0.43 ^a	1.62±0.41 ^a	1.65±0.41 ^a
Mes 1	10.89±1.64 ^a	9.42±1.18 ^a	10.61±1.23 ^a	1.53±0.67 ^a	1.21±0.21 ^a	1.51±0.17 ^a
Mes 2	9.67±0.65 ^a	8.83±1.71 ^a	8.82±1.25 ^a	1.98±0.25 ^a	1.94±0.13 ^a	1.43±0.35 ^a
Mes 3	8.74±1.71 ^a	8.68±1.58 ^a	8.9±0.93 ^a	1.58±0.44 ^a	0.95±0.67 ^a	1.63±0.36 ^a
Mes 4	9.08±1.15 ^a	8.05±1.03 ^a	8.32±1.0 ^a	1.39±0.55 ^a	0.98±0.24 ^a	1.12±0.14 ^a
Mes 5	11.02±2.88 ^a	11.64±1.06 ^a	9.87±2.36 ^a	1.21±0.51 ^a	1.11±0.18 ^a	1.33±0.38 ^a
Mes 6	8.32±1.68 ^a	9.52±2.50 ^a	8.83±0.86 ^a	1.13±0.60 ^a	0.99±0.19 ^a	1.23±0.12 ^a

Comparación del promedio de defectos físicos (%) de café Verde.

Prueba de Tukey. Superíndices iguales no

son significativamente diferentes p(<0.05)

Tabla 14. Determinación de Granulometría en grano de café verde.

Meses	Número de Cribas																							
	18						17						16						Otros					
	FN	L1	L2	FN	L1	L2	FN	L1	L2	FN	L1	L2	FN	L1	L2	FN	L1	L2						
0	39.53±2.3 ^a	42.86±1.3 ^a	38.97±3.5 ^a	27.1±1.0 ^a	26.6±0.5 ^a	28.12±1.0 ^a	15.06±6.8 ^a	17.8±1.1 ^a	18.01±0.4 ^a	18.3±5.5 ^a	12.74±3.0 ^a	14.90±2.4 ^a	34.83±0.7 ^a	32.77±0.8 ^a	34.92±0.09 ^a	28.81±0.8 ^a	28.28±0.5 ^a	28.44±0.4 ^a	22.36±1.0 ^a	23.43±0.1 ^a	22.15±0.3 ^a	14.00±0.4 ^a	15.53±0.1 ^a	14.49±0.1 ^a
1	43.15±2.8 ^a	39.22±0.7 ^a	41.05±3.3 ^a	28.26±0.1 ^a	28.8±2.4 ^a	27.58±0.9 ^a	21.23±2.2 ^a	22.11±1 ^a	21.7±1.7 ^a	7.36±0.5 ^a	9.88±3.6 ^a	9.67±2.5 ^a	45.21±0.7 ^a	40.39±2.3 ^a	42.2±0.9 ^a	27.71±0.6 ^a	31.08±1.6 ^a	28.27±0.6 ^a	19.54±1.0 ^a	21.31±1.1 ^a	19.62±0.5 ^a	7.54±0.9 ^a	7.22±2.8 ^a	9.92±0.2 ^a
2	43.18±0.0 ^a	38.17±0.5 ^a	42.89±0.7 ^a	27.82±1.3 ^a	28.88±0.4 ^a	26.23±0.2 ^a	19.93±0.9 ^a	21.23±1.7 ^a	20.25±0.3 ^a	9.07±2.1 ^a	11.53±2.4 ^a	10.64±0.6 ^a	43.27±1.0 ^a	40.65±0.1 ^a	45.57±0.1 ^a	28.06±1.2 ^a	28.99±0.7 ^a	29.29±0.2 ^a	18.18±0.6 ^a	20.9±0.1 ^a	19.45±0.6 ^a	10.49±0.5 ^a	9.46±0.7 ^a	5.69±0.1 ^a
3	44.51±1.1 ^a	38.01±1.8 ^a	42.43±0.1 ^a	26.93±0.6 ^a	31.48±1.6 ^a	26.54±1.0 ^a	18.44±0.3 ^a	21.3±0.1 ^a	21.13±0.4 ^a	10.12±0.1 ^a	9.21±0.3 ^a	9.91±1.3 ^a	44.51±1.1 ^a	38.01±1.8 ^a	42.43±0.1 ^a	26.93±0.6 ^a	31.48±1.6 ^a	26.54±1.0 ^a	18.44±0.3 ^a	21.3±0.1 ^a	21.13±0.4 ^a	10.12±0.1 ^a	9.21±0.3 ^a	9.91±1.3 ^a

Prueba de Tukey. Superíndices iguales no son significativamente diferentes p(<0.05)

6.3.2.6 Porcentaje de infección fúngica del café durante el almacenamiento

En el porcentaje de infección fúngica de los granos de café almacenados provenientes de los tres tratamientos se realizó en dos medios de cultivo diferentes, PDA y DG18. De acuerdo a Hocking y Pitt (1980), el medio DG18 es un medio selectivo que permite el desarrollo de hongos filamentosos en alimentos de baja humedad, como son los granos almacenados. El medio PDA permite el crecimiento de un amplio número de hongos filamentosos y levaduras. En la Figura 19 se muestra el porcentaje de infección fúngica en medio PDA, y se observa que, para el tratamiento FN, el % de infección fúngica inicial es del 60 % sin embargo, conforme fue pasando el tiempo fue disminuyendo hasta alcanzar un % de infección fúngica final de 4% al finalizar el almacenamiento. Este mismo comportamiento se observó en el tratamiento L2, el % de infección fúngica inicial fue de 48% y, conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento este fue disminuyendo hasta finalizar con un % de infección fúngica final del 2%. El tratamiento L1 desde el comienzo obtuvo % de infección fúngica bajo de 16%, y llegó hasta un 0% al finalizar el almacenamiento. El comportamiento que se mantuvo en el % de infección fúngica de los tres tratamientos se puede explicar debido a los valores que se observaron en los parámetros de humedades y A_w , estos presentaron valores de humedades iniciales de 8.33 hasta 11.66 y A_w que fueron desde 0.62 hasta 0.68, posteriormente estos valores fueron disminuyendo conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento, explicando el comportamiento las infecciones fúngicas.

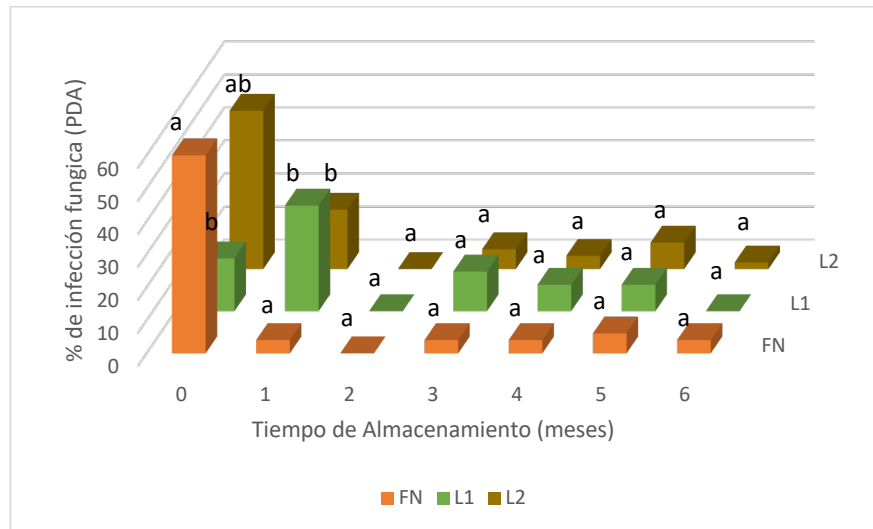


Figura 19. Porcentaje de la infección fúngica durante seis meses de almacenamiento en medio PDA.

Prueba de Tukey. Superíndices iguales no son significativamente diferentes $p(<0.05)$

En el medio DG18 se observó el mismo comportamiento para los tres tratamientos estudiados, sin embargo, los porcentajes de infección fúngica en este medio fueron más bajos que en el antes mencionado, esto debido a que es un medio selectivo para hongos xerófilos que se presentan en productos de baja humedad. En la Figura 20 se puede observar que el tratamiento proveniente de FN presenta porcentajes de infección más bajos, esto al compararlos con los otros tratamientos, sin embargo, se esperaba que L1 y L2 presentaran efectos inhibitorios sobre los hongos filamentosos. El comportamiento que se observa en FN puede ser explicado debido a que este presenta un consorcio compuesto no solo por diferentes levaduras sino también por bacterias ácido lácticas que presentan efectos antifúngicos

Broissin *et al.*, (2017) estudió la dinámica de poblaciones fúngicas y su impacto en los marcadores de calidad durante el almacenamiento de café verde en sacos de yute, reportando que a los 180 días de almacenamiento había un 70% de infección fúngica, y para los 270 ya registraba 100% de infección en un medio de DG18. En este trabajo

se observó disminución del % [PONER A CUANTO DISMINUYERON L1-0%, L2- FN-] de infección en los tres tratamientos durante el almacenamiento, y esto puede ser atribuido al efecto de biocontrol que tuvieron las levaduras así también como microbiota autóctono presente en el café.

La especie que más predominó durante los seis meses de almacenamiento fue de la sección Nigri, y esto concuerda con lo reportado por Niño-Rodríguez (2018), demostró que las especies de la sección Nigri constituye la principal fuente de producción de OTA en México.

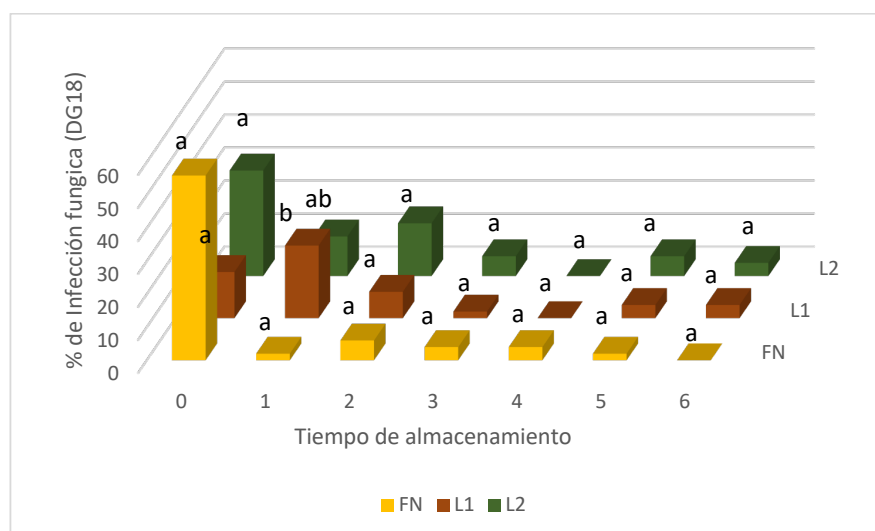


Figura 20. Porcentaje de la infección fúngica durante seis meses de almacenamiento en medio DG18.

Prueba de Tukey. Superíndices iguales no son significativamente diferentes $p(<0.05)$

Broissin *et al.* (2017) Estudio la dinámica de poblaciones fúngicas y su impacto en los marcadores de calidad durante el almacenamiento de café verde obtuvo que para los 180 días de almacenamiento tenía un 70% de infección, y para los 270 ya registraba 100% de infección en un medio de DG18. Comparado con los resultados de este trabajo, sí hubo una disminución en el % de infección en los tres tratamientos, tanto

FN como L1 y L2. Los hongos filamentosos que crecieron fueron *Nigri* y *Flavi*, siendo *Nigri* el predominante durante los seis meses, mientras que *Flavi* sólo estuvo presente durante un mes. Niño-Rodríguez, (2018) demostró que las especies de la sección *Nigri* constituyen la principal fuente de producción de OTA en café de México, siendo esta especie la que predominó durante los seis meses de almacenamiento.

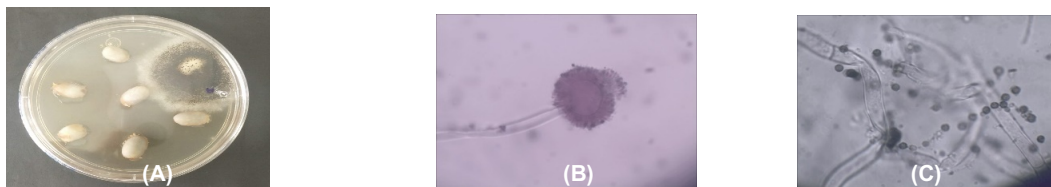


Figura 21. Estructura microscópicas de *A. niger*. (A) Sección *Nigri* en Medio PDA, 5 días de incubación a 25°C, (C) y (D) Conidióforo de la sección *Nigri*

6.3.2.7 Cuantificación de OTA por el método de ELISA

El periodo de almacenamiento es un punto crítico para mantener la inocuidad de los granos de café, debido que si no se mantiene las condiciones de temperatura y humedad relativa adecuadas, se presenta el crecimiento de hongos filamentosos, algunos de ellos causantes del deterioro del grano y la pérdida de calidad aromática y sensorial. Por otro lado, estos mismos contaminantes pueden ser clasificados como tóxicos productores de micotoxinas que comprometen la salud del consumidor. Para el caso del café la toxina más importante es la OTA, por lo que se analizó su presencia durante el almacenamiento del café.

En la Tabla 15 se presenta la cuantificación de la OTA en los diferentes tratamientos durante el almacenamiento. El café proveniente de los tratamientos FN y el inoculado con *S. cerevisiae* L2 mostraron contenidos de OTA desde el inicio del almacenamiento con valores iniciales de 1.4 ± 0.49 y 1.8 ± 0.70 $\mu\text{g/Kg}$ de OTA, respectivamente. Estos valores se mantienen sin cambios significativos durante los 6 meses de almacenamiento. En el café inoculado con *S. cerevisiae* L1, no se detectó la presencia de la toxina en ningún mes.

Estos resultados sugieren que la toxina se pudo haber generado durante la etapa de secado cuando la Aw y temperatura fueron favorables para el desarrollo de hongos productores de OTA, sin embargo, durante el almacenamiento no se presentó ningún aumento en la cantidad de OTA. Los resultados coinciden con los valores de actividad Aw de los granos durante el almacenamiento, las cuales no fueron favorables para el desarrollo de hongos toxigénicos, así mismo se pudo observar que el porcentaje de infección fúngica fue muy bajo durante los meses de almacenamiento y que los granos provenientes de la fermentación con la cepa L1 fueron los que presentaron menores porcentajes de infección, lo que podría explicar la ausencia de la toxina. Estos resultados concuerdan con lo reportado por diferentes autores que demostraron que las levaduras tienen influencia sobre el crecimiento y esporulación de especies ocratoxigénicas lo que impacta en la OTA producida (Frank, 2001). Gil-Serna *et al.* en 2011, mostraron que la producción de OTA por *A. westerdijkiae* era reducida a nivel transcripcional por *Debaromyces hansenii*, por otro lado, también se ha reportado la inhibición de *A. ochraceus* por levaduras comerciales y aisladas de café (Masoud *et al.*, 2005; Masoud y Kalsoft, 2006).

En relación a la actividad antifúngica de especies de levaduras contra hongos toxigénicos, se ha demostrado que algunas especies de levaduras tienen la capacidad de degradar la OTA (Molnar, *et al.*, 2004, Schatzmayr *et al.*, 2006). Los consorcios formados por levaduras y bacterias ácido lácticas presentes naturalmente en café también han demostrado tener efecto antagónico sobre *A. carbonarius* (Massawe y Lifa 2010). En el presente trabajo se demuestra que los inóculos de levaduras presentes en la FN y en las fermentaciones conducidas por L1 y L2 fueron capaces de mantener la inocuidad del grano durante 6 meses de almacenamiento, aunque no se observó degradación de la OTA.

Tabla 15. Concentración de OTA µg/kg en café

Meses	FN	L1	L2
0	1.4±0.49 ^a	0.0±0.0 ^b	1.8±0.70 ^a
1	1.9±0.42 ^a	0.0±0.0 ^b	1.6±0.20 ^a
2	1.6±0.21 ^a	0.0±0.0 ^b	1.8±1.69 ^a
3	1.5±5.65 ^a	0.0±0.0 ^b	1.2±0.35 ^a
4	1.5±0.91 ^a	0.0±0.0 ^b	1.6±0.28 ^a
5	1.6±0.70 ^a	0.0±0.0 ^b	1.4±0.42 ^a
6	1.8±0.55 ^a	0.0±0.0 ^b	1.2±0.06 ^a

Prueba de Tukey. Suberíndices iguales no son significativamente diferentes; subíndices diferentes son significativamente diferentes $p(<0.05)$

6.3.2.8 Dinámica de la población de *Saccharomyces cerevisiae* en la etapa del almacenamiento mediante PCR-DGGE

El seguimiento de la dinámica de la población de levaduras presentes en la FN y en los tratamientos inoculados con *Saccharomyces cerevisiae* L1 y L2 se llevó a cabo mediante la técnica de PCR-DGGE. Se realizaron muestreos mensuales de café almacenado desde el mes 0 hasta el mes 6. Para cada muestra se realizó la extracción de ADN mediante la técnica descrita anteriormente (El Sheika *et al.*, 2009). La región D1/D2 del ADNr 26/28S que fue amplificada correspondiente al gen del ARN 26S del ribosoma de *Saccharomyces cerevisiae* (M19229 GenBank). Estas dan origen a un amplicón de 258 pb. GCNL1f (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G – 3') y primer LS2r (5'- ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC – 3'). Los fragmentos de ADNr amplificados por PCR fueron analizados por DGGE. Se utilizó el ADN de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* L1 y L2 como marcadores. Cada carril vertical representó una muestra de café almacenado con su respectivo duplicado y cada banda representó una especie de *S. cerevisiae*. En el primer carril se colocó el ADN amplificado de las cepas de *S.*

cerevisiae L1 o L2 según corresponda. En la Figura 22 se muestra la dinámica de las levaduras presentes durante el almacenamiento del tratamiento proveniente de FN; se observa que las especies presentes en este tratamiento no corresponden a las especies inoculadas de *S. cerevisiae* L1 y L2, se puede observar con bandas de baja intensidad que al menos existen tres especies de levaduras que predominan durante el almacenamiento. Estas especies observadas en este perfil DGGE pueden ser las mismas que se encontraron en el perfil de la etapa de fermentación, esto debido a su posición relativa en el gel, sin embargo, esto solo se puede corroborar mediante un análisis de secuenciación de las bandas. Las levaduras presentes en la FN son especies nativas de la zona donde se realizó el estudio (Huatusco, Ver.). Tomando en cuenta la intensidad de las bandas se puede observar que, conforme transcurre el tiempo, la presencia de levaduras en los granos va siendo menos abundante, estas levaduras posiblemente no se adaptaron a las condiciones del almacenamiento. Se puede mencionar de este perfil que las dos primeras bandas, pueden ser levaduras que se adaptaron a las condiciones del almacenamiento y predominaron durante los 6 meses. Un estudio realizado para la dinámica de levaduras durante el almacenamiento de café mostró que, durante el almacenamiento, la comunidad fúngica en los granos de café antes del almacenamiento y durante los 180 días de almacenamiento estaba dominada por varias OTU filogenéticamente pertenecientes al grupo de los *Saccharomycetales*, entre ellas, las más abundantes del 49% y 24% de abundancia relativa estaban relacionadas con *Meyerozyma guillermondii* y *Pichia kluyver* (Broissin *et al.*, 2017).

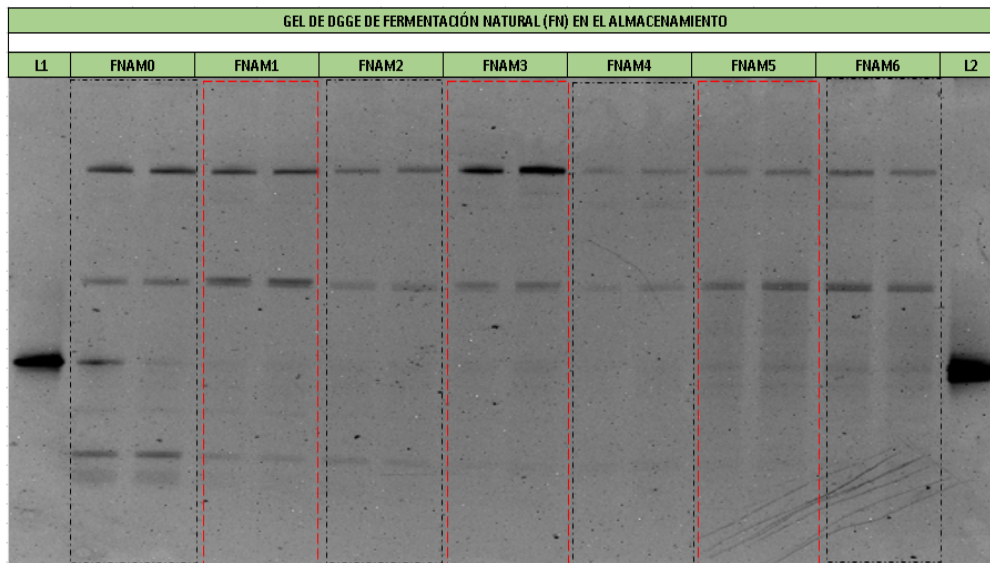


Figura 22. Perfil DGGE del seguimiento en el almacenamiento de la fermentación natural (FN)

L1: Inóculo 1 con *Saccharomyces cerevisiae* (L1), **L2:** Inóculo 2 con *Saccharomyces cerevisiae* (L2), **FNAM:** Fermentación Natural Almacenada en el Mes correspondiente (0 al 6) con sus duplicados.

La dinámica de la población de *Saccharomyces cerevisiae* para los tratamientos inoculados (L1 y L2), cambian con respecto al perfil de la FN, ya que en este perfil se colocaron en el primer y último carril el ADN amplificado de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (L1) proporcionadas por la empresa Danstar, esto para observar y relacionar la dinámica de *Saccharomyces cerevisiae* con respecto a los 6 meses de almacenamiento en los granos de café.

Como se muestra a continuación (Figura 23), el perfil de DGGE de la primera muestra inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L1), se observan desde el segundo carril hasta el penúltimo carril, con bandas de baja y alta intensidad sigue presente la levadura inoculada como L1 (*Saccharomyces cerevisiae*), pudiendo notar que esta levadura se adaptó perfectamente bien a las condiciones de fermentación, secado y almacenamiento que duró 6 meses, y da una perspectiva de que esta levadura es resistente a diferentes condiciones que pudieran ocurrir durante el almacenamiento,

debido a que durante el almacenamiento se tuvieron cambios de temperatura y humedad relativa, ya que estos parámetros no se controlaban y a pesar de esto, el inóculo L1 siguió presente. Se puede resaltar también en este perfil que en los carriles marcados como L1AM5 se observa la presencia de una especie diferente a la muestra predominante de este tratamiento. Esta especie ya se había observado en el perfil de DGGE de la fermentación natural (FN), mostrando que se adaptó no solo a las condiciones de almacenamiento, si no también, pudo persistir a pesar de que L1 era la dominante en este tratamiento.

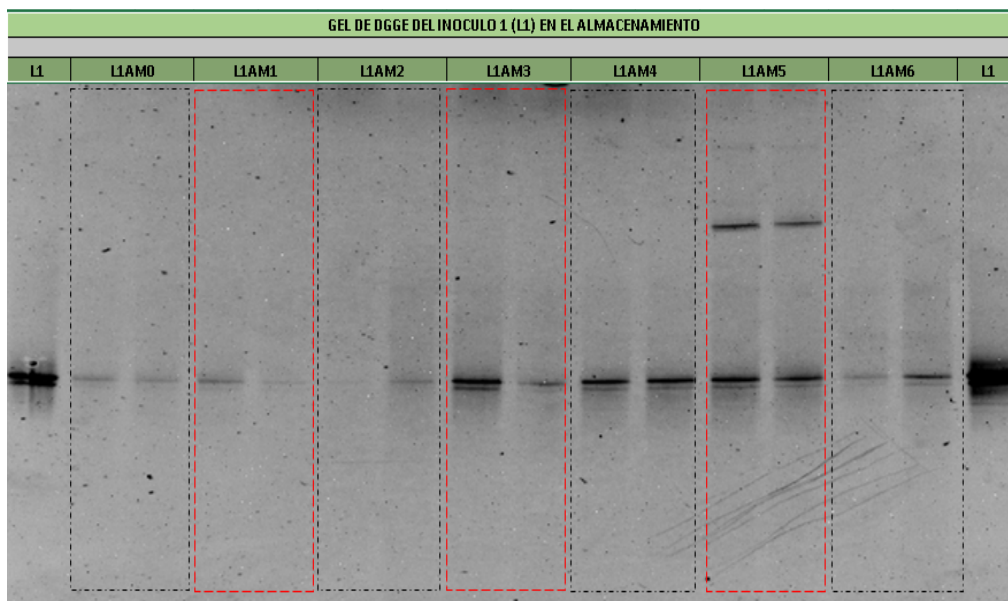


Figura 23. Perfil DGGE del seguimiento en el almacenamiento de la primera cepa inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L1).

L1: Inóculo 1 con *Saccharomyces cerevisiae* (L1) con su duplicado, **L1AM:** Muestra Inoculada 1 con cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (L1) Almacenada en el Mes correspondiente (0 al 6) con sus duplicados.

En el perfil de DGGE para el inóculo con *Saccharomyces cerevisiae* (L2), se colocó en el primero y último carril el ADN amplificado de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (L2) proporcionada por la empresa Danstar, esto para observar y relacionar la

dinámica de *Saccharomyces cerevisiae* con respecto a los 6 meses almacenamiento en los granos de café.

A continuación, se muestra (Figura 24) el perfil de DGGE del inóculo con *Saccharomyces cerevisiae* (L2), se observó que, desde el segundo carril hasta el penúltimo carril, con bandas de baja y alta intensidad sigue presente la levadura inoculada con L2 (*Saccharomyces cerevisiae*), se puede apreciar que esta levadura se pudo adaptar a las condiciones de la fermentación, secado y almacenamiento durante los seis meses que duró la investigación. Sin embargo, ésta presenta bandas de baja intensidad a diferencia de L1, una explicación de esto es que L2 no se pudo adaptar como L1. Esto se puede atribuir a las condiciones no controladas en el almacén (temperatura y humedad relativa), debido a que no le favorecieron a L2 como a L1, que demostró ser más resistente y más adaptable. Sin embargo, es importante resaltar que en este perfil no solo se muestra presencia de L2, si no también, la presencia de otras especies nativas de levaduras que se mostraron en el perfil DGGE de la FN, como se pudo observar en los carriles 3 al 11 y resaltando el carril 3, donde se observó dos especies diferentes al inóculo L2.

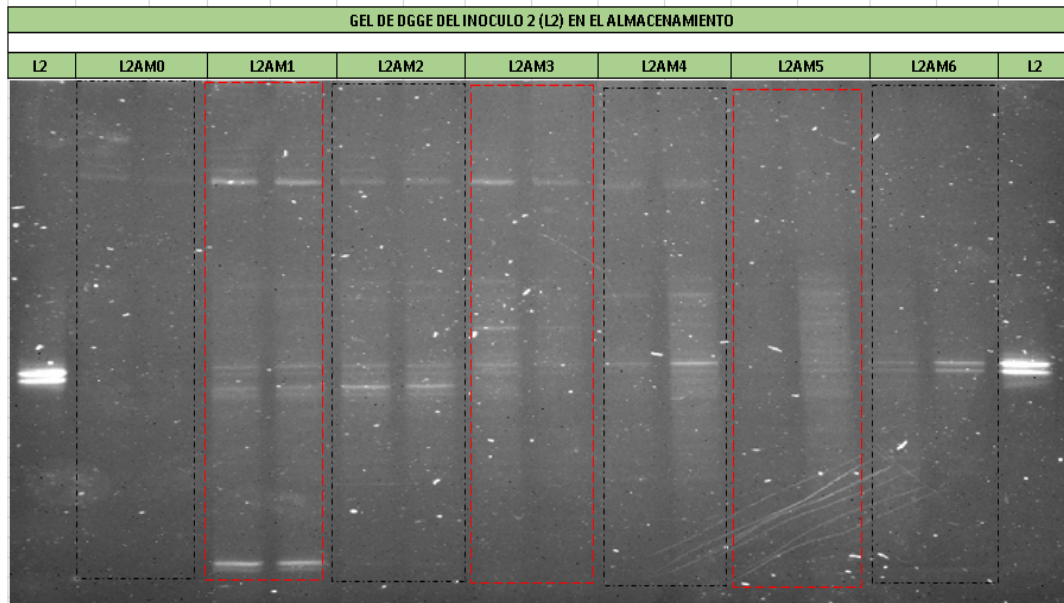


Figura 24. Perfil DGGE del seguimiento en el almacenamiento de la segunda muestra inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* (L2).

L2: Inóculo 2 con *Saccharomyces cerevisiae* (L2) con su duplicado, **L2AM:** Muestra Inoculada 2 con cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (L2) Almacenada en el Mes correspondiente (0 al 6) con sus duplicados.

Dando un panorama más amplio de estos tres perfiles observados, se puede hacer una comparación entre ellos, debido a que se demuestra que las levaduras permanecen a pesar del paso del tiempo, unas se adaptaron a las condiciones de competencia de nutrientes, factores ambientales que ocurren durante el almacenamiento (temperatura y humedad relativa); mientras que otras se ven afectadas por estos parámetros. Un factor que pudo ayudar a la conservación de estas levaduras es el tipo de empaque donde fue almacenado (sacos de polipropileno), y el pergamino que ayuda a que las levaduras permanezcan por tiempos más prolongados. Esto se puede comprobar con los resultados obtenidos por Broissin *et al.* (2017), obtuvo que el grupo de los *Saccharomycetales* se encuentra predominantemente en CPS (café pergamino almacenado en sacos de yute) y CPM (café pergamino almacenado en saconas de polipropileno), mostrando que las especies xerófilas

presentan una adaptación y propagación en la superficie del grano, esto debido a la adaptación a nivel de la pared celular, el cual indica una de las funciones más importantes para el éxito del crecimiento a bajas actividades de agua, el grupo de los Saccharomycetales disminuye en CVS (Café verde almacenado en sacos de yute) y CVM (Café verde almacenado en saconas de polipropileno).

Algunas especies de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran solo en algunas etapas de procesamiento, como por ejemplo cereza recién cosechada y después de 144 h de fermentación (Marques *et al.*, 2010). Sin embargo, se demostró que las levaduras no solo pueden permanecer 144 horas después de la fermentación, sino que también pueden permanecer hasta después del almacenamiento, y que no solo pueden estar presentes en ciertas etapas del procesamiento, sino que también después de la postcosecha.

6.3.2.9 Estudio de la fracción volátil del café verde por micro-extracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME-GC-FID)

En esta sección se presenta los resultados obtenidos del análisis de la fracción volátil de los tres tratamientos en café verde, el cual se realizó mediante cuatro etapas:

1. Etapa de micro-extracción en fase sólida a muestras en el espacio de cabeza del café verde.
2. Separación cromatográfica de los VOC's extraídos por medio de la técnica HS-SPME.
3. Identificación de los VOC's de las muestras obtenidas.
4. Cualificación de las notas odoríficas de cada muestra.

La técnica utilizada en este estudio fue micro-extracción en fase sólida a muestras en el espacio de cabeza del café verde (HS-SPME-GC-FID) de los tres tratamientos, fermentación natural (FN), fermentación con *S. cerevisiae* (L1) y fermentación con *S. cerevisiae* (L2), siguiendo la metodología de González-Ríos *et al.* (2007), detallada en la sección de materiales y métodos.

En las figuras 25, 26 y 27 se muestran los cromatogramas del espacio de cabeza de café verde obtenidos de los tres tratamientos; para la FN el cromatograma representa el mes 0 de almacenamiento, el cromatograma para el tratamiento L1 es el mes 3 de almacenamiento y para el tratamiento L2 es el cromatograma del último mes de almacenamiento (mes 6).

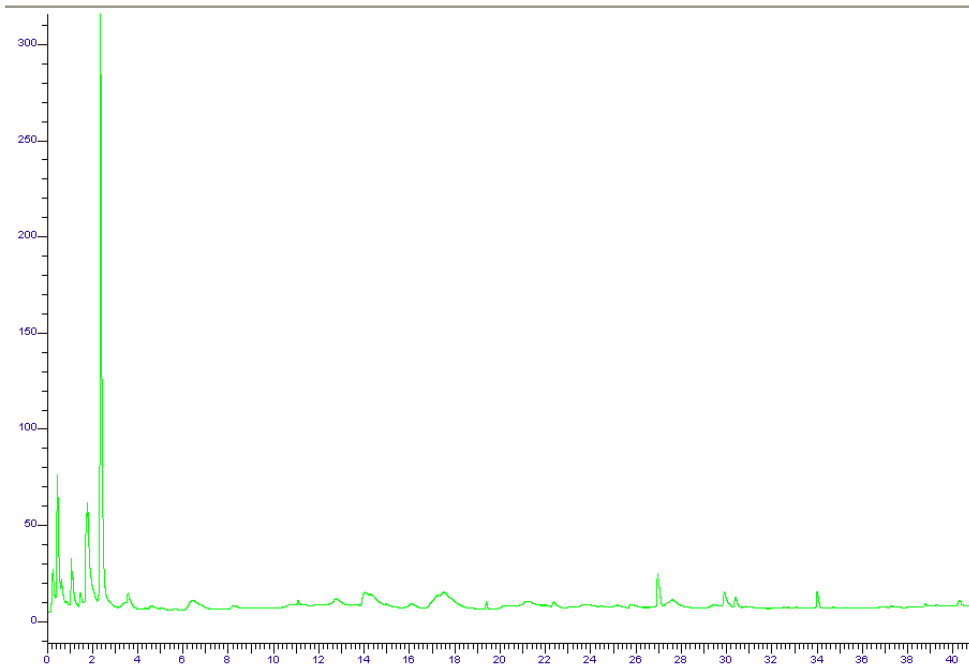


Figura 25. Cromatograma del espacio de cabeza de café verde obtenido por fermentación natural (FN).

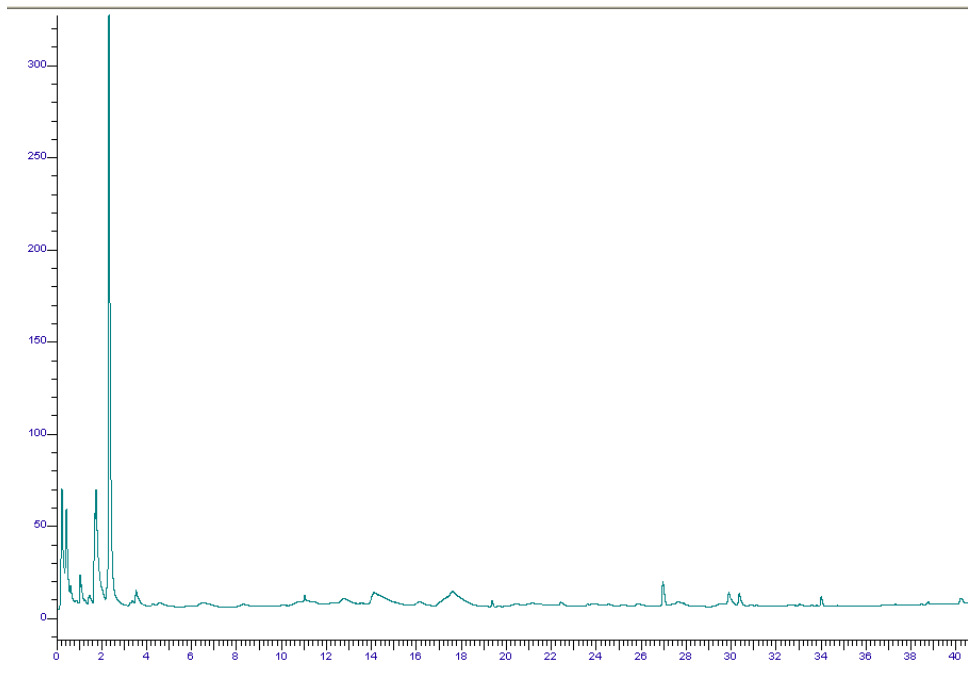


Figura 26. Cromatograma del espacio de cabeza de café verde obtenido por fermentación con *S. cerevisiae* L1.

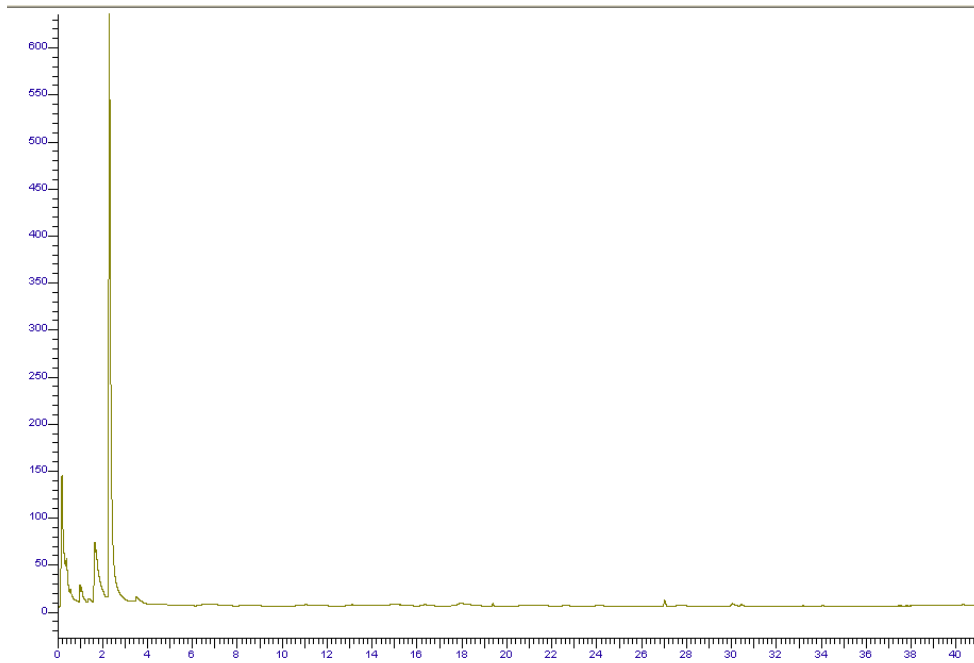


Figura 27. Cromatograma del espacio de cabeza de café verde obtenido por fermentación con *S.cerevisiae* L2

En la Tabla 16 se presenta la identificación de 59 compuestos orgánicos volátiles (VOC's) obtenidos por medio de la técnica HS-SPM-GC-FID en café verde en los tres tratamientos estudiados (FN, L1 y L2).

Tabla 16. Compuestos presentes en el café verde (59) proveniente de los tratamientos FN, L1 y L2

No.	Compuesto ^a	Ri ^b	No.	Compuesto ^a	Ri ^b
1	2-propanona	806	31	Ácido acético	1459
2	Acetato de metilo	826	32	1-Octen-3-ol	1460
3	4-metil octano	852	33	heptanol	1478
4	2,4-dimetil heptano	874	34	benzaldehído	1511
5	Acetato de etilo	887	35	ácido propanoico	1547
6	2-metil butanal	910	36	2,3-butanodiol	1549
7	3-metil butanal	911	37	5-metilfurfural	1562
8	2-butanona	913	38	dimetilsulfóxido	1570
9	Pentanal	990	39	γ-valerolactona	1594
10	2-butanol	1023	40	γ-valerolactona	1597
11	propanol	1033	41	γ-butirolactona	1602
12	Tolueno	1049	42	ácido butanoico	1634
13	isovalerato de etilo	1056	43	4-Metil Benzaldehido	1635
14	hexanal	1096	44	alcohol furfuril	1656
15	alcohol isobutilico	1102	45	Ácido isovalérico	1671
16	2-pentanol	1118	46	Ácido hexanoico	1830
17	etilbenceno	1126	47	2,4 Dimetilbenzaldehido	1853
18	1-metil pirrol	1133	48	Guaiacol	1861
19	1,3-dimetil benceno	1135	49	alcohol de bencilo	1879
20	1-butanol	1168	50	2-fenil etanol	1911
21	Piridina	1183	51	Maltol	1958
22	alcohol isoamílico	1211	52	2-acetil pirrol	1966
23	2-pentil furano	1235	53	fenol	1983
24	1-pentanol	1254	54	γ-decalactona	2104
25	3-hidroxi-2-butanona	1289	55	4-vinil guaiacol	2173
26	3-metil-2-buten-1-ol	1328	56	γ-Undecalactone	2192
27	1-hexanol	1351	57	Ácido decanoico	2227
28	Nonanal	1391	58	Ácido benzoico	2430
29	1,3-dicloro benceno	1439	59	5-hidroxi 2-metilfurfural	2512
30	Furfural	1456			

^a Compuesto asociado al Índice de Kovacs según González-Ríos et al, 2007.

^b Índice de Kovacs experimental de café verde calculado a partir de la columna capilar DB-WAX (J&W scientific)

La cantidad de VOC's identificados en este estudio se observa un número considerable de estos, en comparación con estudios realizados por el método de extracción HS-SPME e utilizando inóculos, que han identificado entre 33 y 62 VOC's, de los cuales los más destacados son los aldehídos que se generan a partir de la remoción del mucilago de café y que son precursores importantes de compuestos aromáticos tales como alcoholes superiores y ésteres. Se tiene conocimiento de que las familias más importantes en la fracción volátil de los granos de café verde son alcoholes, ácidos, aldehídos y cetonas; sin embargo, en este estudio no solo se identificaron los antes mencionados, sino también lactonas, compuestos derivados del benceno, alcanos, furanos y ésteres.

En la Tabla 17 se presentan el número de VOC's distribuidos por familias químicas para cada tratamiento (FN, L1 y L2), observando que las familias que más se detectaron en este trabajo fueron alcoholes, ácidos y aldehídos. Es importante mencionar que, de los tres tratamientos, L2 fue el que obtuvo menor número de VOC's (24) en comparación con los otros tratamientos.

Tabla 17. Distribución por especie química de los compuestos orgánicos volátiles identificados en café verde de los tres tratamientos estudiados: fermentación natural (FN), levadura 1 (L1) y levadura 2 (L2).

Familia	FN	L1	L2
Alcoholes	12	14	9
Ácidos	5	5	5
Aldehídos	3	3	2
Lactonas	2	2	1
Com. de benceno	2	2	2
Furanos	1	1	1
Alcanos	1	1	0
Fenoles	1	1	1
Com. sulfurados	1	1	1
Ésteres	1	0	1
Total de compuestos	29	29	24

En las Tablas 18, 19 y 20 se presenta la distribución de las tres familias químicas que más se detectaron en este estudio: alcoholes, ácidos y aldehídos por cada tratamiento, observando el equilibrio de cada tratamiento con respecto a cada VOC's, y mostrando que en los ácidos es donde los tres tratamientos tienen el mismo balance en VOC's.

Tabla 18. Alcoholes identificados en café verde de cada tratamiento.

Alcoholes		
FN	L1	L2
2-butanol	2-butanol	2-butanol
propanol	propanol	propanol
alcohol isobutílico	alcohol isobutílico	2-pentanol
2-pentanol	2-pentanol	alcohol isoamílico
alcohol isoamílico	alcohol isoamílico	1-pentanol
1-pentanol	1-pentanol	1-hexanol
3-metil-2-buten-1-ol	3-metil-2-buten-1-ol	3-metil-2-buten-1-ol
1-hexanol	1-hexanol	heptanol
heptanol	heptanol	alcohol de bencilo
2,3-butanediol	2,3-butanediol	
alcohol furfurílico	alcohol furfurílico	
alcohol de bencilo	alcohol de bencilo	

Tabla 19. Ácidos identificados en café verde de cada tratamiento.

Ácidos		
FN	L1	L2
ácido acético	ácido acético	ácido acético
ácido propanoico	ácido propanoico	ácido propanoico
ácido butanoico	ácido butanoico	ácido butanoico
ácido hexanoico	ácido hexanoico	ácido hexanoico
ácido decanoico	ácido decanoico	ácido decanoico

Tabla 20. Aldehídos identificados en café verde de cada tratamiento.

Aldehídos		
FN	L1	L2
hexanal	hexanal	hexana
nonanal	nonanal	benzaldehído
benzaldehído	benzaldehído	

En estudios realizados sobre la utilización de cultivos iniciadores utilizando *S. cerevisiae* se ha reportado la formación de compuestos como aldehídos (acetaldehídos, hexanal, octanal, nonanal, butiraldehído); alcoholes (metanol, 1-propanol, 1-pentanol, 2-heptanol, 3-metil-1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-butanol) y cetonas (2-3-butanodiona, 2-pentanona, 2-hexanona, 2-octanona, 2-nonanona). Sin embargo, el conjunto de estos compuestos no solo da notas agradables si no también desagradables. La adición de cultivos iniciadores ayuda a controlar el proceso de fermentación, asegurando así la formación de aromas y sabores deseables, y estos compuestos pueden ser formados en diferentes cantidades, lo que aumenta la posibilidad de producir cafés de buena calidad; es importante también conocer no solo la cantidad de estos sino su abundancia relativa (Reis *et al.*, 2015, Reis *et al.*, 2014, de Melo *et al.*, 2015, Silva *et al.*, 2017).

En la Figura 28 se muestran el contenido de las 10 familias químicas de los VOC's en café verde obtenidas de los tratamientos FN, L1 y L2.

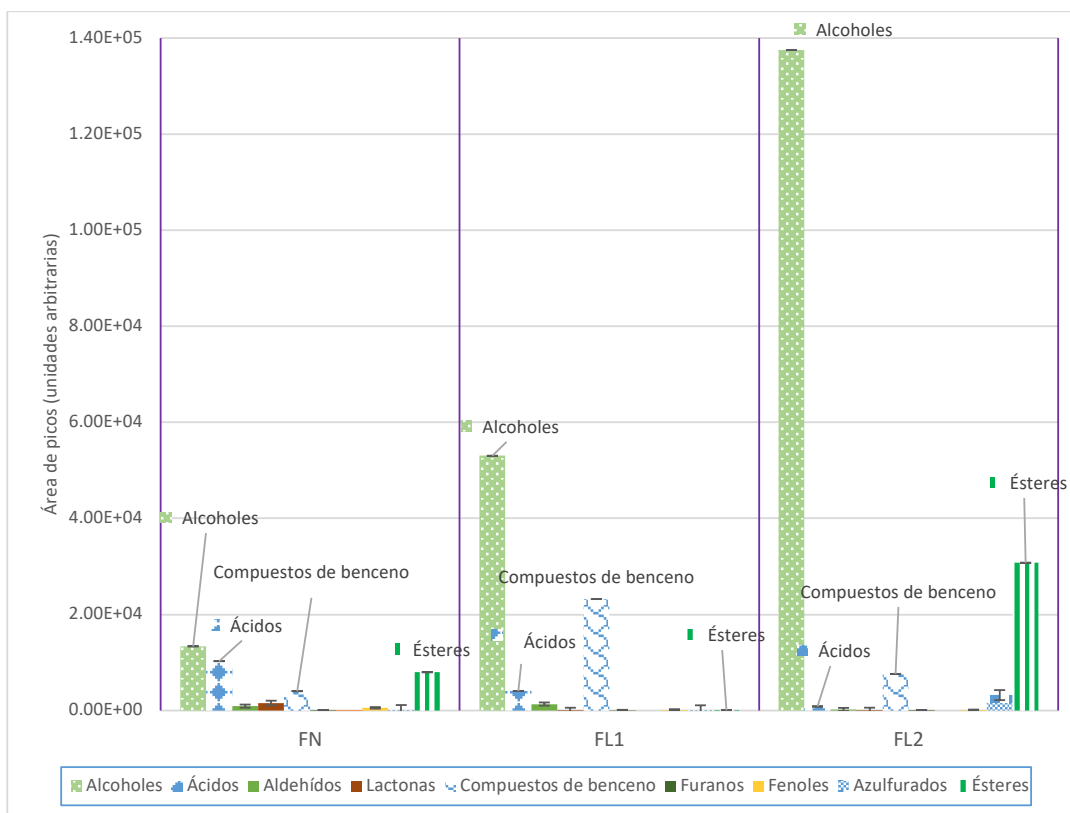


Figura 28. Diferentes clases químicas de los VOC's en café verde producidos en los tratamientos FN= fermentación natural; L1= levadura 1; L2= levadura 2.

En esta figura se puede observar que los perfiles aromáticos para cada tratamiento son diferentes. Las principales diferencias se presentan en los alcoholes, ésteres, ácidos y compuestos de benceno. El perfil aromático en la FN se caracteriza por una baja cantidad de alcoholes, ésteres y compuestos de benceno y un alto contenido en alcoholes en comparación con los otros tratamientos. Este comportamiento puede ser debido a la presencia de las bacterias ácido lácticas, y al tipo de fermentación, que permitió que se dieran las condiciones de aerobiosis en este tratamiento.

La fracción volátil en café verde del tratamiento L2 se caracterizó por un alto contenido en alcoholes y ésteres, y un bajo contenido de ácidos; es importante destacar que en este tratamiento sólo se detectaron nueve alcoholes (Tabla 18). Para la fracción volátil

del tratamiento L1 se observó una cantidad equilibrada de alcoholes y ácidos, y una mayor cantidad de compuestos de bencenos en comparación con los otros tratamientos.

En la Tabla 21 se presenta el olor de las notas de los compuestos identificados en café verde de cada tratamiento, esto para observar y analizar el impacto global que estas tienen en cada uno de los tratamientos.

Tabla 21. Notas aromáticas de los compuestos identificados en café verde.

Compuesto identificado	Nota de Referencia	Olor de la nota	Compuesto identificado	Nota de Referencia	Olor de la nota
1,3-dicloro benceno	desagradable	desagradable	ácido butanoico		mantequilla
1,3-dimetilbenceno	desagradable	desagradable	ácido decanoico	rancio	rancio
1-butanol	penetrante	agradable	dimetilsulfóxido	vegetales , repollo	repollo
1-hexanol	hierva	pasto	acetato de etilo	afrutado	afrutado
1-metil pirrol	leñoso, madera	amaderado	benceno de etilo	desagradable	desagradable
1-Octen-3-ol	terroso, herbáceo	herbáceo	isovalerato de etilo	afrutado	afrutado
1-pentanol		verde	furfural	almendra, amarga	amargo
2,3-butanodiol	mantecoso, desagradable	desagradable	alcohol furfúrico	quemado	quemado
2,4 dimetilbenzaldehído	penetrante	penetrante	guayacol	quemado, dulce	quemado
2,4-dimetil heptano	penetrante	penetrante	g-valerolactona	dulce	chocolate
2-acetil pirrol	rancio	rancio	heptanol	desagradable	desagradable
2-butanol	solvente	amargo	hexanal	afrutado / verde	verde
2-butanona	dulce	dulce	ácido hexanoico		amargo
2-metilbutanal	cacao	chocolate	alcohol isoamílico	afrutado	platano
2-pentanol	agradable	fruta verde	alcohol isobutílico	desagradable	desagradable
2-pentil furano	afrutado	afrutado	ácido isovalérico	desagradable	desagradable
2-fenil etanol	Floral	Floral	malto	Mermelada	dulce
2-propanona	penetrante, dulce	limón	acetato de metilo	agradable	agradable
3-hidroxil-2-butanona	mantecoso	mantecoso	nonanal	floral	limón
3-metilbutanal	afrutado	melocoton	pentanal	afrutado	bayvas
3-metil-2-buten-1-ol	afrutado	afrutado	fenol	desagradable	desagradable
4-metil benzaldehído	afrutado	cereza	ácido propanoico	penetrante	acre
4-metil octano	penetrante	penetrante	propanol	penetrante	quemado
4-vinil guaiacol	clavo	amargo	piridina	quemado	quemado

Resultados y discusión

5-hidroxi 2-metilfurfural	caramelo	caramelo	Tolueno	solvente	amargo
5-metilfurfural	caramelo	caramelo	Y-butirrolactona	agradable	agradable
ácido acético	agrio	agrio	Y-decalactona	afrutado	coco
benzaldehído	almendra, amarga	amargo	Y-undecalactona	afrutado	melocoton
ácido benzoico	agrio	vinagre	Y-valerolactona	herbáceo	herbáceo
alcohol de bencilo	afrutado	cereza			

En la Tabla 22 se presenta la suma de las áreas relativas (unidades arbitrarias) de los VOC's que aportan notas olfativas que se detectaron en las muestras de café verde en cada tratamiento. Se puede observar que cada tratamiento presenta notas olfativas específicas y variadas (acre, agradable, agrio, amaderado, caramelo, chocolate, limón). El tratamiento L1, como se puede observar en la Figura 29, es el que tuvo mejores notas olfativas destacando los aromas afrutados, chocolate, limón y penetrantes, en comparación con los otros dos tratamientos.

Tabla 22. Áreas relativas de los VOC's que aportan las notas olfativas en las muestras de café verde.

Nota ^a	Compuestos ^b	Tratamientos ^c		
		FN	L1	L2
Acre	1	3.60E+01	0	0
Afrutado	12	1.41E+04	2.28E+06	4.27E+03
Agradable	3	0	1.44E+03	3.02E+05
Agrio	2	2.31E+03	0	0
Amaderado	1	0	7.34E+02	0
Amargo	6	8.42E+04	4.37E+02	7.30E+01
Caramelo	2	0	1.05E+02	9.58E+01
Chocolate	2	0	1.27E+06	4.24E+01
Desagradable	8	1.69E+04	1.31E+02	2.23E+01
Dulce	2	0	1.65E+03	2.73E+04
Floral	1	0	0	3.09E+03
Herbáceo	2	1.56E+03	0	0
Limón	2	0	1.37E+06	0
Mantecoso	1	7.69E+03	0	0
Mantequilla	1	0	1.05E+03	0
Penetrante	3	2.37E+02	3.13E+05	1.20E+05
Quemado	4	5.75E+03	7.54E+03	3.57E+03
Rancio	2	5.69E+02	0	0
Vegetal	1	1.14E+02	0	0
Verde	3	7.02E+03	1.01E+04	6.48E+04
Total	59			

^a Media de picos de dos ensayos (unidades arbitrarias)

^b Número de compuestos con nota aromática similar

^c Suma de las áreas de los picos de los compuestos con nota aromática similar (unidades arbitrarias)

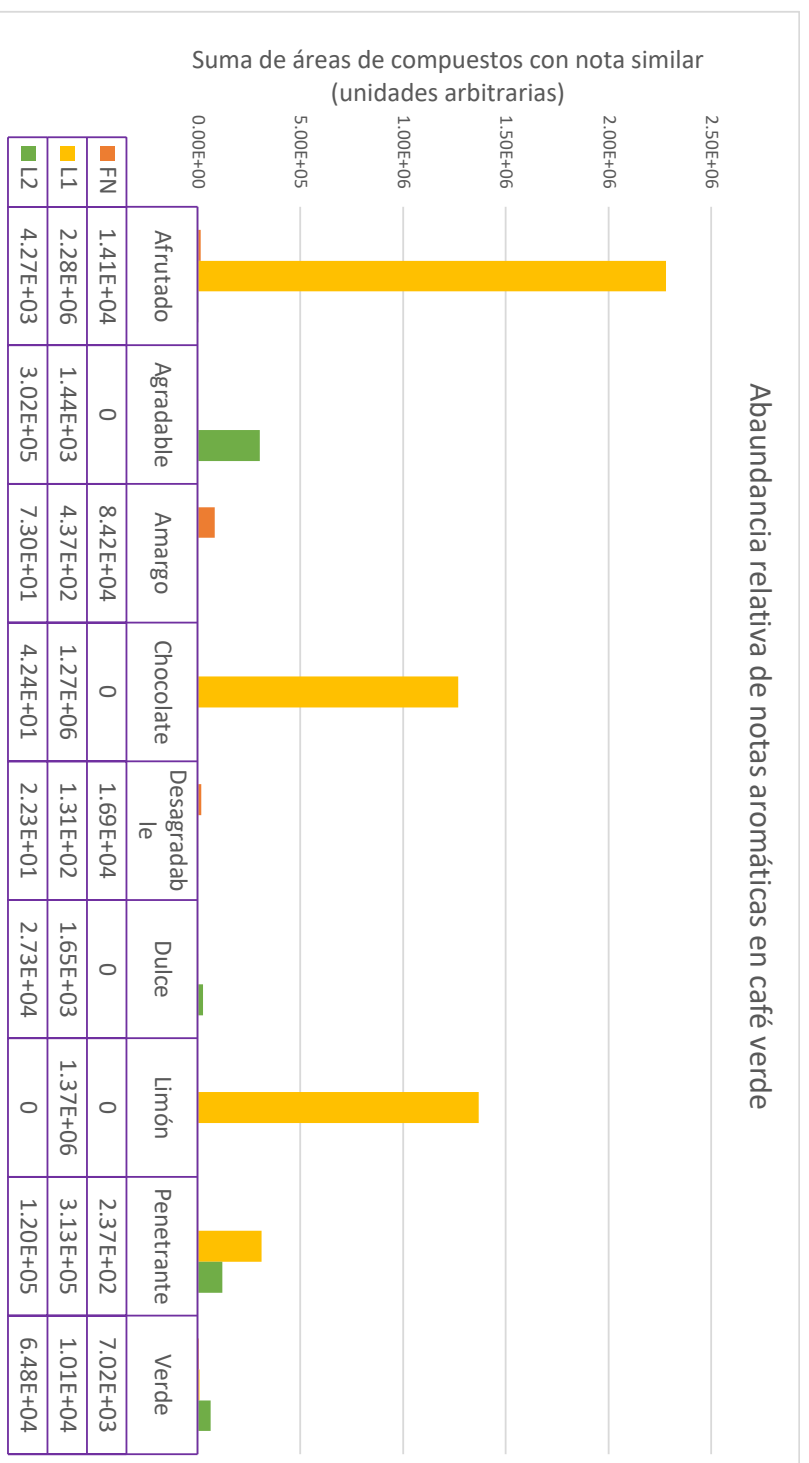


Figura 29. Cualificación odorífica de la fracción volátil en muestras de café verde obtenida de los tratamientos aplicados durante la fermentación (FN, L1 y L2)

6.3.2.10 Evolución del perfil de los VOC's en café verde durante el almacenamiento

En la Figura 30 se presenta la evolución de la fracción volátil para cada una de las familias químicas de los VOC's identificados en el café verde durante un periodo de almacenamiento de seis meses (mes 0 hasta el mes 6) para los tres tratamientos en estudio FN, L1 y L2. Se observó que la familia química que más tuvo variación durante los seis meses de almacenamiento para los tres tratamientos (FN, L1 y L2) fueron los alcanos. Las familias químicas que no variaron significativamente durante los 6 meses de almacenamiento fueron alcoholes, ácidos, aldehídos y lactonas.

Por otro lado, se observa que las áreas relativas de los compuestos que tienen un impacto en taza (alcoholes, ácidos y aldehídos) se mantienen durante los seis meses de almacenamiento; se muestra en este trabajo que el poder odorífero (bajas concentraciones/alto nivel de percepción) contribuye a las notas globales que son características del café verde.

Sin embargo, solamente una pequeña fracción de los cientos de volátiles presentes contribuyen esencialmente a su aroma y sabor y tal aporte no siempre está relacionado directamente a su abundancia.

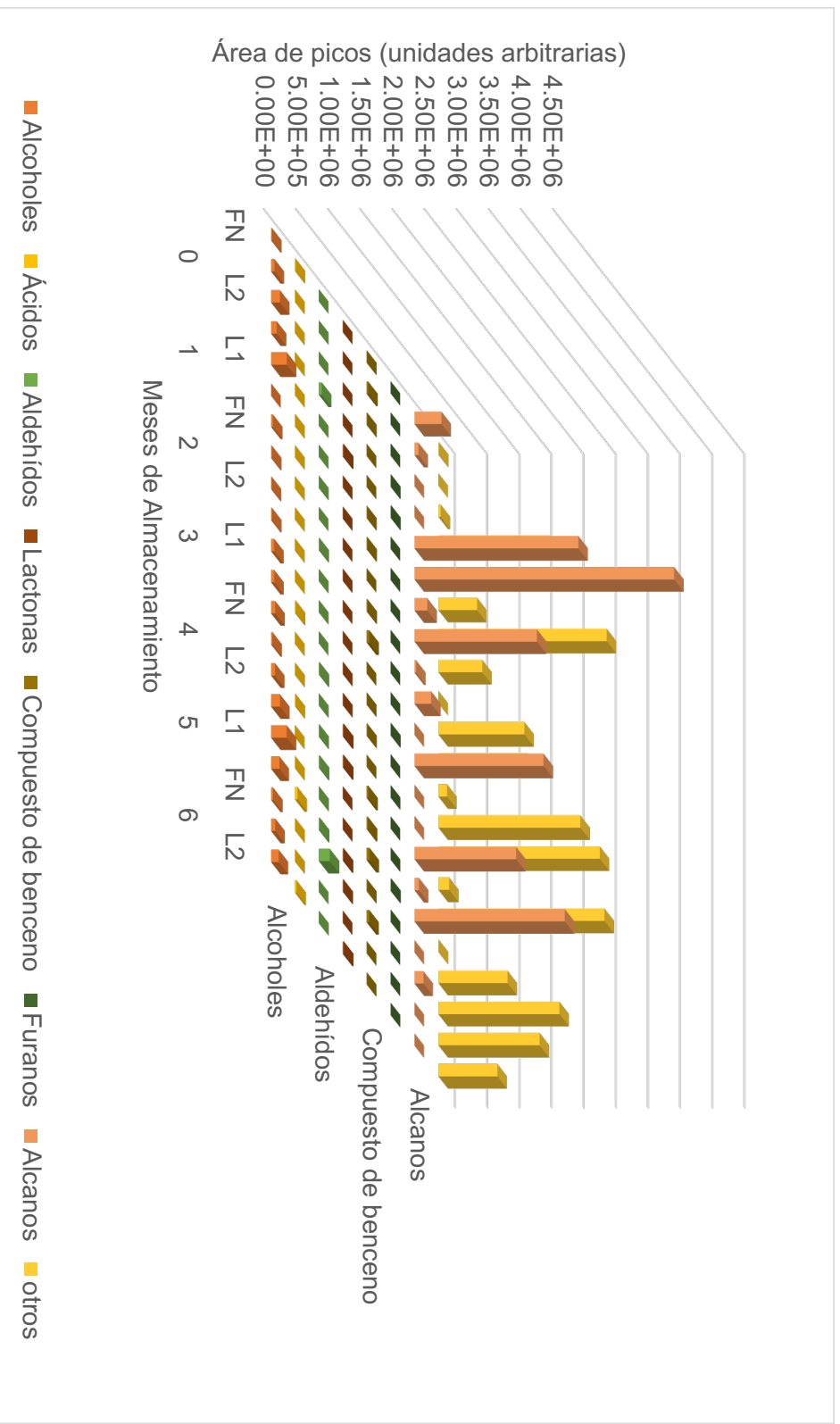


Figura 30. Evolución de la fracción volátil en granos verdes durante el almacenamiento .

6.3.2.11 Estudio de la fracción volátil del café tostado de cada tratamiento aplicado

En esta sección se presentarán los resultados obtenidos de la fracción volátil de los tres tratamientos en café tostado, el cual se realizó mediante cuatro etapas:

1. Etapa de micro-extracción en fase sólida a muestras en el espacio de cabeza de café tostado.
2. Separación cromatográfica de los VOC's extraídos por medio de la técnica HS-SPME en café tostado.
3. Identificación de los VOC's de las muestras obtenidas.
4. Cualificación de las notas odoríficas de cada muestra.

En las figuras 31, 32 y 33 se muestran los cromatogramas del espacio de cabeza de café tostado obtenidos de los tres tratamientos; para la FN el cromatograma representa el mes 0 de almacenamiento, el cromatograma para el tratamiento L1 es el mes 3 de almacenamiento y para el tratamiento L2 es el cromatograma del último mes de almacenamiento (mes 6), observando el aumento de los VOC's al tostar el café.

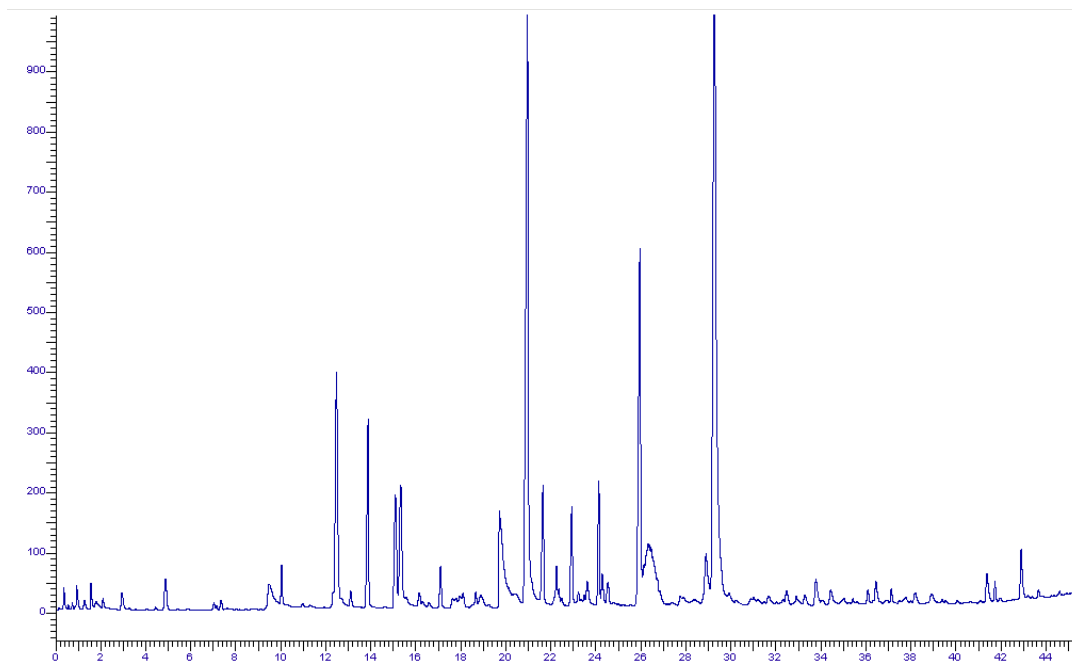


Figura 31. Cromatograma del espacio de cabeza de café tostado obtenido por fermentación natural (FN)

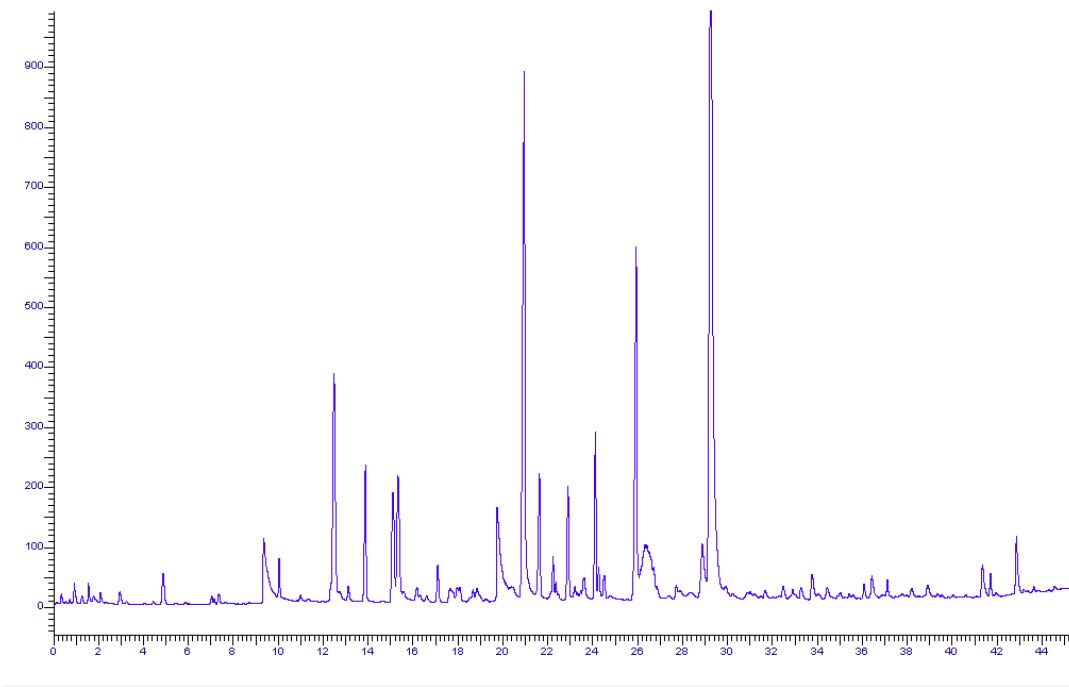


Figura 32. Cromatograma del espacio de cabeza de café tostado obtenido por fermentación levadura 1 (L1)

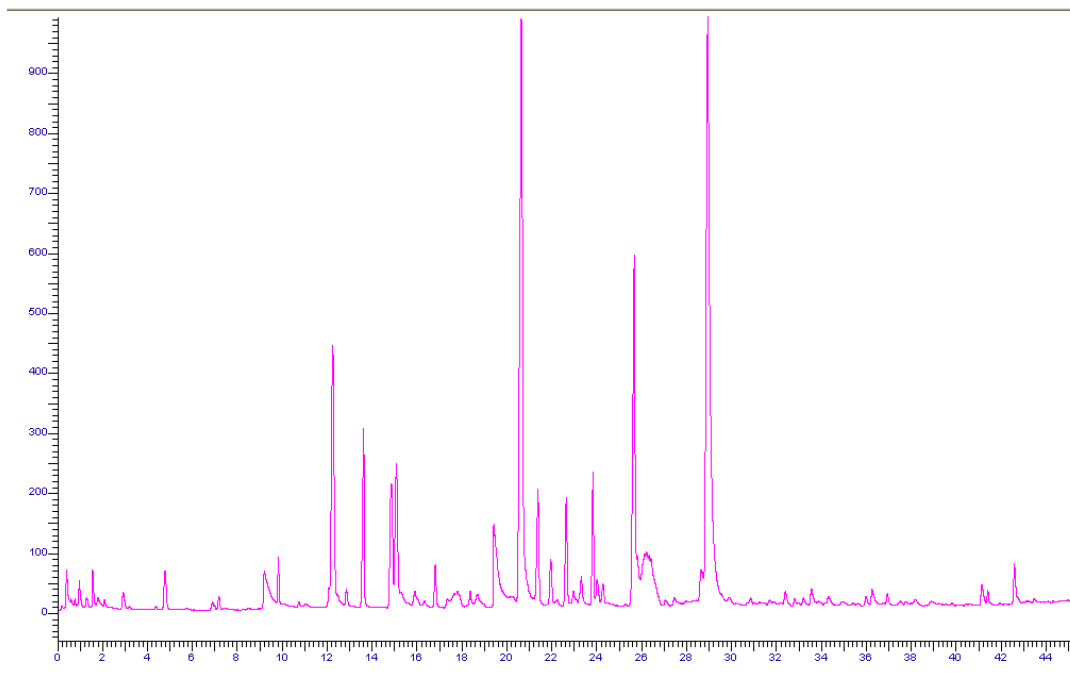


Figura 33. Cromatograma del espacio de cabeza de café tostado obtenido por fermentación levadura 2 (L2)

En la tabla 23 se presentan 86 compuestos orgánicos volátiles (VOC's) identificados en granos de café tostado mediante el uso de la técnica SPME-GC-FID de los tres tratamientos (FN, L1 y L2), utilizando el mismo grado de tostado medio oscuro (MD). Se identificaron el mismo número de compuestos en los tres tratamientos, sin embargo, se observó una diferencia en cantidades extraídas (áreas relativas/unidades arbitrarias) de estos compuestos, debido al tipo de tratamiento postcosecha que se les dio. La mayoría de los compuestos volátiles identificados son derivados de las reacciones de Maillard, pirolisis y otras reacciones químicas que ocurren durante el tostado de café. La técnica de extracción de SPME con la fibra Carboxen / PDMS permitió conseguir una muestra concentrada y libre de otras sustancias que hicieran interferencia durante los análisis de los compuestos orgánicos volátiles en el cromatógrafo.

Resultados y discusión

Tabla 23. Listado de VOC's extraídos e identificados en muestras de café tostado de los tres tratamientos aplicados.

No	Compuesto ^a	Ri ^b	No	Compuesto ^a	Ri ^b
1	2-Metilfurano	868	44	Ácido fórmico	1500
2	2-butanona	908	45	Formiato de furfurilo	1505
3	2-metilbutanal	911	46	Benzaldehído	1506
4	3-metilbutanal	916	47	3-Metil-2-ciclopenteno-1-ona	1507
5	Etanol	933	48	1- (2-furil) -2-propanona	1522
6	2,5-dimetilfurano	963	49	1-acetiloxi-2-butanona	1533
7	2,3-butanediona	974	50	Ácido propanoico	1542
8	Tolueno	1036	51	Acetato de furfurilo	1556
9	2,3-pentanediona	1059	52	5-metilfurfural	1565
10	Isovalerato de etilo	1077	53	2-propionil-furano	1568
11	2,4-dimetil-3-pentanona	1132	54	4-ciclopenteno-1,3-diona	1570
12	2-vinil-5-metilfurano	1150	55	1,2-furfuril-1-propanona	1576
13	Etil-2-butenato	1168	56	Propionato de furfurilo	1597
14	Limoneno	1178	57	2-formil-1-metilpirrol	1603
15	3-metilbutan-1-ol	1208	58	Pirrol	1605
16	Pirazina	1214	59	2-acetilpirazina	1616
17	Piridina	1221	60	Ácido butanoico	1617
18	2-metilpiridina	1222	61	γ-butirolactona	1628
19	Furfuril metil éter	1246	62	1-metilpirrol	1645
20	3-metil-3-buten-1-ol	1257	63	2-Acetil-1-metilpirrol	1646
21	Tiazol	1265	64	1,2- (Furil) -butan-3-one	1652
22	2-Metiltetrahidrofuran-3-ona	1267	65	4-metoxi-bencenamina	1654
23	2-metilpirazina	1272	66	5-Metil-2- (3H) -furanona	1664
24	3-hidroxi-2-butanona	1286	67	Alcohol furfuril	1666
25	1-hidroxi-2-propanona	1304	68	Ácido 3-metilvalérico	1674
26	2,5-dimetilpirazina	1328	69	Ácido isovalérico	1680
27	2,6-Dimetilpirazina	1335	70	2-formiltiofeno	1682
28	2-etilpirazina	1339	71	1- (6-Metil-2-pirazinil) -1-etanona	1685
29	2,3-dimetilpirazina	1345	72	2-etil-4-metil-2,5-furanediona	1710
30	2-Metil-2-ciclopenteno-1-ona	1367	73	Ácido 3-metil-2-butenico	1803
31	1-hidroxi-2-butanona	1370	74	2-hidroxi-3-metil-2-ciclopenteno-1-ona	1829

Resultados y discusión

32	3-etilpiridina	1386	75	2,3-dihidro-5-hidroxi-6-metil-4(H) -piran-4-ona	1847
33	2-etil-6-metilpirazina	1390	76	3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona ó 3-Hidroxi-2metil-4 pirona	1949
34	2-etil-3-metilpirazina	1402	77	Guaiacol	1959
35	2-etil-5-metilpirazina	1417	78	2-acetilpirrol	1969
36	2-vinil-5-metilpirazina	1431	79	Difurfuril éter	1979
37	Ácido acético	1442	80	3-etil-2-hidroxi-2-ciclopenteno-1-ona	1996
38	Furfural	1461	81	2-formilpirrol	2012
39	2,6-dietilpirazina	1466	82	Fenol	2017
40	1-Acetoxi-2-propanona	1479	83	4-etilguaiacol	2026
41	2-furfuril metil sulfuro	1480	84	γ -Decalactone	2131
42	2-Metil-6-vinilpirazina	1494	85	4-vinilguaiaco	2184
43	2-acetilfurano	1497	86	Ácido benzoico	2428

^a Compuesto asociado al Índice de Kovacs según González-Ríos *et al.* (2007).

^b Índice de Kovacs experimental de café verde calculado a partir de la columna capilar DB-WAX (J&W scientific)

En la Tabla 24 se muestran las 14 familias químicas en las que se agruparon los 86 compuestos orgánicos volátiles identificados en las muestras de café tostado de los tratamientos FN, L1 y L2.

Tabla 24. Familias químicas presentes en el café tostado de los tratamientos FN, L1 y L2

Familia Química	Tratamiento		
	FN	FL1	FL2
Cetonas	16	15	14
Pirazinas	8	11	8
Ácidos	7	7	5
Furanos	7	3	4
Ésteres	5	3	5
Alcohol	4	4	2
Fenoles	3	2	2
Pirroles	3	3	3
Piridinas	2	2	1
Hidrocarburos	2	1	1
Lactonas	1	1	2
Aldehídos	1	1	0
Tiazoles	1	1	0
Éter	0	2	0
Total de compuestos Identificados	61	56	47
Desconocidos	5	6	8

Los compuestos mayoritarios fueron las cetonas, pirazinas y furanos; las cetonas y pirazinas se generan a través de las reacciones de Maillard, cuando reaccionan los aminoácidos con los azúcares reductores, mientras que los furanos se generan a través de la caramelización de los azúcares (Figura 34). Estos últimos están ligados a los sabores y aromas a caramelo, cuero y césped en la bebida; mientras que las cetonas y pirazinas están ligadas a sabores y aromas a frutas, nuez, caramelo, manteca, tostadas, leñosas y penetrantes (López-Galilea *et al.*, 2006). En el caso de los otros compuestos, como ácidos y alcoholes, las variaciones que se observan son debido al tipo de postcosecha que se les dio y a la formación de estos mismos durante el tostado.

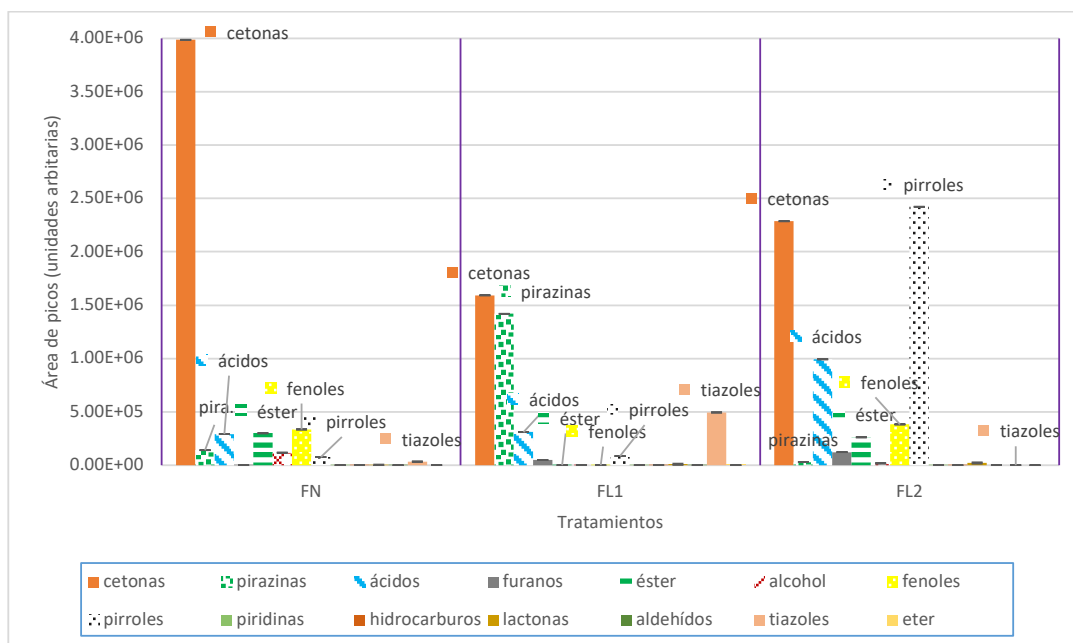


Figura 34. Abundancia relativa de las diferentes familias químicas de los VOC's producidos durante el tostado de granos de café de los tratamientos FN= fermentación natural; L1= levadura 1; L2= levadura 2.

En la Tabla 25 se muestran los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) identificados de las principales familias químicas (cetonas, pirazinas y furanos) en la fracción volátil del café tostado en un tostado medio oscuro (MD) que se obtuvo de los tres tratamientos aplicados (FN, L1 y L2). Se observan diferencias entre los VOC's que constituyeron a cada una de las muestras; cabe señalar la ausencia o la presencia de cada compuesto es un factor que influye en su nota global. Más adelante se presenta y detalla la clasificación de las diferentes notas odoríficas de cada tratamiento. Es importante mencionar que en este trabajo se utilizaron inóculos (levaduras) durante la fermentación L1 y L2, que tuvieron un impacto en las notas globales de cada una de las muestras, así como las notas que presenta la FN debido al impacto que tuvieron las levaduras y bacterias nativas de la muestra.

Tabla 25. VOC's identificados de cetonas, pirazinas y furanos en las fracciones volátiles del café tostado obtenido de los tres tratamientos aplicados.

Cetonas		
FN	L1	L2
1-hidroxi-2-butanona	2,4-dimetil-3-pentanona	2,4-dimetil-3-pentanona
1- (2-furil) -2-propanona	1-hidroxi-2-propanona	3-hidroxi-2-butanona
1-acetiloxi-2-butanona	2-metil-2-ciclopenten-1-ona	1-hidroxi-2-propanona
4-ciclopenten-1,3-diona	1- (2-furil) -2-propanona	1-acetoxi-2-propanona
1,2-furfuril-1-propanona	3-hidroxi-2-butanona	1-acetiloxi-2-butanona
γ -butirolactona	1-hidroxi-2-butanona	1-acetiloxi-2-propanona
1-hidroxi-2-propanona	1-acetoxi-2-propanona	5-metil-2- (3H) -furanona
2-metil-2-ciclopenten-1-ona	1-acetiloxi-2-butanona	2-etil-4-metil-2,5-furanodiona
1-acetoxi-2-propanona	1,2- (furil) -butan-3-ona	2-hidroxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona
2-etil-4-metil-2,5-furanodiona	5-metil-2- (3H) -furanona	2,3-dihidro-5-hidroxi-6-metil-4 (H) -piran-4-ona
2-hidroxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona	2-etil-4-metil-2,5-furanodiona	3-etil-2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona
2,3-dihidro-5-hidroxi-6-metil-4 (H) -piran-4-ona	2,3-dihidro-5-hidroxi-6-metil-4 (H) -piran-4-ona	4-ciclopenten-1,3-diona
3-etil-2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona	3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona	2-butanona
3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona	2,3-butanodiona	2,3-pentanodiona
2,3-butanodiona	2,3-pentanodiona	
2,3-pentanodiona		
Pirazinas		
FN	L1	L2
Pirazina	Pirazina	2,5-dimetilpirazina
2-vinil-5-metilpirazina	2,5-dimetilpirazina	2-etil-6-metilpirazina
2-metil-6-vinilpirazina	2,3-dimetilpirazina	2-etil-3-metilpirazina
2-acetilpirazina	2-etil-5-metilpirazina	2-vinil-5-metilpirazina
2-metilpirazina	2-metilpirazina	2,6-dimetilpirazina
2,6-dimetilpirazina	2,6-dimetilpirazina	2,3-dimetilpirazina
2-etilpirazina	2-etilpirazina	2,6-dietilpirazina
2-etil-6-metilpirazina	2-etil-6-metilpirazina	2-acetilpirazina
	2-metil-6-vinilpirazina	

	2-acetilpirazina	
Furanos		
FN	L1	L2
2-vinil-5-metilfurano	Furfural	5-Methylfurfural
2-metiltetrahidrofurano-3-ona	2-acetilfurano	2-propionil-furano
Furfural	5-Metilfurfural	Furfural
2-acetilfurano		Formiato de furfurilo
Formiato de furfurilo		
2-propionil-furano		
5-Metilfurfural		

Es importante recalcar que las fracciones volátiles del café tostado de los tres tratamientos muestran diferencias tanto en número de VOC's como en sus áreas relativas (unidades arbitrarias).

En la Tabla 26 se muestran las notas aromáticas de cada VOC's identificados en las fracciones volátiles del café tostado para cada tratamiento (FN, L1 y L2). Cada una de estas notas son características del café y tendrán un impacto en la nota global del café tostado.

Tabla 26. Notas aromáticas de los compuestos identificados en café tostado.

Compuesto identificado ^a	Descriptor de Olor ^b	Compuesto identificado ^a	Descriptor de Olor ^b
2-Metilfurano	chocolate	Ácido fórmico	desagradable
2-butanona	dulce	Formiato de furfuriol	floral
2-metilbutanal	chocolate	Benzaldehído	almendras
3-metilbutanal	melocotón	3-Metil-2-ciclopenteno-1-ona	afrutado
Etanol	dulce	1-(2-furil) -2-propanona	Picante
2,5-dimetilfurano	café	1-acetiloxi-2-butanona	desagradable
2,3-butanediona	mantequilla	Ácido propanoico	acre
Tolueno	desagradable	Acetato de furfuriol	a nuez
2,3-pentanediona	mantequilla	5-metilfurfural	caramelo
Isovalerato de etilo	afrutado	2-propionil-furano	afrutado
2,4-dimetil-3-pentanona	agradable	4-ciclopenteno-1,3-diona	desagradable
2-vinil-5-metilfurano	a nuez	1,2-furfuril-1-propanona	café
Etil-2-butenato	afrutado	Propionato de furfuriol	afrutado
Limoneno	cítrico	2-formil-1-metilpirrol	a nuez
3-metilbutan-1-ol	desagradable	Pirrol	tostado
Pirazina	café	2-acetilpirazina	palomitas de maíz
Piridina	quemado	Ácido butanoico	mantequilla
2-metilpiridina	café	γ-butirolactona	dulce
Furfuril metil éter	café	1-metilpirrol	amaderado
3-metil-3-buten-1-ol	desagradable	2-Acetil-1-metilpirrol	café
Tiazol	tostado	1,2-(Furil) -butan-3-one	agradable
2-Metil-tetrahidrofuran-3-ona	a nuez	4-metoxi-bencenammina	desagradable
2-metilpirazina	a nuez	5-Metil-2-(3H) -furanona	cremoso

3-hidroxi-2-butanona	amaderado		Alcohol furfural	dulce
1-hidroxi-2-propanona	a nuez		Ácido 3-metilvalérico	agrío
2,5-dimetilpirazina	chocolate		Ácido isovalérico	agradable
2,6-Dimetilpirazina	chocolate		2-formiltiofeno	agradable
2-etilpirazina	a nuez		1- (6-Metil-2-pirazinil) -1-etanona	café
2,3-dimetilpirazina	a nuez		2-etil-4-metil-2,5-furanediona	café
2-Metil-2-ciclopenten-1-ona	tostado		Ácido 3-metil-2-butenóico	picante
1-hidroxi-2-butanona	Tostado		2-hidroxi-3-metil-2-ciclopenteno-1-ona	afrutado
3-etilpiridina	tostado		2,3-dihidro-5-hidroxi-6-metil-4 (H) -piran-4-ona	caramelo
2-etil-6-metilpirazina	papa		3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona ó 3-Hidroxi-2metil-4 pirona	caramelo
2-etil-3-metilpirazina	a nuez		Guaiacol	quemado
2-etil-5-metilpirazina	a nuez		2-acetilpirrol	rancio
2-vinil-5-metilpirazina	café		Difurfuril éter	café
Ácido acético	agrío		3-etil-2-hidroxi-2-ciclopenteno-1-ona	caramelo
Furfural	almendras		2-formilpirrol	rancio
2,6-dietilpirazina	chocolate		Fenol	desagradable
1-Acetoxi-2-propanona	afrutado		4-etilguaiacol	picante
2-furfuril metil sulfuro	café		γ-Decalactona	afrutado
2-Metil-6-vinilpirazina	a nuez		4-vinilguaiaco	picante
2-acetilfurano	dulce de nuez		Ácido benzoico	agradable

^a Compuesto asociado al Índice de Kovacs según González-Ríos *et al*, 2007.

^b Nota aromática descrita en González-Ríos *et al*, 2007

En la Tabla 27 se presentan las sumas de las áreas relativas (unidades arbitrarias) de los VOC's que aportan las notas olfativas, que se detectaron en cada una de las muestras de café tostado de cada tratamiento. Se observa que cada uno de los tratamientos presenta diferencia en sus notas olfativas tanto las agradables (nuez, afrutado, almendras, caramelo, chocolate, cítrico, floral, tostado, mantequilla y dulce), como las desagradables (picante).

Tabla 27. Cualificación sensorial de las notas aromáticas proporcionadas por los VOC's de las muestras de café tostado de cada tratamiento.

Nota Odorífica ^a	Compuestos ^b	Tratamientos ^c		
		FN	L1	L2
Nuez	11	1.59E+02	6.89E+04	1.71E+06
Acre	1	1.35E+05	0	0
Afrutado	9	1.10E+02	3.26E+05	3.62E+04
Agradable	7	2.03E+04	7.69E+03	1.17E+04
Almendras	2	0	1.39E+04	0
Amaderado	2	0	5.16E+04	6.51E+04
Café	10	4.25E+02	2.51E+06	1.29E+05
Caramelo	5	0	2.58E+05	3.77E+05
Chocolate	5	0	1.97E+05	1.83E+04
Cítrico	1	0	1.54E+03	0
Cremoso	1	0	5.63E+02	0
Desagradable	12	2.26E+05	9.78E+02	2.05E+03
Dulce	4	0	1.46E+04	1.64E+06
Floral	1	0	0	1.20E+05
Mantequilla	3	0	1.14E+05	1.75E+02
Palomitas de maíz	1	1.30E+01	0	0
Papa	1	0	1.90E+02	0
Picante	4	1.57E+05	3.66E+06	5.14E+04
Tostado	5	1.51E+04	2.27E+05	4.32E+03
Quemado	2	3.98E+04	2.78E+01	0
Total	87			

^a Media de picos de dos ensayos (unidades arbitrarias)

^b Número de compuestos con nota aromática similar

° Suma de las áreas de los picos de los compuestos con nota aromática similar (unidades arbitrarias)

En la Figura 35 se observa que L1 fue el tratamiento que tuvo más notas odoríficas agradables, en comparación con L2 y FN. La diferencia de estas notas fue percibida por el panel sensorial, debido a que en el atributo de calidad aromática obtuvo valores mayores a 3.5 de calificación.

Se puede concluir del análisis de fracción volátil, tanto en café verde como en tostado, de los tres tratamientos estudiados (fermentación natural (FN), levadura 1 (L1) y levadura 2 (L2)), se que observaron diferencias marcadas tanto en el número de VOC's, como en la abundancia (área relativa), y principalmente en la generación de diferentes aromas que fueron percibidos por el panel sensorial. El tratamiento L1 fue el que tuvo mejores notas odoríficas tanto en café verde como en café tostado, con respecto a los otros tratamientos (L2 y FN).

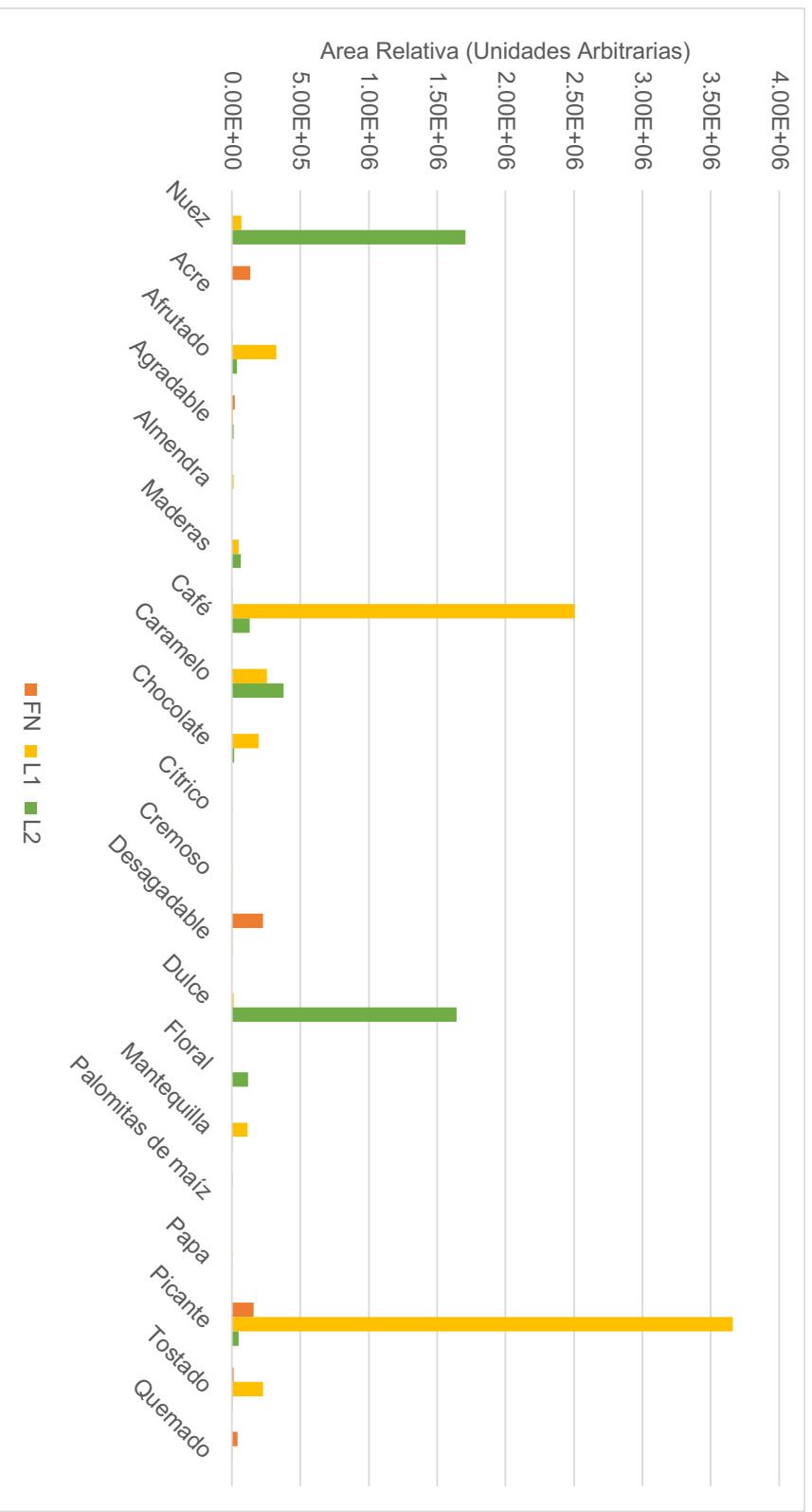


Figura 35. Perfil aromático global de café tostado por tratamiento estudiado (FN= fermentación natural; L1= levadura 1; L2= levadura 2).

6.3.2.12 Evolución de las familias químicas de los VOC's en café tostado durante el almacenamiento

En la Figura 36 se presenta la evolución de los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) en sus diferentes familias químicas en café tostado, durante seis meses de almacenamiento (mes 0 al mes 6) en condiciones ambientales de los tratamientos FN, L1 y L2.

Las familias químicas de los VOC's del café de los tratamientos que no variaron durante el almacenamiento fueron los alcoholes, ácidos, aldehídos, debido a que estas clases químicas presentan altos poderes odoríficos.

Se observó que la familia química que más tuvo variación durante los seis meses de almacenamiento para los tres tratamientos (FN, L1 y L2) fueron los alcanos, desde el primer mes hasta el último mes de almacenamiento. Por otro lado, se observa que las áreas relativas de los compuestos que tienen un impacto en taza (alcoholes, ácidos, aldehídos y lactonas) se mantienen durante los seis meses de almacenamiento; se muestra en este trabajo que el poder odorífero (bajas concentraciones/alto nivel de percepción) contribuye a las notas globales que son características del café tostado.

Solamente una pequeña fracción de los cientos de volátiles presentes contribuyen esencialmente al aroma y sabor, y tal aporte no siempre está relacionado directamente a su abundancia. Se encontró disminución de las áreas relativas de la mayoría de los compuestos odoríficos en los tres tratamientos, y algunos compuestos, como pirazinas y ácidos, aumentaron al finalizar el almacenamiento. Sin embargo, se puede observar que el tratamiento FN fue el que más VOC's perdió durante los 6 meses de almacenamiento en comparación con los otros tratamientos, y esto se vio percibido por el panel sensorial, obteniendo una puntuación menor de 3.2 en su calidad aromática.

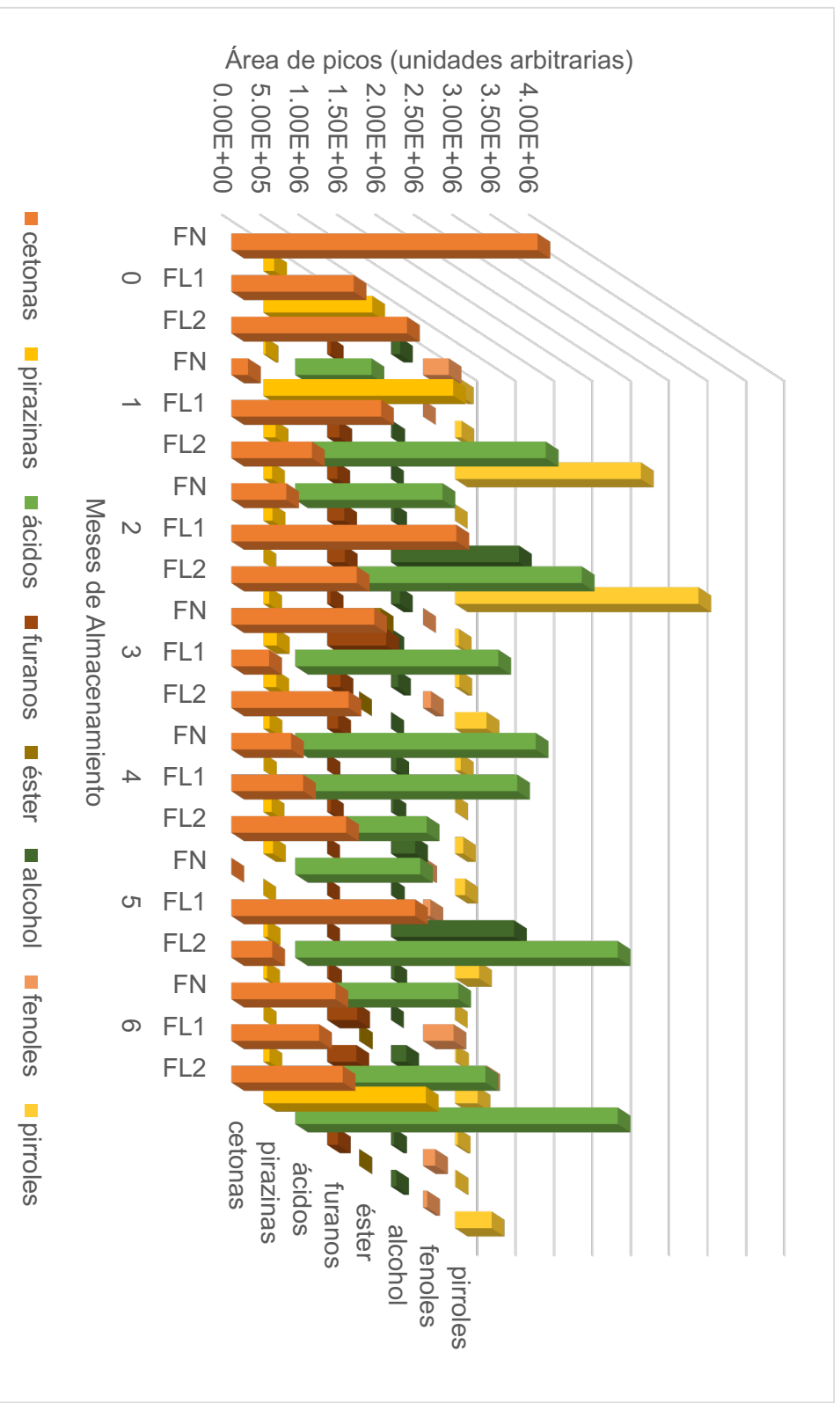


Figura 36. Evolución de la fracción volátil en granos tostados durante 6 meses de almacenamiento.

Resultados y discusión

6.3.2.13 Estudio sensorial del café después de los tratamientos

En la Tabla 28 se presentan las intensidades percibidas por el panel entrenado de las bebidas preparadas con el café tostado, que obtuvo al inicio del estudio (mes 0) para los tres tratamientos aplicados: fermentación natural (FN_{t0}); fermentación inducida con inóculo número 1 (L1_{t0}) y fermentación inducida con el inóculo número 2 (L2_{t0}). Se observa que, de 15 atributos estudiados en taza, los que más resaltan son calidad aromática (Cal-Aromática) con una puntuación de 3.7 y cuerpo con una puntuación de 3.5, principalmente para el tratamiento con el inóculo número 1 (L1_{t0}). Es importante destacar que este tratamiento fue el que obtuvo mayor aceptación por el panel, obteniendo una calificación de 3.3.

Resultados y discusión

Tabla 28. Efecto del microbiota presente en la fermentación sobre las notas sensoriales en la bebida de café al inicio del almacenamiento (Mes 0)

Atributo sensorial:	Fermentación Natural (FN _{t0})	Fermentación con Levadura 1 (L1 _{t0})	Fermentación con Levadura 2 (L2 _{t0})
Int. Aromática	3.2	3.4	3.4
Cal Aromática	3.2	3.7	3.5
Cuerpo	2.6	3.5	3.1
Acidez	3.2	3.5	3.3
Amargor	3.2	3.3	3.5
Astringente	0.6	0.3	0.0
Dulzor	0.8	1.0	0.6
Afrutado	1.4	1.4	0.8
Cítrico	0.9	1.2	1.0
Málico	0.7	0.9	0.8
Áspero	0.3	0.0	0.0
Terroso	0.0	0.0	0.0
Quemado	0.0	0.0	0.0
Fermentado	0.0	0.0	0.0
Agrio	0.0	0.0	0.0
Preferencia	2.6	3.3	2.3

Es importante resaltar que las muestras tratadas con los inóculos de levaduras L1 y L2 fueron las que presentaron mejor equilibrio en la taza en los atributos acidez y amargor. Esto se puede observar en la Figura 38 donde el único atributo destacable de la fermentación natural (FN) es la nota afrutada, lo que puede deberse a la presencia de bacterias lácticas (BAL) durante la fermentación del café y a que la fermentación del café bajo condiciones aerobias permite la generación de ácidos

Resultados y discusión

orgánicos como el ácido cítrico, málico, succínico que, en conjunto, son percibidos como sabor a frutas (Silvetz y Desrosier, 1979). Se puede observar que, las tres bebidas (FN_{t0}, L1_{t0} y L2_{t0}), presentan una taza redonda y de buena calidad.

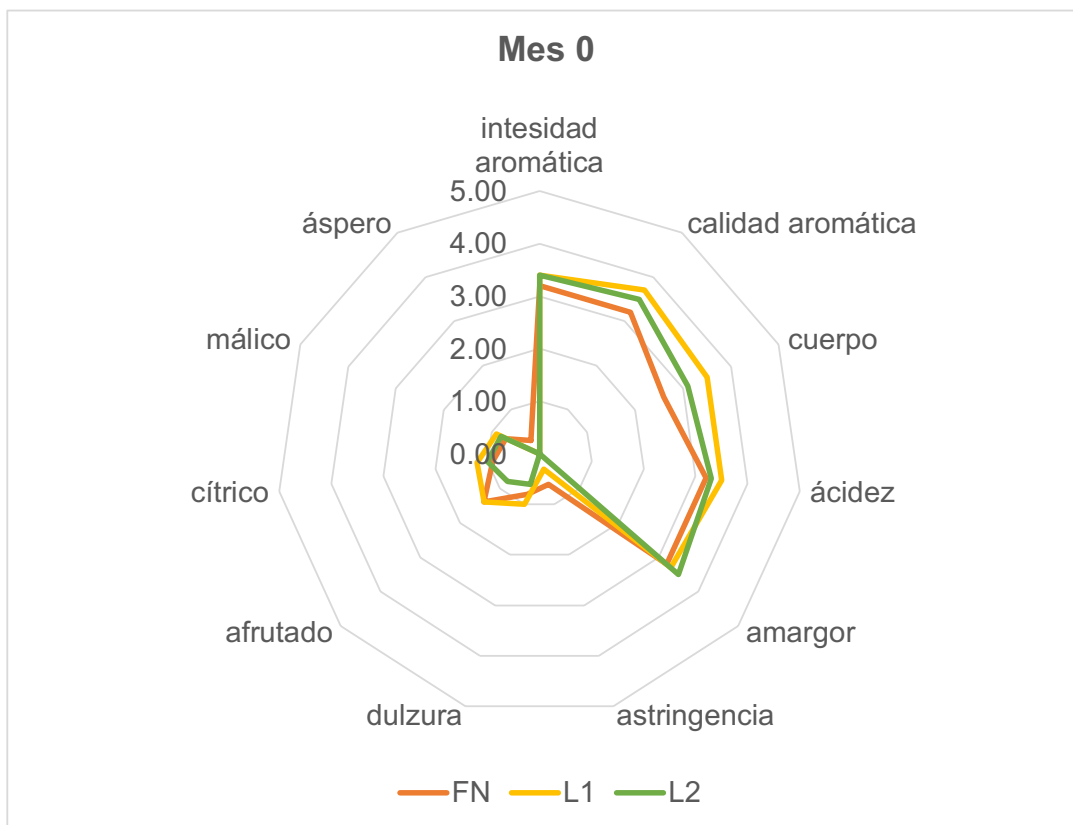


Figura 37. Comparación de 10 criterios favorables de las bebidas de café en el mes de inicio del estudio (fermentación natural= FN_{t0}, levadura 1= L1_{t0} y levadura 2= L2_{t0})

6.3.2.14 Impacto del almacenamiento sobre la calidad sensorial en taza.

En las siguientes Tablas (29 y 30) se presentan las intensidades percibidas por el panel entrenado de las bebidas preparadas con el café tostado, obtenidas del tercer mes (Mes 3) y sexto mes (Mes 6) de almacenamiento para los tres tratamientos aplicados: fermentación natural (FN_{t3} y FN_{t6}); fermentación inducida con inóculo número 1 (L1_{t3} y L1_{t6}) y fermentación inducida con el inóculo número 2 (L2_{t3} y L2_{t6}). Se observa en la Tabla 28 que de los 15 atributos estudiados en taza, los que más resaltan son calidad aromática (Cal-Aromática) con una puntuación de 3.6, y cuerpo

Resultados y discusión

con una puntuación de 3.3, y la que presentó mejor puntuación en estos atributos fue el tratamiento con el inóculo número 1 (L1₁₃) al tercer mes de almacenamiento. Es importante destacar que este tratamiento fue el que obtuvo mayor aceptación por el panel, obteniendo una calificación de 3.1.

Entre los compuestos que dan las notas a chocolate se encuentra el 2-metilfurano, 2-metilbutanal, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina y 2,6-dietilpirazina; las notas afrutadas las otorgan los compuestos Isovalerato de etilo, 2-propionil-furano, etil-2-butenato, propionato de furfurilo y 1-acetoxi-2-propanona; notas a cítricos las dan el limoneno, y las notas florales, el compuesto formiato de furfural; estos son algunos de los compuestos que representan a las notas percibidas por el panel sensorial.

Resultados y discusión

Tabla 29. Efecto del microbiota presente en la fermentación sobre las notas sensoriales en la bebida de café después de tres meses de almacenamiento

Atributo sensorial:	Fermentación Natural (FN _{t3})	Fermentación con Levadura 1 (L1 _{t3})	Fermentación con Levadura 2 (L2 _{t3})
Int-Aromática	3.3	3.6	3.5
Cal-Aromática	3.0	3.2	2.8
Cuerpo	3.0	3.3	2.7
Acidez	3.3	3.2	3.6
Amargor	3.3	3.1	3.3
Astringente	0.0	0.0	0.5
Dulzor	0.8	0.6	0.9
Afrutado	0.8	1.0	0.9
Cítrico	1.0	1.0	1.5
Málico	0.6	0.9	0.7
Áspero	0.3	0.0	0.0
Terroso	0.3	0.0	0.0
Quemado	0.0	0.0	0.0
Fermentado	0.0	0.0	0.0
Agrio	0.0	0.0	0.0
Preferencia	2.6	3.1	2.9

En la Tabla 30 se muestran los 15 atributos sensoriales estudiados en taza a los seis meses de almacenamiento. No se observó alguna variación percibida por el panel. Sin embargo, en la bebida elaborada con café tostado del tratamiento L1_{t6} se observó un pequeño incremento en la nota áspero esto con respecto al mes inicial. Por otro lado, se observó que en los atributos Int-Atomática (intensidad aromática) y Cal-Aromática (calidad aromática), a los seis meses de almacenamiento, hubo una disminución presentándose estos valores inferiores en la bebida elaborada con café tostado del tratamiento FN_{t6}.

Resultados y discusión

Tabla 30. Efecto del microbiota presente en la fermentación sobre las notas sensoriales en la bebida de café después de seis meses de almacenamiento

Atributo sensorial:	Fermentación Natural (FN _{t6})	Fermentación con Levadura 1 (L1 _{t6})	Fermentación con Levadura 2 (L2 _{t6})
Int-Aromática	2.9	3.3	3.5
Cal-Aromática	2.7	3.5	3.2
Cuerpo	2.8	3.6	3.0
Ácidoz	3.2	3.4	3.4
Amargor	3.0	3.1	3.0
Astringente	1.0	0.5	0.3
Dulzor	0.8	0.6	0.7
Afrutado	0.7	0.7	0.5
Cítrico	0.9	0.9	0.9
Málico	0.2	0.3	0.4
Áspero	0.7	0.4	0.3
Terroso	0.3	0.0	0.0
Quemado	0.0	0.0	0.4
Fermentado	0.5	0.0	0.0
Agrio	0.0	0.0	0.0
Preferencia	2.4	3.2	2.7

De manera general , se puede observar que al tercer mes de almacenamiento las bebidas preparadas para los tres tratamientos poseen buena calidad, una taza equilibrada y un balance en los atributos acidez/amargor.

De manera gráfica (Figura 39) se comparan las intensidades de los diez criterios de calidad en las bebidas preparadas a partir del café obtenido por los tres tratamientos durante el tercer mes (FN_{t3}, L1_{t3} y L2_{t3}) y sexto mes (FN_{t6} , L1_{t6} y L2_{t6}) de almacenamiento.

Resultados y discusión

En la Figura 38 se muestra un perfil de sabores diferentes para la bebida preparada con el tratamiento L2, se observa un incremento al tercer mes en las notas acidez, amargo, cítrico, esto con respecto al mes inicial; además, el panel reportó sabores a chocolate y calificó a la bebida como buena. Para la bebida preparada con el tratamiento FN_{t3} se observa una disminución en los atributos calidad aromática, intensidad aromática, cuerpo y acidez, esto con respecto al mes inicial. Para la bebida preparada con el tratamiento L1_{t3} el panel detectó notas a chocolate.

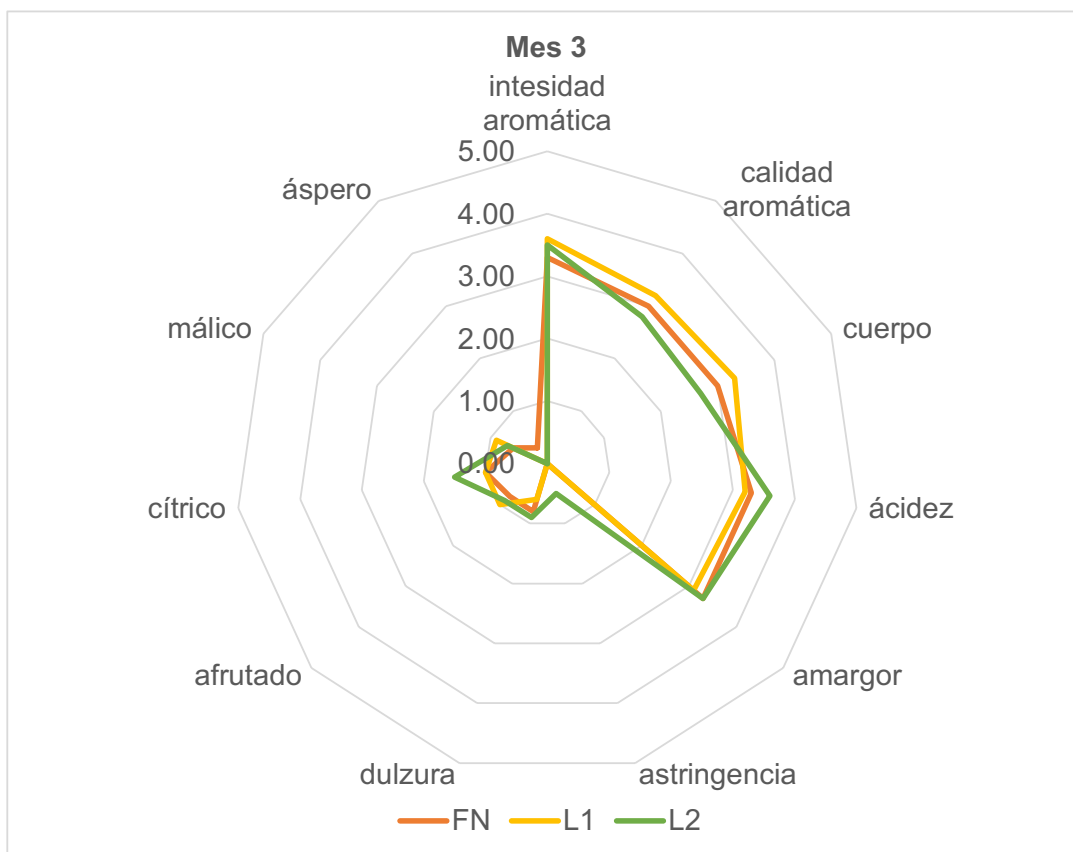


Figura 38. Comparación de diez criterios favorables de las bebidas de café en el tercer mes del estudio (fermentación natural= FN_{t3}, levadura 1= L1_{t3} y levadura 2= L2_{t3}).

En la Figura 39 se presenta la comparación en taza de los tres tratamientos a los seis meses de almacenamiento. Se observa que el tratamiento que se vio más

Resultados y discusión

afectado por el almacenamiento fue la bebida preparada con el tratamiento FN_{t6} debido a que los atributos intensidad aromática, calidad aromática y sabor afrutado disminuyeron; mientras que el balance de cuerpo/acidez se vio afectado con respecto al mes inicial y al tercer mes de almacenamiento.

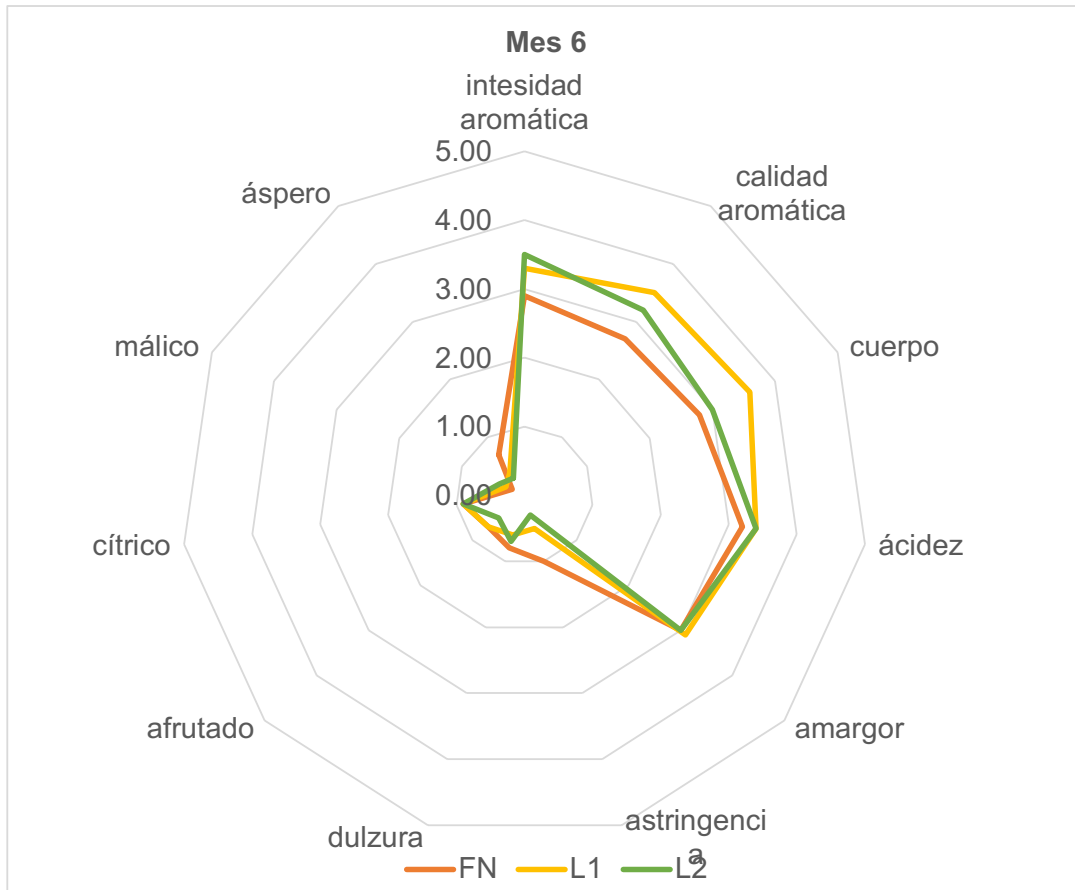


Figura 39. Comparación de diez criterios favorables de las bebidas de café en el tercer mes del estudio (fermentación natural= FN_{t6}, levadura 1= L1_{t6} y levadura 2= L2_{t6}).

Capítulo V

Conclusiones.

- Las fermentaciones con los inóculos de *S. cerevisiae* (L1 y L2), permitieron una fermentación controlada lo que podría ser favorable para mejorar la calidad aromática y sensorial del café al producir metabolitos microbianos, que son precursores de los compuestos volátiles que se forman durante el tostado.
- Los perfiles DGGE mostraron que las cepas de *S. cerevisiae* L1 y L2 fueron dominantes durante toda la fermentación del café. La FN fue conducida por especies de levaduras diferentes a *S. cerevisiae* L1 y L2.
- Se identificaron 59 VOC's totales en café verde y 86 VOC's en café tostado para los tres tratamientos y L1 fue la que generó más notas odoríficas agradables; y a pesar que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a sus compuestos no volátiles, L1 fue el tratamiento que no se detectó la presencia de Ocratoxina A (OTA) en ningún mes.
- El uso de levaduras L1 y L2, genera mayor calidad en taza y con atributos de cafés ligeros y equilibrados en la bebida, así como sabores al final de la bebida afrutados hasta el sexto mes de almacenamiento; mientras que FN sus atributos sensoriales fueron disminuyendo con respecto al paso del tiempo de almacenamiento.

Bibliografía.

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J. (2001). Current importance of ochratoxin A producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, 64, 903-906.

Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. y Cabañes, F.J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2650-2652.

Alvarado, E., (2011). Beneficios del uso de levaduras en rumiantes ¿Mito o realidad?, *Lesaffre Feed Additives*. Heredia, Costa Rica.

Aristizabal, A., y Duque, O. (2006). Determinación de economías de escala en el proceso de beneficio del café en Colombia. *Cenicafé*. 57(1), 17 -30.

Avallone, S., Brillouet, JM. Guyot, B., Olguin, E. y Guiraud J-P. (2002). Involvement of pectinolytic microorganisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology* 37: 191-198

Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, JM. Olguin, E. y Guiraud J-P., (2001). Microbiological and Biochemical Study of Coffee Fermentation. *Current Microbiology* 42: 252-256

Baggenstoss, J., Poisson, L., Kaegi, R., Perren, R., y Escher, F. (2008). Coffee roasting and aroma formation: Application of different time–temperature conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5836–5846.

Baker, K., y Cook, R. J. (1974). *Control biológico de patógenos vegetales*, California, EE. UU, WH Freeman and Company.

Banegas, R. (2009). Identificación de las fuentes de variación que tienen efectos sobre la calidad del café (*Coffea Arábica*) en los municipios de El Paraíso y Alauca, Honduras. Tesis Maestría, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.

- Batista, N. N., Ramos, C. L., Ribeiro, D. D., Pinheiro, A. C. M., y Schwan, R. F. (2015). Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 221–227.
- Bencheqroun, S.K., Bajji, M., Massart, S., Labhilili, M., Jaafari, S.E., y Jijakli, M.H. (2007). In vitro and in situ study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biology and Technology*, 46(2), 128-135
- Benítez, M.R., y Carrillo, L. 2004. Levaduras inhibidoras de *Penicillium*. *Revista Argentina de Microbiología*, 36, 182- 186.
- Bozic, Z., Duancic, V., Belicza, M., y Kraus, O. (1995). Balkan endemic nephropathy: still a mysterious disease. *European Journal of Epidemiology*, 11, 235-8.
- Bragulat, M.R., Martínez, E., Castellá, G. y Cabañes, F.J. (2008). Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (1-2), 43-48.
- Broissin, L. M., Suárez-Quiroz, M. L. y González-Ríos, O. (2017). Estudio de la dinámica de poblaciones fúngicas y su impacto en los marcadores de calidad durante el almacenamiento de café verde. Tesis Doctoral, Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Cabrera, G., y Briano, J., (2012). El control biológico de plagas. *Revista Ciencia hoy*, 22, 128. (disponible en: <http://www.cienciahoy.org.ar/ch/ln/hoy128/plagas.html>).
- Cañas, R. F. (2015). Guía de factores que inciden en la calidad del café: Una alternativa para hacer el cafetal sostenible, *Plataforma Nacional de Café Sostenible-SCAN*,100.
- Carlile, M. J., y Watkinson, S. (2001). *The Fungi*, California, EU, Academic Press. San Diego, 70.

- Champion, E. I., Suárez-Quiroz, M. L. y González-Ríos, O. (2008). Efecto de las bacterias lácticas aisladas en fermentación del café (*Coffea arabica*) sobre el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* y la producción de Ocratoxina A. Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Cheong, M. W., Tong, K. H., Ong, J. M., Liu, S. Q., Curran, P., y Yu, B. (2013). Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. *Food Research International*, 51(1), 388–396.
- Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X., y Borriss, R., (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens*FZB42. *Frontiers in Microbiology*, 6, 780.
- Chu, F.S. (1971). Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. *Arch Biochem Biophys*. 147, 359-66.
- Clarke, R. J. y Macrae, R. (1988). *Coffee: Physiology*. New York, USA, Elsevier Applied Science Publishers.
- Clarke, R.J. (1985). *Coffee*, Springer, Países Bajos, Elsevier Science Publishers Ltd.
- Clarke, R.J. (2001). *Coffee. Recent Developments*, Ohio, EE. UU, Wiley-Blackwell.
- Codex Alimentarius. (2013). Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación del café por Ocratoxina A. *Codex Alimentarius*, 72, 1–9.
- Comaposada, J., Gou, P., y Arnau, J. (2000). The effect of sodium chloride content and temperature on pork meat isotherms. *Meat Science*. 55, 291-295.
- Comisión Europea (2006). Reglamento N° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas.
- Correa, E., Jiménez-Ariza, T., Díaz-Barcos, V., Barreiro, P., Diezma, B., Oteros, R., y Ruiz-Altisent, M., (2014). Advanced characterization of a coffee fermenting tank by multi-distributed Wireless sensors: Spatial interpolation and phase space graphs. *Food and Bioprocess Technology*, 7(11), p. 3166-3174.

- Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A.D.W., Budroni, M., y Migheli, Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins*, 4, 1468–1481
- De Costa, D.M., y Erabadupitiya, H.R. (2005). An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 31-39.
- de Melo, G. V., Neto, E., Soccol, V. T., Medeiros, A. B. P., Woiciechowski, A. L., y Soccol, C. R. (2015). Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research International*, 75, 348–356.
- de Melo, G. V., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Andrade Lara, J. M. R., Gollo, A. L., y Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 60–66.
- Díaz, S., René, F., Ramírez, S., Felipe, L., Soto, H., Marcos. R., Sánchez, G., Sandoval, M., Alcántar, G., y Quintero., R. (2010). Ácidos fenólicos en paja de trigo. ¿Son éstos los compuestos fenólicos más importantes en la inhibición del crecimiento de las plantas?. *Acta Universitaria*, 20(3), 56-62.
- Dicovski, L.M. (2009). Poscosecha de café. Fermentación y secado solar de café pergamino en fincas de pequeños productores de San Rafael del norte, Nicaragua, *Revista de Ciencia y Tecnología - "El Higo"*, 1,12-14.
- Díez, B., Pedrós, C., Marsh, T. L. y Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and environmental microbiology*, 67 (7), 2942-2951.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., y Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biology and Technology*, 52, 137-145.

Durand, N., El Sheikha, A. F., Suárez, M. L., González, O., Nganou, N. D., Fontana, A. y Montet, D. (2013). Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. *Food Control*, 34 (2), 466–471.

EFSA (2006). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the Food Chain of the EFSA on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 365, 1-56.

El Sheikha, A. F. (2010). Determination of geographical origin of Shea tree and *Physalis* fruits by using the genetic fingerprints of the microbial community by PCR/DGGE. Analysis of biological properties of some fruit extracts. Montpellier University II.

El Sheikha, A.F. y Montet, D. (2011). Determination of fruit origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: an application to *Physalis* fruits from Egypt, Uganda and Colombia. *Fruits*, 66, 79–89.

El Sheikha, A.F., Condur, A., Métayer, I., Le Nguyen, D. D., Loiseau, G. y Montet, D. (2009). Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR–DGGE: preliminary application to *Physalis* fruits from Egypt. *Yeast*, 26 (10), 567-573.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Micotoxinas de importancia mundial. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de micotoxinas 2006.

Ferreira, G., Novaes, Q., Malta, M., y Souza, S., (2013). Quality of coffee produced in the South-West Region of Bahia, Brazil subjected to different forms of processing and drying. *African Journal of Agricultural Research*, 8(20), p. 2334-2339.

- Frank, H.A., Lum, A.N. y De la Cruz, A.S. (1965). Bacteria responsible for mucilage layer decomposition in Kona coffee cherries. *Applied Microbiology*, 13: 201-207
- Frisvad, J.C. y Samson, R.A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49, 1-173.
- García, A., Romero, D., y de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 187-193.
- García-Moraleja, A., Font, G., Mañes, J., y Ferrer, E. (2015). Development of a new method for the simultaneous determination of 21 mycotoxins in coffee beverages by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Research International*, 72, 247–255.
- Gaviria-Hernández, V., Patiño, L. F., y Saldarriaga, A. (2013). Evaluación in vitro de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla In vitro evaluation of commercial fungicides for control of *Colletotrichum* spp. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(1), 67–75.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N. (2011) Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*. 22:2 p 343-345
- González, A. (2010). Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- González, A., Valenzuela, L. (2003). *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*: un modelo de estudio desde hace más de cien años. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM. Cuerna-vaca, Morelos. Editores: Dra. Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero. (disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>).

- González-Ríos, O., Suarez-Quiroz, M. L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J. P., y Schorr-Galindo, S. (2007). Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20(3),289-296.
- Grosch, W., (2007). Gas Chromatography-Olfactometry of Aroma Compounds. In: Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Germany: Springer-Verlag. Pp. 363-378.
- Guerrero-Prieto, V. M., Berlanga-Reyes, D.I., y Ojeda-Barrios, D.L. (2012) Biocontrol con levaduras de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en manzana Golden Delicious. *TECNOCIENCIA Chihuahua* 7(2), 75-80.
- Guyot, B., Gueule, D., Manez, J.C., Perriot, J.J., Girón, J., Villain, L. (1996). Influencia de la altitud y de la sombra sobre la calidad de los cafés *Arábica*. *Anacafe*.
- Haddad, F., Saraiva, R. M., Mizubuti, E. S. G., Romeiro, R. S. y Maffia, L. A. (2014). Isolation and selection of *Hemileia Vastatrix* antagonists. *European Journal of Plant Pathology*. 139:763-772.
- Hernández, A.N., Bautista, S., Velásquez, M.G., y Hernández, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades poscosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25(1), 66-74.
- Hernández, B., Rojas, M.M., y Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42, 131-138.
- Hernández, E., Maza, E., Lozano, N. (2003). Producción de proteína unicelular mediante cultivo continuo de levadura en suero de leche desproteínizado. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 5(2). 468-477.
- Hesham, A. E., Khan, S., Liu, X., Zhang, Y., Wang, Z., y Yang, M. (2006). Application of PCR – DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Yeast*, 23, 879–887.
- Hope, J. A. (2013). Review of the mechanism of injury and treatment approaches for illness resulting from exposure to water-damaged buildings, mold, and mycotoxins. *Scientific World Journal*.

- Horie, Y. (1995). Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho*, 36, 73-76.
- Huff, W. E., Y Hamilton, P. B. (1995). Mycotoxins their biosynthesis in fungi: ochratoxins metabolites of combined pathways. *Food Protection*, 42, 815–820.
- IARC. (1993). Ochratoxin A. En: Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 56, 489-521.
- ISO 2003. Green coffee: Determination of loss in mass at 105 °C. Suiza. 6673:2003(E), 4.
- ISO 2004. Green coffee – Defect reference chart. 10470:2004 (E), 15.
- ISO 2005. Green coffee. Olfactory and visual examination and determination of foreign matter and defects. 4149:2005(E), 5.
- Janisiewicz, W., y Korsten, L. (2002). “Biological control of postharvest diseases of fruits”, *Annual Review of Phytopathology*, 40, 411-441.
- Juárez-Becerra, G. P., Sosa, M. E., y López, A. (2010). Hongos Fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 4, 14-23.
- Kabak, B., y Dobson, A.D.W. (2009). Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 72, 2006–2016.
- Kaz, G.F., Öztürk, N., Demiray, G., Tufan, Ö., Turan, G., Noyan, N.E., Demirli, A.Ö., Birincioğlu, G., Aydın, C., Bilirgen, E., y Turan, A.Z. (2011). *From the bean to the cup: a cup of coffee in the palace for all time [Tüm Zamanların Hatırına Sarayda Bir Fincan Kahve]*. Istanbul, Turkey, Edited by Grand National Assembly of Turkey Head of the National Palaces.
- Kipkorir Richard Koskei, Muliro, P., y Muhoho, S., (2015). Effects of coffee processing technologies on physico- chemical properties and sensory qualities of coffee. *African Journal of Food Science*. Vol. 9(4), pp. 230-236

- Koskei, K., Patrick, M., y Simon, M. (2015). Effects of coffee processing technologies on physicochemical properties and sensory qualities of coffee. *African Journal of Food Science*, 9(4), 2015, 230-236
- Krogh, P. (1987). Ochratoxicosis in food. *Mycotoxins in food*, 81, 689–695.
- Kumagai, S., y Aibara, K. (1982). Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 64: 94-102.
- Lara, L., y Vaast, P. (2007). Effects of altitude, shade, yield and fertilization on coffee quality (*Coffea arabica* L. var. Caturra) produced in agroforestry systems of the Northern Central Zones of Nicaragua. En: Second International Symposium on Multistrata agroforestry systems with perennial crops: Making ecosystem services count for farmers, consumers and the environment, Costa Rica. IUFRO, CIRAD, CATIE.
- Le, J. (1988). Toxinogénese en fonction des conditions écologiques du système grains/microorganismes. *Conservation et Stockage des Grains et Graines et Produits Dérivés. Technique et Documentation Lavoisier*, 376–391.
- Le-Bars, J. (1988). Toxinogénese en fonction des conditions écologiques du système grains/microorganismes. *Conservation et Stockage des Grains et Graines et Produits Dérivés. Technique et Documentation Lavoisier*, 376–391.
- Lee, L. W., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., y Liu, S. Q. (2015). Coffee fermentation and flavor - An intricate and delicate relationship. *Food Chemistry*, 185, 182–191.
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., y Mendgen, K. (1997). Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology*, 87(11), 1103-1110.
- Levi, C. P., Trenk, H. L. y Mohr, H. K. (1974). Study of occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *Association of Official Analytical Chemists*. 57, 866-870.

- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., y Liu, Y. (2013). Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *international journal of food microbiology*, 167, 153–160.
- López-Galilea, I., Fournier, N., Cid, C. and Guichard, E. (2006). Changes in headspace volatile concentrations of coffee brews caused by the roasting process and the brewing procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.54:8560-8566
- Mari, M., Bertolini, P., y Pratella, G.C. (2003). Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 761-766.
- Marín, J., Osorio, G. Á., y Puerta, G. (2012). Microbiología de la fermentación del mucilago de café según su madurez y selección. *Cenicafé*, 63 (2), 58–78.
- Marín, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., y Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218- 237.
- Marques, D., Vinícius G., Ferreira, C., Batista, L., y Freitas, R. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.), *Food Microbiology*, 27, 1128-1135.
- Marr, J.S. y Malloy, C.D. (1996). An epidemiologic analysis of the ten plagues of Egypt. *Caduceus*, 12 (1), 7-24.
- Marroquín, A.G., Johnson, N.M, Phillips, T.D., y Hayes, A.W. (2014). Mycotoxins in a changing global environmenta review. *Food Chem Toxicol.* 69, 220-30.
- Martinez, S.J., Bressani, A.P.P., Miguel, M.G.C.P., Dias, D.R., Schwan, R.F.(2017). Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures *Food Research International*, 102 (2017), pp. 333-340
- Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L., y Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, 21(7), 549–556

- Masoud, W., y Jespersen, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3), 291–296.
- Massawe, G.A. Lifa S.J. (2010) Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*. 2:1 p41-82
- Medina, A., Mateo, R., López, L., Valle, F.M. y Jiménez, M. (2005). Study of Spanish grape mycobiota and Ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8), 4696-4702.
- Meira, F.B., Isquierdo, E.P., Oliveira, P.D., Ribeiro, F.C., Isqueira, V.C., Taveira, J.H. (2014). Effect of intermittent drying and storage on parchment coffee quality. *Bioscience Journal* 30(2):609-616
- Molnar, o., Schatzmayr, G., Fuchs, E., Prillinger, H. (2004). *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., A New Yeast Species Useful in Biological Detoxification of Various Mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology*. 22:6 p 661-671
- Monroig, M., (2015). El almacenamiento del café. Servicio de Extensión Agrícola, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico-Recinto Universitario de Mayagüez. (disponible en: https://issuu.com/bibliotecaeeea/docs/almacenamiento_cafe_2015).
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2009). *Medical microbiology*, Barcelona, España, Elsevier.
- Nakayama, S.M.M., y Darwish, W. (2014). An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa. *Journal of Veterinary Medical Science*.76(6), 89-97
- Niño, J. (2018). Estudio de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* productoras de Ocratoxina A (OTA) asociadas a la producción de café (*Coffea arabica*). Tesis Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.

- Northolt, M. D., Egmond, H. P. V. y Paulsch, E. (1979). Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal Food Protection*, 42, 485–490.
- Ochoa, J.L., Vázquez, R. (2004). Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas. *Marine yeasts as Scientific and Biotechnology tools*, 1, 39-50.
- OMS (1999). Basic Food Safety for Health Workers. *World Health Organization*, 99, Ginebra, Suiza. 25.
- Othón-Serna S. (1996). Química Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. AG Editor. México DF. 1ª Ed. 521 p.
- Pal, K.K., y Gardener, B.M., (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1, 1-25.
- Parada, R. (1988). Micotoxinas y micotoxicosis del ganado, *Monografías de Medicina Veterinaria*, 10(1).
- Pavón, M.C., Suárez, M. L. y González, O. (2013). Estudio de los microorganismos implicados en la generación de aromas durante la fermentación del café (*Coffea arabica L.*). Tesis Doctoral, Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Pelizer, L.H. (2003). Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of food engineering*. 56(4), 371-375.
- Pérez, H. (2007). Evaluación y selección de cepas de levaduras con características probióticas para uso como aditivo alimentario. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 1, 20-28.
- Petersson, S., Hansen, M.W., Axberg, K., Hult, K., y Schnürer, J. (1998). Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research*, 102, 1003–1008.
- Pfiegler, W. P., Pusztahelyi, T., y Pócsi, I. (2015). Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, 55(7), 805–818.

- Pitt, J.I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (2), 266-269.
- Pitt, J.I. (1996). What are mycotoxins? *Australian Mycotoxin Newsletter*, 7, 1.
- Plestina, R. (1996). Nephrotoxicity of ochratoxin A. *Food Additives Contaminants*, 13, 49 – 50.
- Portillo, M. del C., y Mas, A. (2016). Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 317–321.
- Puerta, G. (2006). Buenas prácticas agrícolas para el café. *Chinchiná: Cenicafé*, 1(349), 12.
- Puerta, G. (2006). La humedad controlada del grano preserva la calidad del café. *Chinchiná: Cenicafé*, 1(352), 8.
- Puerta, G. (2008). Riesgos para la calidad y la inocuidad del café en el secado. *Chinchiná: Cenicafé*, 1(371), 8.
- Puerta, G. (2012). Factores, procesos y controles en la fermentación del café. *Revista Cenicafé*, 1(422), 1-12.
- Puerta, G., (2000). Beneficie correctamente su café y conserve la calidad de la bebida. *Chinchin: Cenicafé*, 1(276), 8.
- Raynolds, L. T., Murray, D., y Heller, A. (2007) "Regulating Sustainability in the Coffee Sector: A Comparative Analysis of Third-party Environmental and Social Certification Initiatives". *Agriculture and Human Values*, 24(2), 147-163.
- Raynolds, L.T. (2009). "Mainstreaming fair trade coffee: from partnership to traceability", *World Development*, 37, 1083-1093.
- Reis, S. E., Miguel, M. G. D. C. P., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., y Schwan, R. F. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102-112.

- Reis, S. E., Miguel, M. G. P. da C., Cordeiro, C. de S., Pinheiro, A. C. M., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2014). Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*. 61, 183–195.
- Rockland, L.B., Nishi, S.K. (1980) Influence of water activity on food product quality and stability. *Food Technology*. 15:59
- Rodríguez, D., Cure, J. R., Cotes, J. M., Gutierrez, A. P., y Cantor, F. (2011). A coffee agroecosystem model: I. Growth and development of the coffee plant. *Ecological Modelling*, 222(19), 3626–3639.
- Rojo, E. (2014). Café I (*Coffea*). *Reduca (Biología)*. Serie Botánica., 7(2), 113–132.
- Rothfos, B. (1980). Fermentation. Coffee Production. Hambourg. Gordian-Max Rieck:217-227.
- Sainju UM, Lenssen AW, Allen BL, Stevens WB and Jabro J. 2016. Nitrogen balance in response to dryland crop rotations and cultural practices. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 233:25-32.
- Schatzmayr, G., Zehner, F., Täubel, M., Schatzmayr, D. Klimitsch, A. Loibner, A.P., Binder, A.M. (2006) Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition and Food research*. 50:543-551
- Schlatter, CH., Stude, J., Rásonyi, T.H. (1996). Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Addit Contam*, 13, 43-4.
- Selmar D., Bytof G. y Sven-Erik K. (2008). The storage of green coffee (*Coffea arabica*): Decrease of viability and changes of potential aroma precursors. *Annals of Botany*. 101:31–38
- Selmar, D., Kleinwächter, M., y Bytof, G. (2015). Metabolic responses of coffee beans during processing and their impact on coffee flavor. In: R. F. Schwan, & G. H. Fleet (Eds.), *Cocoa and coffee fermentations* (pp. 431-476). New York, CRC Press.

Sepúlveda, W., Maza, M. y Mantecón, A. (2013). Information demanded by consumers: New issues in voluntary beef labeling. *Acta Alimentaria*, 42(2), 3 – 10.

Serna, J., Patiño, B., Cortés, L., González, M.T., y Vázquez, C. (2011). Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 113–118.

Serrano, L., Flores, C., Patiño, M., Ortiz, M., Albitar, V., Caro, M., Allende, R., Carrillo, A., y Galindo, E. (2003). "Desarrollo de bioprocesos para la producción de agentes de control biológico: experiencias de escalamiento y pruebas de campo", Memorias del X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta, Jalisco.

Serrano, L., y Galindo, E. (2007). "Control biológico de fitopatógenos: un reto multidisciplinario", *En Ciencia*. 58(1), 77-88.

Sharma, R. R., Singh, D., y Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50, 205-221.

Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., y Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *National Academy of Sciences*, 86, 232–236.

Silva, L., Ribeiro, D. E., Reis, S., Cruz, M. G., Marques, A. C., Meira, F., y Freitas, R. (2017). Controlled fermentation of semi-dry coffee (*Coffea arabica*) using starter cultures: A sensory perspective, *Food Science and Technology*, 82, 32-38

Silvana, V., Mondino, P., Burgueño, J., Soubes, M., y Wisniewski, M. (2002). Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 26, 91-98.

Silvetz, M., and Desrosier, N.W., (1979). Coffee Technology. Westport, Connecticut. The AVI Publishing Company. 97-114.

- Suárez, C. Garrido, C., Norge, A., y Guevara, R. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Revisión bibliográfica ICIDCA*, 50(1), 20-28.
- Suárez-Quiroz, M. L., González, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr, S., y Guiraud, J. P. (2004b). Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. *Food Microbiology*, 21 (6), 629-634.
- Suárez-Quiroz, M. L., González, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr, S., y Guiraud, J. P. (2004a). Study of ochratoxin A producing strains in coffee processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 501–507.
- Sunarharum, W., David J. Williams, D.J., y Heather, E. (2010). Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. *Food Research International*, 62, 315-325.
- Toros, T. (1998). *The history of coffee [Kahvenin €Oyküsü]*. Istanbul: Iletis, im Publications.
- Van Walbeek, W., Scott, P.M., Harwig, J. y Lawrence, J.W. (1969). *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Canadian Journal of Microbiology*, 15 (11), 1281-1285.
- Waller, J. M., Bigger, M. y Hillocks, R. J. (2007). *Coffee Pests, Diseases and Their Management*. Londres, Reino Unido, CABI.
- Wheeler, M. (2001). The speciality coffee market. In P, Baker. Eds. *Coffee Futures: A source book of some critical issues confronting the coffee industry*. CABIFEDERACEFE, *Chinchina Cenicafé*, 66-73.
- Wintgens, J. E. (2004). *Coffee: growing, processing, sustainable production. A guide book for growers, processors, traders and researchers*, Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag.
- Wisniewski, M.E., and Wilson, C.L. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. *Hort Science*, 27, 9

Woodhead, S.H., O'Leary, A. L., O'Leary, D. J., y Rabatin, S. C. (1990), "Discovery, development, and registration of a biocontrol agent from an industrial perspective". *Canadian Journal of Plant Pathology*, 12, 328-331.

XU, X.M., Salama, N., Jeffries P., y Jeger, M.J. (2010). Numerical studies of biocontrol efficacies of foliar plant pathogens in relation to the characteristics of a biocontrol agent. *Phytopathology*, 100(8), 814-821

Yu, X., Ai, C., Xin, L., y Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*. 47, 138-145.

Anexo I. Formato del análisis de defectos en café verde.

Fecha: _____ Folio: _____
 Origen: _____ Peso 100 gramos: _____
 Contenido de humedad: _____
 Color: _____

Designación de defectos	Coeficiente	Número	Peso	% en peso
Grano negro	1			
Grano Parcialmente negro	0.5			
Caracol	0.06			
Grano Esponjoso	0.5			
Grano Inmaduro	0.5			
Grano Blanco	0.5			
Grano Concha	0.5			
Grano Dañado por Insecto	0.5			
Grano Agrío	1			
Grano Quebrado, Roto, Fract.	0.5			
TOTAL				

ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO MES

TAMI	18≥17	17≥16	16≥15	14≥13
Z				
%				
g				

Anexo II. Cuestionario de preselección de candidatos para el panel de evaluación sensorial del café.

Candidatos para el panel de evaluación sensorial de café				
Candidato núm:		Fecha:		
Nombre:				
Edad:		Sexo:		
Carrera:	Semestre		Núm. de control:	
Correo electrónico:		Teléfono:		
Marque la respuesta correcta				
¿Le gusta el café?	Si		No	
¿Padece de intolerancia al café?	Si		No	
¿Estaría dispuesto a participar en la degustación de café?				
	Si		No	
Si su última respuesta fue Si; favor de continuar con el cuestionario de lo contrario le damos las gracias por su participación.				
SALUD				
Enfermedad que pueda afectar sus sentidos:			Frecuencia:	
¿Consume medicamentos que afecten sus sentidos en particular el gusto y el olfato?				
¿Es usted daltónico?	Si		No	
HÁBITOS				
¿Fuma?	Si		No	
¿Cuántos cigarrillos fuma al día?				
¿Consume alcohol?	Si		No	
Frecuencia				
¿Le gustan los alimentos muy salados?	Si		No	
¿Le gustan los alimentos muy ácidos?	Si		No	
¿Le gustan los alimentos muy amargos?	Si		No	
¿Le gustan los alimentos muy dulces?	Si		No	

¿Le gustan los alimentos muy picosos?	Si	No	
Horario de alimentos:			
Desayuno:		Comida:	Cena:
Me considero una persona puntual:			
100% de las veces			
80% de las veces			
60% de las veces			
40% de las veces			
¡Gracias por su participación!			

Anexo III. Formato para la prueba de identificación de sabores.

NOMBRE: _____		FECHA: _____	
INSTRUCCIONES:			
<p>Desguste de izquierda a derecha cada una de las soluciones presentadas. Las soluciones pueden ser dulces, ácidas, amargas o saldas. Puede haber una o más soluciones del mismo sabor identifiquen cada muestra con el sabor correspondiente. Enjuáguese bien la boca antes de iniciar la degustación y entre cada muestras.</p>			
MUESTRA	SABOR	MUESTRA	SABOR

¡GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN!

Anexo IV. Formato para la prueba de ordenación de sabores.

NOMBRE: _____		FECHA: _____		
INSTRUCCIONES:				
<p>Deguste de izquierda a derecha las muestras y ordénelas según su incremento en intensidad de sabor. Considerando 1 = mínima concentración y 4 = máxima concentración. Enjuague bien su boca antes de iniciar y entre cada muestra.</p>				
SABOR AMARGO				
MUESTRAS	903	321	809	037
ORDEN				
SABOR ÁCIDO				
MUESTRAS	864	652	387	084
ORDEN				
<p>Número de cabina _____</p>				
¡GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN!				

Anexo V. Protocolo utilizado para la prueba triangular.

Taza 1		Taza 2		Taza 3	
NÚMERO DE JUEZ		COMBINACIONES DE LAS MUESTRAS			RESPUESTA
1	Muestras	B	B	A	Taza 3
	Codificado	098	234	126	126
2	Muestras	A	B	A	Taza 2
	Codificado	309	124	236	124
3	Muestras	B	A	B	Taza 2
	Codificado	001	641	187	641
4	Muestras	B	A	A	Taza 1
	Codificado	908	342	189	908
5	Muestras	A	B	A	Taza 1
	Codificado	340	654	980	340
6	Muestras	A	A	B	Taza 3
	Codificado	128	634	912	912
7	Muestras	B	B	A	Taza 3
	Codificado	432	975	123	123
8	Muestras	A	B	A	Taza 2
	Codificado	903	97	343	097
9	Muestras	B	A	B	Taza 2
	Codificado	675	107	765	107
10	Muestras	B	A	A	Taza 1
	Codificado	123	387	654	123
11	Muestras	A	B	B	Taza 1
	Codificado	564	078	346	564
12	Muestras	A	A	B	Taza 3
	Codificado	340	875	127	127

Anexo VI. Formato para la prueba triangular.

NOMBRE: _____	FECHA: _____
INSTRUCCIONES:	CABINA: _____

Deguste cada una de las muestras de izquierda a derecha. Dos de ellas son iguales y una es diferente, identifique la muestra que es diferente por medio de una cruz en el código de la muestra correspondiente. Enjuague bien su boca antes de iniciar la degustación y entre cada muestra.

Ensayo	Muestras		
1	431	654	900
2	359	225	969

¡GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN!

Anexo VII. Formato para la prueba de análisis descriptivo.

Cabina:															
Juez															
Fecha/hora:															
Deguste de izquierda a derecha las muestras en el orden presentado e indique el valor (0 a 5) del atributo percibido. Enjuague bien su boca antes de iniciar la degustación y entre muestra.															
Atributo	Muestra A					Muestra B					Muestra C				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Int-Aromática															
Calidad-Arom															
Cuerpo															
Ácidoz															
Amargor															
Astringente															
Dulzura															
Afrutado															
Citrico															
Málico															
Aspero															
Terroso															
Quemado															
Fermentado															
Agrio															
Preferencia															
Observación:															